



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء \ كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

تقييم كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Asparagus officinalis*  
وأوكسيد الزنك النانوي في نمو بعض أنواع  
الفطر *Aspergillus spp.* المنتجة للأفلاتوكسين والمعزولة من منتجات  
اللحوم المتداولة في الأسواق المحلية

رسالة مقدمة الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة \ جامعة كربلاء

هي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في علوم الحياة

من قبل

هديل نبيل عاجل

بكالوريوس علوم الحياة / جامعة كربلاء

2016-2015

بإشراف

أ.م.د. بان موسى حسن

2025م

1446 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ

وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ)

صدق الله العلي العظيم

سورة المجادلة الآية (11)

## «إقرار المقوم اللغوي»

اشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ ( تقييم كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Aspergillus officinalis* وأوكسيد الزنك النانوي في نمو بعض الفطر *Aspergillus spp* المنتجة للأفلاتريكسين والمعزولة من منتجات اللحوم المتداولة في الأسواق المحلية) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة ( هديل نبيل عاجل ) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

 التوقيع:

الاسم: د. مسلم مالك الاسدي

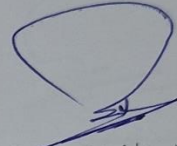
المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية العلوم الإسلامية

التاريخ: / / ٢٠٢٥

### توصية الأستاذ المشرف

اشهد بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة بـ ( تقييم كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Asparagus officinalis* وأوكسيد الزنك النانوي في نمو بعض الفطريات *Aspergillus spp* المنتجة للأفلاتوكسين والمعزولة من منتجات اللحوم المتداولة في الأسواق المحلية ) التي قدمتها الطالبة ( هديل نبيل عاجل شريف ) قد جرى تحت إشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء، وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة-النبات



التوقيع:

اسم المشرف: د. بان موسى حسن

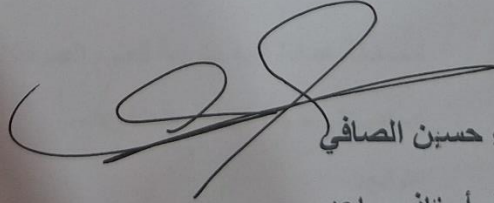
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

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

التاريخ: / / ٢٠٢٥

### توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءً على التوصيات المقدمة أشرح هذه الرسالة للمناقشة لدراساتها وبيان الرأي فيها.



التوقيع:

الاسم: د. علاء حسين الصافي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

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

التاريخ: / / ٢٠٢٥

### إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (تقييم كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Asparagus officinalis* وأوكسيد الزنك النانوي في نمو بعض لفطر *Aspergillus spp* المنتجة للأفلاتوكسين والمزولة من منتجات اللحوم المتداولة في الأسواق المحلية) في كلية التربية للعلوم الصرفة / قسم علوم الحياة ' جامعة كربلاء التي قدمتها الطالبة (هديل نبيل عاجل ريف) كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير، وبعد اجراء المناقشة العلنية وجد انها مستوفية لطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الرسالة بتقدير امتياز.

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. بان عبد الحسين محمد

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

رئيس لجنة المناقشة

التوقيع:

الاسم: د. رجا غازي عبد المحسن

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية الزراعة

عضواً ومشارفاً

التوقيع:

الاسم: د. بان موسى حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: د. عهد عبد علي هادي

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة الفرات الأوسط التقنية / الكلية التقنية

المسيب

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة أعلاه

التوقيع:

الاسم: د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: ٢٠٢٥ / ٣ / ١٧



## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الحمد لله الذي جعل الحمد مفتاحاً لذكره وخلق الأشياء ناطقة بحمده  
وشكره والصلاة والسلام على نبيه محمد وعلى آله الطاهرين أولي المكارم  
والجود.

كما لا يسعني إلا أن أنخص بأسمى عبارات الشكر والتقدير إلى استاذتي  
الفاضلة المشرفة على البحث الدكتور بان موسى حسن لاقتراحها عنوان  
الرسالة والمتابعة العلمية المستمرة وتوجيهاتها القيمة طيلة مدة  
البحث متمنية لهل كل التفوق في مسيرتها العلمية والعملية

ويسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى الأستاذ المساعد انتظار جبار على  
مساعدتها لي في أكمل الرسالة

ويسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل الى عمادة كلية التربية للعلوم  
الصرفة على اتاحتها لي لاكمال متطلبات دراستي متمنية التوفيق  
للجميع

واجد من الوفاء أن أتقدم بالشكر والعرفان لكل التدريسيين في قسم  
علوم الحياة وبالأخص قدوة المخلصين للواجب الدكتور علاء الصافي  
واتقدم بالشكر والامتنان لكل من قدم لنا المساعدة ولو بكلمة طيبة  
وأخر دعوانا ان الحمد لله رب العالمين.

هديل



**اهدي ثمرة جهدي**

**إلى الامام صاحب العصر والزمان ( عج )**

**والى من وهبوني الحياة والامل ، والنشأة على شغف الاطلاع**

**والمعرفة**

**ومن علموني ان ارتقي سلم الحياة بحكمة وصبر ، برا ، واحسانا ،**

**ووفاء لهما**

**والدي العزيز ، ووالدتي العزيزة**

**إلى من وهبني الله نعمة وجودهم في حياتي إلى القعد المتين من**

**كانوا عوناً لي في رحلة بحثي**

**اخواني واخواتي**

**إلى كل من ساعدني ، وكان له دور من قريب أو بعيد في إتمام هذه**

**الرسالة**

**سائلة المولى ان يجزي الجميع خير الجزاء في الدنيا والاخرة**

**ثم إلى كل طالب علم سعى بعلمه ، بكل ما أعطاه الله من علم**

**ومعرفة**

**هديل**

الخلاصة

Summary



## الخلاصة

أجريت الدراسة في مختبرات كلية التربية للعلوم الصرفة للعام الدراسي 2023-2024 ومختبرات العتبة الحسينية للأغذية ومختبرات جامعة الزهراء (ع) والهدف من هذه الدراسة هو تقييم فعالية المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Asparagus officinalis* L واوكسيد الزنك النانوي الأخضر في بعض الفطريات المنتجة لسم الافلا والتي تم عزلها من منتجات اللحوم المتداولة في الأسواق المحلية وتشخيصها تشخيصاً اولياً ثم تشخيص جزيئي باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR) والتي نجحت في مضاعفة منطقة 18S rRNA وتم بنجاح استخدام نفس البادئات في تحديد التتابع القواعد النيتروجينية التابعة للمركز الدولي لمعلومات GenBank التي اودعت في قاعدة البيانات التقانات الاحيائية National Center Of Biotechnology Information ( NCBI) لجميع الفطريات ، وبينت نتائج العزل من منتجات اللحوم المحلية والمعلبة التي جمعت كانت ملوثة بالفطريات وان جميع الفطريات التي عزلت كانت منتجة لسم افلا وتم الاستدلال على ذلك باستخدام وسط جوز الهند مع الامونيا واستخدام الألواح TLC . أما أهم الفطريات التي تم عزلها فهي *Aspergillus flavus* , *A. niger* , *A. fumigatus* , *oryzae* , *A. fumigatus* وسجلت جميع العازلات بالبنك الجيني العالمي واعطت لها ارقاماً تسلسلية PQ654181,PQ654182,PQ654183,PQ654184,PQ654185 أظهرت نتائج تحديد التشابه BLAST analysis التابعة لعزلاتنا مع العزلات العالمية أن هناك تشابهاً بنسبة 99-100% بينها وبين العزلات الأخرى العائدة لنفس الفطريات .بعدها أظهر المستخلص الكحولي لنبات الهليون فاعلية تثبيطية ضد الفطريات المختبرة تم التحري عن محتوى هذا النبات من المركبات الفعالة والتي تعد السبب الرئيس في اظهار تلك الفاعلية ، اذا أجري كشف للمركبات الفعالة باستخدام الكواشف الكيميائية واستخدام تقنية GC-MS ، إذ أظهرت النتائج احتواء المستخلص الكحولي والمائي لنبات الهليون على الكاربوهيدرات والراتنجات والكومارينات والتانينات والقلويدات والصابونيات والكلايكوسيدات والزيوت الطيارة واما باستخدام تقنية GC-MS فقد أظهرت النتائج احتواء المستخلص الكحولي على المركبات-butyl hex-3-yl ester و Dibutyl phthalate و Phthalic acid و butyl 8-chlorooctyl ester و Trimethylacetate و Xanthotoxol ، وبعدها أظهر أوكسيد الزنك النانوي ZnO NPs فاعلية تثبيطية ضد الفطريات المدروسة تم تشخيص المادة النانوية باستخدام XRD و UV و SEM و FT-IR و AFM اثبتت الدراسة من وجود فروقات معنوية بين جميع المستخلصات المستخدمة في التجارب عند مستوى الدلالة 0.05 واطهرت النتائج بأن المستخلص الكحولي لنبات الهليون اكثر كفاءة من أوكسيد الزنك النانوي في تثبيط الفطريات لما يحتويه المستخلص الكحولي لنبات الهليون على مركبات فعالة لتثبيط الفطريات .

# قائمة المحتويات

## Contents

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوعات	التسلسل
أ	الخلاصة	
i	جدول المحتويات	
	الفصل الأول	1
1	المقدمة	
	الفصل الثاني استعراض المراجع	2
4	السموم الفطرية	1-2
5	نبذة تاريخية عن السموم الفطرية	2-2
6	مخاطر السموم الفطرية	3-2
7	الأفلاتوكسينات Aflatoxins	4-2
9	التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات	5-2
10	جنس <i>Aspergillus</i>	6-2
10	الخصائص التصنيفية والتشخيصية لفطر <i>Aspergillus</i>	7-2
12	الفطريات المرافقة للحوم الطازجة والمعلبة	8-2
17	التشخيص الجزيئي	9-2
18	النباتات الطبية	10-2
22	المستخلصات النباتية	11-2
23	نبات الهليون ( <i>Asparagus officinalis</i> )	12-2
23	الاسم المرادف	1-12-2
23	وصف النبات وموطنه	2-12-2
25	الاستعمالات الطبية Medical Uses	3-12-2
25	التصنيف العلمي Scientific Classification	4-12-2
26	تكنولوجيا النانو Nanotechnology	13-2
26	مقدمة في تكنولوجيا النانو Introduction in Nanotechnology	1-13-2
27	بناء الجسيمات النانوية	2-13-2
30	أكسيد الزنك النانوي	14-2
32	الأجهزة والتقنيات المستخدمة في تشخيص المواد النانوية	15-2
	الفصل الثالث المواد وطرائق العمل	3
35	المواد	1-3
35	الأجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة	1-1-3
36	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-1-3
37	الكواشف المستخدمة في الدراسة	3-1-3
37	المواد والعدد المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل	4-1-3
38	الأوساط الزرععية	5-1-3
38	طرائق العمل	2-3

38	جمع العينات الفطرية من اللحوم والمعلبات	1-2-3
39	تحضير الأوساط الزرعية	2-2-3
39	عزل الفطريات وتنقيتها المرافقة للحوم	3-2-3
40	الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على إنتاج السموم	4-2-3
40	بأستخدام وسط جوز الهند ومحلول الامونيا	1-4-2-3
40	بأستعمال طريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة	2-4-2-3
40	تشخيص الفطريات المعزولة	5-2-3
40	التشخيص المظهري	1-5-2-3
41	التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة	2-5-2-3
45	جمع عينات النبات الهليون <b>Collecting Plants</b>	6-2-3
45	تحضير المستخلص الكحولي لنبات الهليون	1-6-2-3
45	طريقة تحضير تراكيز المستخلص الكحولي لنبات الهليون	
46	اختبار تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات المنتجة للسم الافلاتوكسين المعزولة من اللحوم :	2-6-2-3
46	الكشف عن المركبات الفعالة لنبات الهليون	7-2-3
46	الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة لنبات الهليون	1-7-2-3
46	الكشف عن الكربوهيدرات <b>Carbohydrates Test</b>	1-1-7-2-3
46	كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز	A
47	كشف مولش <b>Molish Test</b>	B
47	الكشف عن القلويدات <b>Alkaloids Test</b>	2-1-7-2-3
47	كاشف ماير <b>Mayer reagent</b>	A
47	كاشف واكنر <b>Wagner reagent</b>	B
47	الكشف عن التانينات <b>Tannins Test</b>	3-1-7-2-3
47	كشف خلات الرصاص <b>Lead acetate Test</b>	A
47	كشف كلوريد الحديدك <b>Ferric Chloride Test</b>	B
48	الكشف عن الصابونيات <b>Saponins Test</b>	4-1-7-2-3
48	الكشف عن الراتنجيات <b>Resins Test</b>	5-1-7-2-3
48	الكشف عن الكلايكوسيدات <b>Glycosides Test</b>	6-1-7-2-3
58	الكشف عن الفلافونات <b>Flavonoids Test</b>	7-1-7-2-3
58	الكشف عن الفينولات <b>Phenols Test</b>	8-1-7-2-3
58	الكشف عن الكومارين <b>Caumarines Test</b>	9-1-7-2-3
49	الكشف عن الزيوت الطيارة <b>Volatill Oils Test</b>	10-1-7-2-3
49	فصل وتشخيص المركبات الكيميائية بتقنية (GC-MS)	2--7-2-3
49	فصل المركبات الكيميائية	1-2-7-2-3
50	تشخيص المركبات الكيميائية الخام	2-2-7-2-3
50	دراسة تقنية النانو	8-2-3
50	التخليق الحيوي لجزيئات أكسيد الزنك النانوي	1-8-2-3

51	تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO ومستخلص نبات الهليون في نمو الشعاعي للفطريات	2-8-2-3
51	تشخيص المركبات النانوية	3-8-2-3
51	مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) <i>Ultraviolet visible spectrophotomete</i>	1
52	التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء <i>Fourier transform infrared Spectroscopy ( FTIR )</i>	2
52	مجهر حيود الأشعة السينية <i>( X – ray diffraction (XRD) :</i>	3
53	لمجهر الالكترونوني الماسح <i>( Scanning election microscope ( SEM) :</i>	4
53	المجهر القوى الذرية <i>( Atomic Force Microscopy (AFM)</i>	5
53	التحليل الاحصائي	9-2-3
	الفصل الرابع النتائج والمناقشة	4
55	عزل الفطريات من اللحوم	1-4
56	تشخيص الفطريات المنتجة الافلاتوكسين	2-4
56	التشخيص المظهري والمجهري للفطريات المعزولة	1-2-4
61	التشخيص الجزيئي للفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين	2-2-4
63	تحديد تسلسل القواعد النتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية والشجرة الوراثية <i>Phyiogeny</i>	3-2-4
72	الكشف عن الفطريات المنتجة الافلاتوكسين	3-4
72	استخدام وسط جوز الهند مع الامونيا	1-3-4
74	الكشف عن السموم الفطرية باستخدام الالواح TLC	2-3-4
75	الكشف عن المركبات الفعالة لنبات الهليون	4-4
75	الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة لنبات الهليون	1-4-4
76	تشخيص المستخلص الكحولي لنبات الهليون بتقنية GC-MS	2-4-4
79	تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو بعض الفطريات المنتجة للسموم المعزولة من منتجات اللحوم <i>A.flavus, A.nigrt, A.oryzae, A.fumigatus</i>	5-4
81	تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO NPs مع المستخلص الكولي لنبات الهليون على نمو الفطريات <i>A.oryzae و A.niger و A.flavus و A.fumigatus</i>	6-4
91	تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية	7-4
	الفصل الخامس الاستنتاجات والتوصيات	5
97	الاستنتاجات والتوصيات	
99	المصادر	

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
1-3	الأجهزة والأدوات المستخدمة	35
2-3	المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة	36
3-3	الكواشف المستخدمة	37
4-3	عدة استخلاص ال DNA	37
5-3	البودائ المستخدمة في تقنية Polymerase Chaina reaction ( PCR)	37
6-3	عدة اجراء تفاعل PCR	38
7-3	الأوساط الزرعية	38
8-3	خطوات التضاعف PCR	43
1-4	عينات اللحوم التي تم جمعها لعزل الفطريات منها	55
2-4	الأرقام التسلسلية للعزلات الفطرية في البنك الجيني GenBank	62
3-4	مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر <i>A.niger</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	63
4-4	مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر <i>A.flavus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI:	65
5-4	مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر <i>A.flavus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	67
6-4	مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر <i>A.oryzae</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	69
7-4	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر <i>A. fumigatus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	71
8-4	المركبات الفعالة في المستخلصات المائية والكحولية لنبات الهليون	76
9-4	نتائج تحليل GC-MS لنبات الهليون	77
10-4	تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على معدل نمو الفطريات المنتجة للافلاتوكسين	79
11-4	تأثير أكسيد الزنك النانوي مع مستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات <i>A.flavus</i> و <i>A.niger</i> و <i>A.oryzae</i> و <i>A.fumigatus</i>	82
12-4	المقارنة بين المستخلص الكحولي وأكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.flavus</i>	84
13-4	مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أكسيد الزنك التانوي للفطر <i>A.niger</i>	86

87	المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أوكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.oryzae</i>	14-4
89	مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أوكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.fumigatus</i>	15-4

قائمة الاشكال والصور

رقم الصفحة	عنوان الشكل	رقم الشكل
9	التركيب الكيميائي للافلاتوكسينات	1-2
24	نبات الهليون	2-2
28	بناء الجسيمات النانوية من الأعلى الى الأسفل	3-2
28	بناء الجسيمات النانوية من الأسفل الى الأعلى	4-2
43	استخلاص وتنقية DNA	1-3
45	صورة لنبات الهليون	2-3
50	صورة لجهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)	3-3
57	الصفات المظهرية للفطر <i>Aspergillus flavus</i> على وسط PDA وبعمر سبعة أيام وبدرجة حرارة 27 م	1-4
58	الصفات المظهرية للفطر <i>Aspergillus Oryzae</i> على وسط PDA وبعمر 7 أيام وبدرجة حرارة 27 م	2-4
59	صفات المظهرية للفطر <i>Aspergillus niger</i> على وسط PDA وبعمر سبعة أيام وبدرجة حرارة 27 م .	3-4
60	صفات المظهرية للفطر <i>Aspergillus fumigatus</i> على وسط PDA وبعمر 7 أيام وبدرجة حرارة 27 م .	4-4
61	صورة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتحديد منطقة الجين 18S rRNA	5-4
64	شجرة التطور الوراثي للفطر <i>Aspergillus niger</i> ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه	6-4
66	شجرة التطور الوراثي للفطر <i>Aspergillus flavus</i> ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود الى الجنس نفسه .	7-4
68	الشجرة التطور الوراثية للفطر <i>A.flavus</i> ( المحددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى ولانواع معروفة تعود الى نفس العزلة	8-4
70	شجرة التطور الوراثي للفطر <i>Aspergillus oryzae</i> ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه	9-4
72	شجرة التطور الوراثي <i>Aspergillus fumigatus</i> ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه	10-4

73	يظهر الجهة الخلفية لبعض المستعمرات الفطرية النامية على وسط جوز الهند في درجة حرارة 27 +/- 2 م ولمدة 7 أيام لاختبار قابلية الفطر لإنتاج سموم الفطرية	11-4
74	قدرة عزلات من جنس <i>Aspergillus</i> على إنتاج سم الافلاتوكسين باستخدام صفائح كروموتوغرافيا ( TLC )	12-4
78	نتائج تحليل كيميائي لنبات الهليون بتقنية GC-MS	13-4
81	تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات <i>A.flavus</i> و <i>A.niger</i> و <i>A.oryzae</i> و <i>A.fumigatus</i>	14-4
83	تأثير أكسيد الزنك النانوي على نمو الفطريات <i>A.flavus</i> و <i>A.niger</i> و <i>A.orezae</i> و <i>A.fumigatus</i>	15-4
85	المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون وأكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.flavus</i>	16-4
86	المقارنة بين المستخلص الكحولي مع أكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.niger</i>	17-4
88	مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.oryzae</i>	18-4
90	المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أكسيد الزنك النانوي للفطر <i>A.fumigatus</i>	19-4
91	مطياف الأشعة فوق البنفسجية ( UV )	20-4
92	طياف الأشعة تحت الحمراء FT-IR	21-4
93	مجهر حيود الأشعة السينية ( XRD )	22-4
94	صورالمجهر الالكتروني الماسح ( SEM )	23-4
95	صورة المجهر القوى الذرية (AFM)	24-4
95	صورة مجهر القوى الذرية (AFM)	25-4



الفصل الأول  
المقدمة

**Introduction**

## 1- المقدمة

يعد تلوث الأغذية والاعلاف بالفطريات والسموم الفطرية من المشاكل التي تهدد العديد من الدول النامية ولاسيما تلك التي تفتقر لظروف الخزن الغذائي الجيد وتعد مصدر قلق كبير جداً مما دعى تلك الدول إلى توفير مصادر غذائية صحية لتحقيق أمنها الغذائي ( Makun et al,2010 )

السموم الفطرية هي نواتج أيضية ثانوية تنتجها الفطريات القادرة جينياً على انتاج السموم الفطرية عندما تكون الظروف البيئية مناسبة لإنتاجها. تعد السموم الفطرية من أخطر السموم لأنها تسبب الأمراض الخطيرة بتراكيز ضئيلة حوالي عشرة جزء من المليون. وهي مقاومة للحرارة بحيث يصعب اتلافها بالمعاملات الحرارية المستخدمة في التصنيع والطهي كما تقاوم الانجماد وتنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر الى الأغذية، فإزالة الأجزاء المصابة بالفطر من الأغذية كما يفعل الكثير من الناس لا يؤدي إلى التخلص الكامل من السموم الفطرية المتكونة في هذه الأغذية (سعيد ومشعل، 2016 ؛ وهبة والنسر ، 2010 ) .

للسموم الفطرية تأثيرات كبيرة في الصحة العامة إذ تسبب تسمم الكلى وتثبيط المناعة ومسح الأجنة وتشوهات خلقية وهذه السموم قادرة على إحداث تأثيرات حادة ومزمنة في الإنسان والحيوان تتراوح بين الموت أو اضطراب في الجهاز العصبي المركزي والقلب والأوعية الدموية والنظم الرئوية ( Bhat and Vasanthi,2003 ) .

من بين أهم تلك السموم هي الافلاتوكسينات وهي عبارة عن مركبات أيض ثانوية مسرطنة تنتج بصورة رئيسية من الفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* ( Rashid et al,2008 ) ومنذ أكتشاف الافلاتوكسينات في عام 1960 إذ وجد أكثر من 18 نوع من الافلاتوكسين منها ( B1,B2,G1G2 ) يتم أنتاجها عادة من قبل الجنس *Aspergillus* حيث ينتج *A.flavus* الافلاتوكسين B1,B2 في حين *A.Parasiticus* ينتج الأنواع الأربعة الرئيسية من الافلاتوكسين ( Basappa , 2009 ) فضلاً عن وجود M1,M2 اللذين يعدان نواتج أيضية للسموم (Carlson et al,2002).

يعد الافلاتوكسين B1 هو الأول في مدى سميته وأحداث السرطانات والطفرات الجينية يليه G1 ثم B2 واخيراً G2 الذي يعتبر الأقل سمية من بين الأنواع الأربعة (Smith، 1997، Eaton and Gallagher ، 1995) .

توفر اللحوم ومنتجاتها وسط نمو ممتاز لمجموعة متنوعة من الكائنات الدقيقة ، بعضها مسببات الأمراض ( Jay et al ., 2005 ) . قد يحدث تلوث منتجات اللحوم بالعفن في المراحل المختلفة التي يتم فيها تحضير المنتجات ، فقد يحدث أثناء ذبح الحيوانات في ظل ظروف صحية سيئة باستخدام المياه والمعدات والأواني

الملوثة أو أثناء المعالجة بإضافة إضافات للحوم ملوثة بأبواغ العفن أو أثناء التعبئة . المناولة والنقل والتخزين ( Morshdy et al ., 2015 ) .

يعد نبات الهليون غني جداً من الناحية الدوائية لأنه يحتوي على أنشطة مضادة للسرطان ( Zhang et al ., 2019 ) , مضادة الأكسدة , مضاد للقرحة , مضادة للفطريات والبكتيريا فضلاً عن إنه يعد مضاداً للالتهابات ( Desoukey et al ., 2020 ) , ارتفاع ضغط الدم ومضاد للتخثر ( Sanae, & Yasuo, 2013 )

تظهر جسيمات الزنك النانوية فعالية قوية ضد مجموعة كبيرة من الفطريات المسببة للأمراض , *Botrytis cinerea* , *Rhizopus stolonifera* , *Aspergillus niger* ,, *Candida albicans* , *Penicillium* ( Christian O Dimkpa et al ., 2013 ; He et al ., 2011 ; Sawai and Yoshikawa, 2004 ) .

ولأهمية المشاكل الناجمة عن الفطريات الملوثة للأغذية واللحوم ومحاولة معالجة هذه الفطريات والتقليل من أضرارها هدفت هذه الدراسة التحري عن بعض الأنواع الفطرية الملوثة للحوم الطازجة والمعلبة والمتداولة في الأسواق المحلية والكشف عن أنتاجيتها للسموم وإمكانية تثبيطها بواسطة مستخلصات نبات الهليون الخام والنانوية .

#### - محاور الدراسة

1. التحري عن الفطريات المرافقة والملوثة للحوم الطازجة والمعلبة في الأسواق المحلية.
2. اختبار قدرة الفطريات المعزولة على أنتاج السموم
3. تشخيص الفطريات المنتجة للسم الافلا تشخيص مظهري ومجهري وجزئي
4. تحضير المستخلص الكحولي لنبات الهليون
5. دراسة الدور لتثبيطي للمستخلص الكحولي لنبات الهليون الخام على نمو الفطريات
6. التخليق النانوي بواسطة أكسيد الزنك النانوي ونبات الهليون ودراسة دورها التثبيطي على الفطريات قيد الدراسة.
7. دراسة مقارنة للنتائج بين المستخلصات الخام والمستخلص النانوي في تثبيط الفطريات

الفصل الثاني  
استعراض المراجع  
**Literatures  
Review**

## 1-2 السموم الفطرية

جاءت تسمية السموم الفطرية Mycotoxin من اللغة اليونانية الكلمة من مقطعين الأول "mykes" ويعني الفطريات والثاني "toxicum" تعني السم ، وهي مركبات أيض ثانوي تنتج من الفطريات الفارزة للسموم ، والتي يمكن أن تسبب المرض والموت للإنسان والحيوان ، تم وصف أكثر من 400 نوعاً من الفطريات الفارزة السموم الفطرية في جميع أنحاء العالم ( Matny ,2020).

عرف أكثر من 400 نوعاً من السموم الفطرية في جميع أنحاء العالم ، غالباً ما تتجاوز التراكيز الحدود المقبولة في المنتجات الزراعية ، وتشمل السموم الفطرية الأكثر شيوعاً والمؤثرة في صحة الانسان والحيوان الافلاتوكسين Aflatoxin ، الاكراتوكسين Ochratoxin ، السترين Citrinin ، الفيومنزين Fumonisin ، الباتولين Patulin ، الزيرالينون Zearalenone ، النيفالينون Nivalenol ، الديوكسينيفالينول Deoxynivalenol وقلويدات الارغوت Ergot alkaloids مثل الارغوتامين Ergotamine ( Juraschek et al , 2022 ؛ Awuchi et al , 2022 ).

السموم الفطرية هي نواتج أيضية ثانوية تنتجها الفطريات القادرة جينياً على انتاج السموم الفطرية عندما تكون الظروف البيئية مناسبة لإنتاجها. تعد السموم الفطرية من أخطر السموم لأنها تسبب الأمراض الخطيرة بتركيز ضئيلة حوالي عشرة جزء من المليون. وهي مقاومة للحرارة بحيث يصعب اتلافها بالمعاملات الحرارية المستخدمة في التصنيع والطهي كما تقاوم الانجماد وتنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر الى الأغذية، فإزالة الأجزاء المصابة بالفطر من الأغذية كما يفعل الكثير من الناس لا يؤدي إلى التخلص الكامل من السموم الفطرية المتكونة في هذه الأغذية، (سعيد ومشعل، 2016 ؛ وهبة والنسر ، 2010).

ترتبط السموم الفطرية الأخرى الموجودة في الأغذية بأثار طويلة الأجل على صحة، بما في ذلك السرطان والعوز المناعي. ومن بين مئات السموم الفطرية التي اكتشفت حتى الان استحوذ اثني عشر سما على اكبر قدر من الاهتمام نظراً إلى أثارها الوخيمة على صحة الإنسان ووجودها في الأغذية ( WHO ,2018).

السموم الفطرية هي الملوثات السامة التي تحدث بشكل طبيعي في الأطعمة والاعلاف ، يمكن ان يحدث التسمم بالسموم الفطرية للإنسان عن طريق الابتلاع أو استنشاق أو ملامسة الفطريات للجلد. يمكن أن تتأثر الفقاريات الأخرى أيضاً بالسموم الفطرية ، ويمكن أن يستهلكها الانسان مباشرة عن طريق الأغذية النباتية الملوثة أو عن طريق تناول أغذية مثل اللحوم والحليب والبيض لحيوانات سبق وأن تغذت على اعلاف ملوثة بها ( Maclachlan ,2011؛ Sun et al ,2017 ؛ Majeed et al ,2018 ).

تتميز الفطريات على النقيض من الكائنات الراقية بوجود مسارين للأبيض الأولي وثانوي يوجه الأولي للحصول على الطاقة اللازمة لنمو الخلايا وتكاثرها والمحافظة على الحياة ، أما الثانوي فانه يحدث عندما يبدأ الفطر بتكوين الابواغ ولا يحدث زيادة في كتلة الخلايا ( البنا ، 2001 ) .

أشارت العديد من الدراسات إلى إن عضو جسم الإنسان الذي يصله الدم أولاً أكثر عرضة للتسمم من بقية الأعضاء فضلاً عن أن كمية الدم الواصلة للعضو هي الأخرى لها دور في زيادة احتمال تعرض ذلك العضو للتسمم فالكبد والكلية هما أكثر الأعضاء تعرضاً للتسمم كونهما من الأعضاء التي تصلها كميات كبيرة من الدم ، كما إن الكبد من الأعضاء التي يصلها الدم أولاً ( الجميلي ، 2014 ) .

ذكر Keller واخرون ( 2005 ) أن بعض السموم الفطرية لها نشاطاً مثبطاً للكائنات الحية الدقيقة كالفطريات الأخرى والبكتيريا كما في البنسلين . وهناك فرق بين نواتج الأيض السامة التي تنتجها البكتيريا والتي تنتجها الفطريات فالسموم الفطرية وزنها الجزيئي منخفض على الرغم من إن بعضها قد يكون له تركيب كيميائي معقد أما السموم البكتيرية فهي عبارة عن البيبتيدات المتعددة والبروتين والدهون السكرية، باستثناء سموم بكتيريا *Pseudomonas cocovenens* التي تنتج مركبين على الأقل ذا وزن جزيئي منخفض وهما bonkreki acid و toxo flavin ( البنا ، 2001 ) .

معظم السموم الفطرية عبارة عن مركبات حلقية Aromatic hydrocarbon او أن تكون ذات سلاسل مفتوحة Aliphatic hydrocarbon يتراوح وزنها الجزيئي بين (100-697) دالتون، ولانخفاض وزنها الجزيئي تعد مستقرة أي مقاومة للظروف البيئية القاسية، فضلاً عن أنها غير قادرة على تحفيز جهاز المناعي لدى الإنسان أو الحيوان للإنتاج أجسام مضادة ضدها (إسماعيل، 2014) .

## 2-2 نبذة تاريخية عن السموم الفطرية

السموم الفطرية عرفت تاريخياً عن طريق حالات التسمم التي تعرض لها الإنسان عند تناوله العرايين السامة التي بسببها حصلت حالات وفاة ، ولم تكن المركبات التي أدت إلى التسمم معروفة حينها ، كذلك حدثت العديد من الكوارث عبر التاريخ نتيجة التسمم بالسموم الفطرية مثل ما يسمى بنار القديس انتوني Saint Anthonys fire وهو ناتج عن تناول حبوب ملوثة بالأجسام الحجرية لفطر *Claviceps purpurea* ( الاركوت ) ، وكذلك مرض *Stachybotrys spp* في أوكرانيا عام 1930 ، فضلاً عن ظهور أعراض مرض تسمم ونقص الكريات البيضاء Alimentary Toxic Aleukia في روسيا خلال الحرب العالمية الثانية نتيجة تناول أو التعرض لأحد السموم الثلاثية وهو T2-Toxin ( Yagen & Joffe ، 1978 ؛ إسماعيل ، 2014 ) .

حالات التسمم التي تصيب الحيوانات كثيرة جداً وذات تأثير كبير ومنها حادثة تسمم أفراخ الديك الرومي في إنكلترا عام 1960 وأدت الى موت مائة الف ( 100000 ) ديك رومي تقريباً في أحد مزارع التربية وفي أثناء مدة قليلة وهي واحدة من الكوارث التي تسببها السموم الفطرية إذ تبين أن السبب هو العلف الذي اعطي إلى الديك الرومي الحاوي على AFB1 الذي يفرزه الفطر *A. flavus* وكان هذا الأكتشاف بداية تأسيس علم جديد اسمه علم السموم الفطرية Mycotoxincology على المستوى الرسمي والعالمي ( نخيلان ، 2011 )

حدث في الهند عام 1974 تسمم حاد ل 397 شخصاً في 150 قرية وتوفي منهم 106 ، بسبب تغذيتهم على الذرة الحاوية على AFB1 بمقدار 6.25- 15.6 ملغم / كغ ، إذ قدر المتناول اليومي من 2 إلى 6 ملغم لكل شخص ولعدة أسابيع ( Krishnamachari *et al* , 1975 ؛ Busby and Wogan ، 1984 ). تشمل الأعراض السريرية الشائعة بشكل خاص المرتبطة بـ *A.flavus* التهاب الجيوب الأنفية الحبيبي المزمن والتهاب القرنية وداء الرشاشيات الجلدي والتهاب الجروح ( Hedayati *et al* , 2007 ) .

## 2-3 مخاطر السموم الفطرية

يمكن أن يتلوث الغذاء البشري بالسموم الفطرية في المراحل المختلفة في السلسلة الغذائية ( Shapira & Paster ، 2004 ) .

يذكر أن حوالي 25% من انتاج الحبوب السنوي في جميع أنحاء العالم ملوث بالسموم الفطرية ، من ناحية أخرى يواجه 815 مليون شخص حول العالم مشكلة الجوع وفقاً للتقرير الأخير لبرنامج الأغذية العالمي ( Pal ,2017 ) .

قدرت الخسائر الاقتصادية الناجمة عن انخفاض الإنتاجية بسبب السموم الفطرية عموماً بحوالي أكثر من مليار و500 مليون دولار أمريكي وبسبب ثلاث سموم فطرية فقط وهي الافلاتوكسين ، الفيومونيزين والسموم الثلاثية ( Bhatnagar *et al* ، 2006 ؛ Matny, 2020 ) .

تم تحديد المئات من السموم الفطرية من قبل الباحثين وأكثرها شيوعاً وضراً وأثارة للقلق على صحة الانسان والحيوانات الافلاتوكسين ، الباتولين ، الاوكراتوكسين ، الفيومينزين ، الزيرالينون ، النيفانول والدي أوكسي نيفانول . وتظهر السموم الفطرية نتيجة لتلوث المحاصيل الزراعية بالفطريات السامة الفارزة للسموم الفطرية قبل الحصاد وبعده وهي تنتقل خلال السلسلة الغذائية ( WHO,2018 ) .

استهلاك الأغذية الملوثة بالسموم الفطرية يسبب أمراضاً حادة أو مزمنة لدى البشر وكذلك الحيوانات . في اندونيسيا تسجل سنوياً حوالي 20 الف حالة وفاة بسرطان الكبد بسبب تناول أغذية ملوثة بالافلاتوكسين .

، وفي غانا وجدت سموم الافلاتوكسين حتى في كبد الأطفال المصابين بالكواتشيوركور ( مرض سوء التغذية فقر البروتين في أطفال افريقيا ) ، في الاتحاد الأوروبي هناك 3.2 مليون حالة تسمم بالسموم الفطرية سنويا و 50000 حالة يتم علاجها في كندا والولايات المتحدة بخوالي خمسة مليارات دولار (Matny, 2020).

تحدث الآثار المتأزرة عندما تكون التأثيرات المجمعمة أو المركبة للسموم الفطرية أكبر بكثير من التأثيرات الفردية لكل سم على انفراد ، درست الكثير من الحالات الأثار المتأزرة للسموم الفطرية ، على سبيل المثال ، فيومونيسين مع الافلاتوكسين B1 ، وDON مع فيومونيسين ، وأفلاتوكسين B1 أو B2 مع T-2 toxin ( Huff et al .,1988 ؛ Kubena et al .,1990 and Harvey et al .).

السموم الفطرية أكثر أنتشاراً وتثير قلقاً كبيراً في الأمدادات الغذائية البشرية ، إن توثيق المستويات المفرطة من الافلاتوكسين في الأغذية وفي عينات الدم من الأشخاص في البلدان النامية ، إلى جانب الأثار المتأزرة لالتهاب الكبد ، يؤكد أن هذه السموم هي سبب مهم للوفاة في أجزاء من أفريقيا وجنوب شرق اسيا ( Pitt , 2000 ) .

## 4-2 الافلاتوكسينات Aflatoxins

الافلاتوكسينات Aflatoxin هي مواد سامة تنتجها أنواع معينة من الفطريات التي توجد بشكل طبيعي في جميع أنحاء العالم ، يمكن أن تلوث المحاصيل الغذائية وتشكل تهديداً صحياً خطيراً على البشر والماشية ، يشكل الافلاتوكسين أيضاً عبئاً اقتصادياً كبيراً ، مما يتسبب في تدمير ما يقدر بنحو 25 % من المحاصيل الزراعية في العالم سنوياً ، توجد عدة أنواع من الافلاتوكسين ( 14 أو أكثر ) في الطبيعة ، لكن أربعة أنواع من الافلاتوكسين B1,B2,G1,G2 تشكل خطورة على البشر والحيوانات كما وجدت في جميع المحاصيل الزراعية الرئيسية ( WHO ، 2018 ) .

تعرف سموم الافلاتوكسين الأربعة الرئيسية المنتجة بشكل طبيعي بأسم الافلاتوكسين B1,B2,G1,G2 ، يشير "G" ، "B" إلى الألوان المتولدة الزرقاء والخضراء التي تنتجها هذه المركبات تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية على الواح كروماتوغرافيا رقيقة الطبقة TLC ، في حين يشير رقم 1 و2 إلى المركبات الرئيسية والثانوية على التتابع ( Pitt , 2000 ) .

يعد الافلاتوكسين من أشد السموم الفطرية سمية وتنتجها بعض أنواع الفطريات مثل *A. flavus* و *A. Niger* التي تنمو في التربة والنباتات ومتبقيات النباتات والحبوب وغيرها ، وأكثر محاصيل الحبوب عرضة للإصابة من أنواع *Aspergillus* هي الذرة والذرة الرفيعة والقمح والأرز ، وكذلك البذور الزيتية ، كما يمكن أن توجد السموم في حليب الحيوانات التي تتغذى على أعلاف ملوثة ، في شكل افلاتوكسين



M1 ، وقد ثبت أيضا أن الافلاتوكسين يحدث طفرات في الجينات أي أنها تضر بالحمض النووي ( Kumar et al , 2017 ; 2000 ، Pitt ؛ Rodricks et al , 1977 . )

يتم إنتاج *Aflatoxins* في الطبيعة بواسطة *A. flavus* و *A. parasiticus* ومن الأنواع الموصوفة مؤخراً *A. nomius* ، منذ اكتشاف الافلاتوكسين وجد أن *A. flavus* أكثر الفطريات المنقولة عن طريق الأغذية انتشاراً ، مما يؤكد أهميته الاقتصادية والطبية ، وكذلك حدوثه العالمي وسهولة التعرف عليه إذ أن *A. flavus* موجود على نطاق واسع ( Pitt & Klich, 1988 ) .

يتعرض 4.5 مليار شخص للافلاتوكسين في البلدان النامية عن طريق كميات من الأغذية غير الخاضعة للرقابة ، وكذلك من خزن الحبوب بشكل سيئ إلى زيادة تعرضها للإصابة بالفطريات الفارزة للسموم ، مما أدى بالعديد من الدول الى وضع لوائح تنظيمية على تراكيز الافلاتوكسين المسموح بها في الأغذية والاعلاف ، وتختلف هذه الحدود باختلاف المواد الغذائية والبلدان ، في العديد من الدول حددت التراكيز بين 1-20 ميكروغرام وبمتوسط 5 ميكروغرام لكل كيلو غرام بالنسبة ل AFB1 ، أما للأفلاتوكسين الكلي 0-35 ميكروغرام وبمتوسط 10 ميكروغرام لكل كيلو غرام ، أما الولايات المتحدة فحددت 20 ميكروغرام لكل كيلو غرام لمجموع الافلاتوكسين في جميع المواد الغذائية ( Van Egmond and Jonker, 2004 ) .

من الضروري ذكر أن تأثير هذه السموم لا يظهر بسرعة وانما لها تأثير تراكمي يظهر بعد عشرة الى عشرين سنة من تناول الأغذية الملوثة بها وتمثل هذه السموم كارثة صحية على مستوى العالم لان الجهاز المناعي لا يستحث بوجودها فهي ذات أوزان جزيئية منخفضة يتراوح بين ( 100-697 ) دالتون لذلك لا تحفز الجهاز المناعي لتكوين الاجسام المضادة ومما يزيد الوضع سوءاً وانه لا توجد علاجات دوائية للحد من تأثيرها ( سعيد ومشعل ، 2016 ؛ عفيفي ، 2000 ) ، عندما تكون الظروف مناسبة لها سوف تنتج كميات اكبر من السموم الفطرية وأي مادة تصنع من المواد الأولية الملوثة بالفطريات سوف تحوي على نسب من السموم لا يستهان بها كون هذه المركبات لا تتحطم بسهولة أثناء عمليات التصنيع أو التعليب ( مطني ، 2014 ) .

تنتشر الأبواغ الفطرية عند تعرضها للحرارة واغلب السموم الفطرية تتحول إلى أكثر سمية عند ارتفاع درجات الحرارة ( Steven & Celso ، 2005 ؛ Marsellino et al , 2001 ؛ تيمور واخرون و 2010 ) .

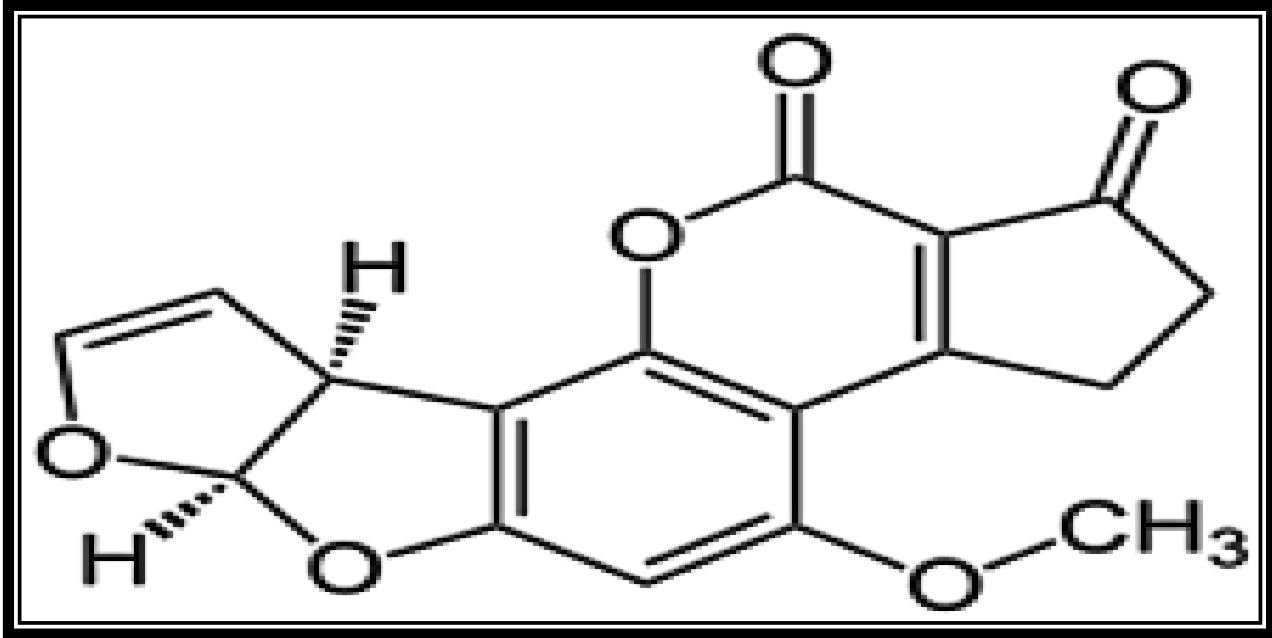
## 5-2 التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات

ذكر (1987) Palmgren and Hayes أن التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات يتكون بصورة عامة من حلقتين سداسيتين في المركز تلتحم أحدهما بحلقتين خماسيتين في حين أن الحلقة السداسية الأخرى في حالة التحامها بحلقة خماسية فانها تكون الافلاتوكسين B1 او B2 ، أو تلتحم بحلقة الاكتون السداسية مكونة الافلاتوكسين G1 او G2 (1-2) . إن ما يميز مجموعة الافلاتوكسين B هو وجود حلقة Cyclopentane ، في حين مجموعة الافلاتوكسين G لديها حلقة لاكتون ( Gourama and Bullerman ,1995 ) .

إن اختلاف بين B1 و B2 وكذلك G1 و G2 هو وجود الاصرة المزدوجة في نهاية حلقة Furan الخماسية للأفلاتوكسين B1 و G1 وانعدامها في الافلاتوكسين B2 و G2 ( Goldblatt and Stoloff ) . ( , 1983 ) .

الافلاتوكسين M1 و M2 هما مشتقان من الافلاتوكسين B1 و B2 على التوالي ، ويفرق AFM عن AFB بوجود مجموعة الهيدروكسيل ( OH ) في حلقة الفيرون .

تم تحديد الصيغة الجزيئية لسلم الافلاتوكسين B1 من قبل ( Asao et al , 1963 ) . بينما الصيغة الجزيئية لمركبات الافلاتوكسين B2 و G2 حددها ( Chang et al , 1963 )



الشكل ( 1-2 ) التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات

## 6-2 جنس *Aspergillus*

ينتمي هذا الجنس إلى مجموعة الفطريات الخيطية Filamentous fungi ، وذات انتشار واسع في الطبيعة وخاصة في المناطق المدارية ، وأغلب الأنواع التابعة لهذا الجنس تكون رمية المعيشة Saprophytes (Pitt,1994) . وقد أكد (Batista et al ,2008) بان هناك 200 نوع تابع لهذا الجنس فبعضها ما تكون انتهازية Opportuniste ممرضة للإنسان والحيوان كما في نوع *A.fumigatus* ، في حين البعض الآخر منها تفرز السموم الاقلام مثل *A.flavus* و *A. parasitgus* و *A.nomius* و *A.niger* ، اما النوعين *A.oryzae* و *A.soja* فقد استخدمت في بعض الدول الاسيوية في عمليات التخمر أنواع هذا الجنس تختلف عن بعضها البعض من حيث قطر المستعمرة ولون الكونيديات والخيوط ولون ظهر المستعمرة ، بالإضافة الى الاختلافات المجهرية مثل حجم وشكل الحويصلات Vesicles والميتيولات Metulae والفاليديات Phialides والكونيديات Conidias (Jernejc & Cimerman,2001) . تنتج الكونيديات على شكل سلاسل أو أعمدة تنشأ من تركيب مركزي بترتيب شعاعي ، إذ تكون قالباً أو نموذجاً يشبه مرشة الماء التي تدعى بالاتيانية (Aspergillum) ومنها اشتق اسم جنس *Aspergillus* (Bennett & Kwon- Chung,1992).

## 7-2 الخصائص التصنيفية والتشخيصية لفطر *Aspergillus*

صنف (Raper and Fennell 1965) الفطر *Aspergillus* ضمن شبه العائلة *Moniliales* التابعة إلى شبه الرتبة *Moniliales* , تتكاثر معظم هذه الفطريات لاجنسيا فقط , إلا أن هناك بعض الأنواع تتكاثر جنسيا إذ تسلك سلوك الفطريات الكيسية , يتكوين سبورات كيسية (Ascospores) منتظمة داخل أكياس (Asci) وتكون الأخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل (Cleistotheceum Pitt and Hocking ,1997). تكون مستعمرات الفطر *Aspergillus* ذات ألوان مختلفة تختلف بحسب لون الأبواغ (Conidia) منها الأبيض , البني , الأخضر , الوردي , الأزرق , التبني , الأسمر المائل إلى الصفرة أو الأسود (Kown-Chung and Benett,1992).

يتميز الغزل الفطري بنموه الغزير , وكثرة تفرعاته , وكونه مقسما إلى خلايا تحتوي كل خلية على عدد من الانوية تنتشر في الساييتوبلازم الذي يحيط بفجوة عصارية ويوجد الغذاء المخزون داخل الخلية على هيئة حبيبات زيتية , وتختلف الابواغ باختلاف أنواعه فمنه الأبيض , الأخضر , الأسود والأصفر(ابوهيلة ,1987), الحامل الكونيدي (Conidiophore) ينشأ عموديا من الخلية القدمية (Foot cell) في الخيط الخضري ويكون الحامل الكونيدي غير متفرع وغير مقسم على الأغلب .في معظم الأنواع يكون قطر

الحوامل الكونيدية اكبر من قطر الخيوط الفطرية , وجدار الحامل الكونيدي يكون اسماك من جدار الخيط الفطري . وتكون الحوامل الكونيدية ملساء في أغلب الأنواع الممرضة , ماعدا *A.flavus* , *A.oryza* و *A. avenaceus* , تنتج حوامل كونيدية خشنة. وتتسع قمة الحامل الكونيدي ليكوّن الحوصلة (Vesicle) , التي تكون كروية , شبه كروية , دورقية الشكل أو صولجانية Clavate وينشأ من سطحها التراكيب القارورية Phialides التي تكون إما بصف واحد من الفياليد أو بصفين . تغطي التراكيب القارورية سطح الحوصلة بالكامل وفي بعض العزلات تغطي التراكيب القارورية ثلاثة أرباع سطح الحوصلة فقط , ويلاحظ وجود صف واحد من التراكيب القارورية حديثة التكوين يتضاعف بتقدم عمر الحوصلة (Raper and Fennell, 1965), وفي الأنواع الثنائية الصف Biseriate تكوّن الصفوف الاولى من الخلايا التراكيب القارورية الاولى عادة اثنين إلى ثلاثة من التراكيب القارورية الثانوية . يتراوح طول التراكيب القارورية Phialides بين 20-30 مايكروميتر وسمكها 5-10 مايكروميتر , وهي أحادية أو متعددة الأنوية , وتنشأ الكونيدات عند قمتها بتعاقب قاعدي Basipetal بشكل سلسلة وتكون الأقدم في القمة والأحدث في القاعدة . وقد تكون الكونيدة ملساء كما في الفطر *A.terreus* أو مشوكة كما في الفطر *A.niger* . أغلب الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* تكون الكونيديا فيها كروية إلى إهليلجية الشكل , نافرة جدا للماء , تحمل بالهواء بسهولة بعد نضجها , وتتباين ألوانها من الغامقة إلى الفاتحة (Kown-Chung and Bennett, 1992) .

يطلق على الحوصلة (Vesicle) و التراكيب القارورية Phialides وسلاسل الكونيدات (Conidial chains) بالرأس الكونيدي (Conidial head) . إذ يتحدد شكل الرؤوس الكونيدية بشكل الحوصلة وترتيب التراكيب القارورية عليها , أما لونها فيتحدد بلون الكونيدات التي تحملها , ويعد كل من لون وشكل وحجم الرؤوس الكونيدية خصائص تصنيفية للأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* (Raper and Fennell, 1965).

هناك أنواع قليلة من جنس *Aspergillus* تنتج في طورها الجنسي أجساما ثمرية كروية (Cleistothece) وتختلف الأجسام الثمرية في الحجم واللون من نوع إلى آخر , ويتكون الجسم الثمري من طبقة رقيقة من الخلايا التي تكون مسطحة عادة , وتدعى هذه الطبقة بجدار الجسم الثمري , يضم في داخله الكثير من الأكياس البوغية يحوي كل منها ثمانية ابواغ كيسية Ascospores (الشكري, 1991) . وجد أن عزلات من الفطريات *A.niger* , *A.flavus* , *A.oryza* , *A.ochraceus* و *A.candidus* قادرة على تكوين تراكيب قاسية كبيرة نسبيا تدعى الأجسام الحجرية (Sclerotia) . وتتغير الأجسام الحجرية في الشكل والحجم واللون , لكنها جميعا تتكون من خلايا شبه برنكيميائية سميكة الجدران , وتتميز أنواع الفطر *Aspergillus* بقدرتها على النمو بسرعة وتحليل المواد العضوية المتوفرة في التربة حيث

تعزل بصورة متكررة من التربة وتتكون السبورات اللاجنسية بغزارة التي تقاوم الضغوط البيئية (Atlas and Bartha, 1981).

يتبع التطور الكامل لصنف الفطريات الكيسية ( Ascomycetes ) ورتبة ( Eurotiales ) بحسب المفتاح التصنيفي ، وفي ادناه الموقع التصنيفي الخاص لجنس *Aspergillus* ( Bommakant & Alexopules *et al*, 1996 ; Waliyar, 2002 ).

Kingdom : Eumycota ( fungi)

Division : Ascomycota

Class : Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Trichocornaceae

Genus : *Aspergillus*

## 8-2 الفطريات المرافقة للحوم والطازجة والمعلبة

تعد اللحوم من أهم المنتجات الرئيسية والمهمة في حياة الانسان منذ القدم وتعتبر مصدر البروتين الحيواني عالي القيمة الحيوية لأحتوائه على الاحماض الامينية الضرورية لديمومة الحياة ، ونظرا للدور المهم الذي تلعبه اللحوم في حياتنا اليومية تم الحفاظ على اللحوم بطرق مختلفة ومميزة ولهذا ساهم في ازدهار الصناعة والتجارة العالمية بصورة عامة وهذا ساهم كثيرا فأصبح بالإمكان ذبح الحيوان في دولة معينة واستهلاكه في دولة أخرى ( Bekker *et al*, 2011 ) لذلك كان من المهم مراقبة هذه اللحوم لكثرة استخدامها من الناس ولا سيما الشارع العراقي إذ تعد الفطريات من أهم العوامل الميكروبية بأنواعها بما فيها الخمائر والبكتريا واعفان الفطريات والفيروسات مسببه العديد من الامراض الى الإنسان . وتحتوي اللحوم بصورة عامة على البروتين والاحماض الامينية زيادة على المعادن المهمة والفيتامينات ومنها B-Complex وتعتمد القيمة الغذائية للحوم على محتواها من هذه المكونات المهمة ويعتمد ذلك على عمر الحيوان ، ونوع القطيعة ، محتوى الدهن باللحوم ( Van, 2011 ).

تمتاز اللحوم بكونها غنية بمكونات مهمة للإنسان وأيضا تعتبر سريعة التلف ولهذا فأنها تتعرض الى تغيرات طبيعية الكيمائية والبايولوجية والتي يكون تأثيرها بشكل رئيسي على مدى صلاحية هذه اللحوم للاستهلاك البشري ، ويمكن المحافظة على اللحوم من هذه التأثيرات الطبيعية عن طريق التجميد التجميد اللحوم ( Polkinghome & Thompson, 2010 ).

إن طريقة التجميد لا تقضي على الميكروبات الموجودة بصورة عامة ، إذ أن النمو الميكروبي يتوقف بصورة عامة بدرجة (- 10 م ) بالنسبة للبكتريا ، أما بالنسبة للفطريات فيمكنها أن تنمو على منتجات اللحوم بصورة واضحة مخلفة بذلك بقع مختلفة على منتجات اللحوم وتزداد بصورة خاصة إذا ارتفعت درجة الحرارة أعلى من (-11 م ) وهذا يؤدي الى تغير ملحوظ في لون وقوام اللحم إذ أن الدرجة الحرارية المثلى لحفظ اللحوم (-18 م ) ( Kuchida & Okada, 2012 ) .

توفر اللحوم ومنتجاتها وسط نمو ممتاز لمجموعة متنوعة من الكائنات الدقيقة ومنها الفطريات ، وبعضها مسببات الامراض ( Jay et al , 2005 ) . قد يحدث تلوث منتجات اللحوم بالعفن في المراحل المختلفة التي يتم فيها تحضير المنتجات ، فقد يحدث أثناء ذبح الحيوانات في ظل ظروف صحية سيئة باستخدام المياه والمعدات والوانى الملوثة أو أثناء المعالجة بإضافة إضافات للحوم ملوثة بأبواغ العفن أو أثناء التعبئة . المناولة والنقل والتخزين ( Morshdy et al , 2015 ) .

ينظر تلوث اللحوم بمختلف أنواع العفن خطرا حقيقيا لانه يؤثر على جودة منتجات اللحوم هذه عن طريق زيادة احتمالية فسادها وتدهورها . الجانب الأكثر أهمية العفن في الطعام هو تكوين السموم الفطرية . أكثر أنواع السموم الفطرية شيوعا والأكثر خطورة هي الافلاتوكسينات ، وهي المستقلبات الثانوية السامة الرئيسية لبعض أنواع الرشاشيات مثل *A. flavus* و *A. parasiticus* و *A. Nomius* ( Alcaid – Molina ، 2009 ؛ Morshdy et al , 2015 )

يمكن أن يكون تلوث منتجات اللحوم بالافلاتوكسين قد نشأ أما من الأنسجة الحيوانية التي كانت تتغذى سابقا على أعلاف ملوثة بالافلاتوكسين أو عن طريق استخدام المكونات الملوثة بالافلاتوكسين ، على سبيل المثال الحبوب ( Zohri et al, 1995 ) .

جذبت مسألة سمية الفطريات الانتباه في العقود الأخيرة ، خاصة في مجالات الزراعة وصناعة الأغذية ، غالبا ما تلوث الفطريات الخيطية المجهريه المنتجات النباتية والحيوانية ، لتصبح مصدرا للأمراض في الانسان والحيوانات ( Laciak & Lacia – kova , 1994 ) .

سبب الاهتمام المتزايد هو قدرة الفطريات على انتاج مركبات الايض الثانوية – السموم الفطرية – التي لها آثار ضارة مثل التسرطن والطفرات والاستقرار الحراري العالي . ان ظروف البيئة في غرف التصنيع والمخازن والثلاجات والمحلات التجارية مناسبة جدا لتطويع الفطريات داخل المنتجات ، ولكن في كثير من الأحيان على سطح أنواع مختلفة من اللحوم ( Jesenska , 1987 ) .

وفقا (Hanssen, 1995) فإن تلف الطعام الناجم عن Bacteria والخمائر والعفن هو عملية معقدة يتم ردها بواسطة عوامل مختلفة ؛ من بينها تكوين الطعام والظروف البيئية المعينة ذات أهمية كبيرة ، أذا

كانت هذه الظروف مناسبة لجميع المجموعات الثلاث ، فغالبا ما تنمو البكتريا بسرعة أكبر من الخمائر والخمائر ستتنمو بسرعة أكبر من الفطريات ( Reiss ، 1986 ) .

يتم نقل السموم الفطرية إلى البشر عن طريق استهلاك اللحوم التي يتم الحصول عليها من التي تتغذى على الأعلاف الملوثة والتوابل الملوثة المستخدمة أثناء معالجة هذه اللحوم. يعتقد أن السموم الفطرية مسؤولة عن المتلازمات المرضية المختلفة لدى البشر. على سبيل المثال ، يرتبط الأوكرااتوكسين باعتلال الكلية المتوطن في البلقان ويرتبط فومونيزين B1 بسرطان المريء ( Stoev, 2017؛ Egmond *et al* ,2007).

بعد وجود السموم الفطرية في المحاصيل الزراعية والمنتجات الحيوانية مشكلة خطيرة وتتطلب بذل جهود لحماية صحة المستهلكين على مستوى العالم. ومع ذلك ، فإن التحدي يكمن في أن العديد من البلدان النامية والدول التي تمر بمرحلة انتقالية لا تدرك انتشار السموم الفطرية في المنتجات الحيوانية في حين أن معظمها ليس لديها ممارسات صارمة للرصد والمراقبة فيما يتعلق بسلامة المنتجات الحيوانية. تركز ممارسات إدارة الثروة الحيوانية بشكل أساسي على زيادة الإنتاج والمحصول دون مراعاة كبيرة لسلامة المنتجات الحيوانية. منذ معرفة العلاقة بين الأفلاتوكسين والاضطرابات الكبدية البشرية ، أظهرت الأبحاث أن الأفلاتوكسين هو مشكلة عالمية تؤثر على صحة الحيوان والإنسان ( Coopock *et al* , 2018 ) .

ترتبط المخلفات السامة في المنتجات الحيوانية بشكل أساسي باستهلاك الأعلاف أو الأعلاف الملوثة. يتم الحصول على المنتجات المشتقة من الحيوانات ، أي اللحوم والحليب والبيض بعد تعرض المواد الغذائية المستهلكة إلى تحولات الأنزيمية والميكروبية التي تؤدي إلى إنتاج فطريات قابلة للامتصاص في الأمعاء. خلال هذه العملية ، يتم التخلص من العناصر الغذائية والأحماض الدهنية المتطايرة (السامة والمفيدة) في مجرى الدم للحيوان ويمكن إفرازها لاحقا عن طريق البول والبراز. وتبقى السموم التي لا يتم إخراجها عموما كبقايا في الأعضاء والعضلات الصالحة للأكل. على الرغم من أنه في بعض الحالات ، قد لا تؤثر المستويات المنخفضة من تلوث السموم الفطرية على نمو الحيوان أو أدائه ، ولكن قد تنتقل إلى منتجات سائلة وأنسجة حيوانية ( Fowler *et al* , 2015 ) . على سبيل المثال ، لم يتأثر إنتاج البيض ووزنه في الطيور البياضة التي تغذت على 25-100 ميكروغرام من AF / kg من العلف ، ومع ذلك كانت هناك بقايا في البيض ( Ali and Anwer ) ، 2009.

هذا يشير إلى ضرورة تقليل مستوى السموم الفطرية في الأعلاف وذلك لتقليل بقاياها في اللحوم والحليب والبيض إلى "مستوى أقل خطورة". لسوء الحظ ، في الوقت الحاضر ، لا يوجد تنظيم قانوني لـ AFB1 في المنتجات المشتقة من الثروة الحيوانية ، مثل الكبد واللحوم (المفوضية الأوروبية، 2010).

تشكل بقايا السموم الفطرية خطراً على الأمن الغذائي والسلامة الغذائية لأن زيادة المخلفات في المنتجات الحيوانية تسبب خسائر اقتصادية بوساطة رفض الحدود في السوق العالمية والمحلية مما يؤدي في نهاية المطاف إلى تفاقم انعدام الأمن في المغذيات الكبيرة والجزئية خاصة في البلدان النامية. إلى جانب ذلك ، هناك مخاوف أخرى بشأن السموم الفطرية وهي أنه لا يمكن تدميرها بسهولة عن طريق درجة الحرارة أو العلاجات الكيميائية أو الفيزيائية. على الرغم من أن تطبيق المعالجات الحرارية مثل البسترة أو درجة الحرارة المرتفعة للغاية قد يؤدي إلى تدهور بعض الفطريات AFM1 ( Jawiad et al , 2015 ) ، إلا أن البقايا مستقرة بما يكفي للبقاء على قيد الحياة في الحليب الخام والمعالج (Mohmmadi,2011) والبيض المسلوق ( Ali and Anwer ، 2009).

في البلدان المتقدمة تكنولوجياً، يتم فحص الأعلاف باستمرار بحثاً عن السموم الفطرية وذلك لحماية صحة الحيوان وتحسين الإنتاجية وكذلك دخل المزارعين ( Gambarcorta ، 2019 ) . يمارس استخدام إضافات الأعلاف لامتناس المواد السامة والسموم على نطاق واسع في صناعة علف الماشية. تم استخدام الخميرة ومضافات الأعلاف النباتية والإنزيمات والزيوت الأساسية وما إلى ذلك لتحسين إنتاجية الحيوانية والهضم وإنتاجية المنتج ولأغراض علاجية في جميع أنحاء العالم. لم يتم إيلاء هذا الاهتمام على مستوى العالم فيما يتعلق بالحد من السموم الفطرية في الحيوانات ومنتجاتها. تم استخدام مواد ربط السموم من شركات مثل Biomin® و Alltech® في الأعلاف للتخفيف من آثار السموم الفطرية. يستخدم المزارعون المواد الرابطة أو المواد الماصة التي ترتبط بالسموم الفطرية وتمنع امتصاصها بوساطة الأمعاء وفي الدورة الدموية، وبالتالي تخفيف تأثير السموم الفطرية في الحيوانات. وتستخدم هذه المنتجات المضادة للسموم الفطرية لإزالة السموم من الحبوب الملوثة بالسموم الفطرية؛ ومع ذلك، ليست كل المنتجات فعالة بكفاءة. على سبيل المثال، تم العثور على حوالي 50٪ من عينات الحليب الملوثة بالحرارة الفائقة تحتوي على تركيز AF أكثر من 0.05 ميكروغرام / لتر ( Bayezi et al , 2019 ) .

يعد الأمن الغذائي هو أساس صحة الإنسان إذ أصبحت سلامة الأغذية من القضايا الاستراتيجية الرئيسية في العالم التي نالت اهتماماً عالمياً كبيراً ( Ayelign et al , 2020 ).

لكي يتحقق الأمن الغذائي بشكل جيد وفعال يجب أن تتوفر الخصائص الغذائية التي تشمل توافر الغذاء ، والوصول إلى الغذاء ، واستخدام الغذاء ، والاستقرار الغذائي عند مستويات تسمح لجميع الناس بالوصول المادي والاقتصادي إلى طعام ميسور التكلفة وآمن وصحي. عندما تنعدم أو تضعف إحدى هذه الخصائص الأربع ، فإن المجتمع يصبح غير آمن غذائياً ، وضعت أغلب الدول قوانين ولوائح لتزويد الناس بالغذاء الأمن تبعاً لهذه القوانين يجب أن يكون الغذاء غير سام وغير ضار ولا يسبب خطراً على صحة الإنسان ( Udomkun et al , 2017 ) .



ازدادت شكاوى الأمن الغذائي والسلامة على مستوى العالم في العقدين الماضيين. تطرح هذه الزيادات باستمرار أسئلة حول ما إذا كانت هذه الأنظمة التنظيمية والرقابية الحالية فعالة. في المدة الأخيرة ، وضعت منظمة الصحة العالمية (WHO) وهيئة الدستور الغذائي (CAC) ومنظمات أخرى حدوداً جديدة لسلامة تجارة الاغذية الدولية ، للظروف البيئية والمعيشية في الدول المختلفة تأثير كبير على سلامة الاغذية وجودتها فضلاً عن تطور الدول الاقتصادي ، وفقاً للتغيرات الاجتماعية والاقتصادية السريعة في العقد الماضي ، في جميع دول العالم ، والتي تتمتع بارتفاع اقتصادي مزدهر ، وقد تم اخضاع معالجة الاغذية وأنماط الاستهلاك لتغييرات كثيرة ، مما أدى إلى زيادة عدد حالات مشاكل الامن الغذائي. واحدة من هذه المشاكل ، الموجودة في جميع أنحاء العالم ، تنتج عن طريق السموم الفطرية ( Liu et al ,2012 ).

تعد السموم الفطرية من أهم العوامل المساهمة في تلوث الغذاء ، خاصة في البلدان النامية ، والتي أصبحت تمثل تحدياً متكرراً لسلامة الغذاء ( Udomkun et al , 2017 ). نتيجة لذلك قد حفزت مخاوف جدية من قبل المستهلكين والمتخصصين في الصحة والتغذية حول وجود السموم الفطرية في الطعام . أن تلوث الطعام بالفطريات والسموم الفطرية يؤدي إلى فقدانه الجودة والقيمة الغذائية (Magen et al ,2007).

فضلاً عن ذلك فإن التلوث بالسموم الفطرية يقلل من جودة المنتج ويقلل من قيم التصدير ، مما قد يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة للبلدان المنتجة، يقلل التلوث بالسموم الفطرية بشكل مباشر من توافر الغذاء وله مساهمته الخاصة في الجوع وسوء التغذية (Udomkun et al ,2017). أن الفشل في تنفيذ الممارسات الزراعية الجيدة ، وممارسات ما بعد الحصاد السيئة ، والاصابة بالحشرات هي عوامل تؤثر على تلوث السموم الفطرية (Wagacha ,2010)

يمكن التخفيف من تلوث السموم الفطرية إلى مستويات مقبولة بوساطة الممارسات الزراعية الجيدة ، والتحكم البيولوجي ، والفرز ، والمعالجات الاشعاعية الكهرومغناطيسية ، وتبخير الأوزون ، وعوامل المكافحة الكيميائية ، وممارسات التصنيع الجيدة ، وغيرها من الطرق المستخدمة للتقليل من مخاطر التلوث بالسموم الفطرية ( Pandey et al .,2019 ) .

تعد سلامة الاغذية وأمنها من الاحتياجات الاساسية للمستهلكين، الهدف الرئيسي للمنظمات العالمية هو اتخاذ إجراءات لضمان سلامة الاغذية وأمنها فضلاً عن إلى الغذاء يمكن أن يتعرض الإنسان إلى السموم الفطرية بوساطة تناول الماء ، وفي البيئة بوساطة الاستنشاق وعن طريق الجلد باختراقه أي شيء ملوث بها ، يعد استهلاك الاطعمة الملوثة بالسموم الفطرية ، وخاصة الحبوب والاعذية من أصل حيواني ، أهم طرق التعرض وأكثرها شيوعاً إذ يمكن بالفعل نقل السموم الفطرية الموجودة في علف الحيوانات الى الانسجة الحيوانية ، وخاصة الكبد والكلى ( Wang ,2018 ) .

تساهم السموم الفطرية بشكل كبير في فقد الغذاء في البلدان النامية وفقاً لمنظمة الأغذية والزراعة (FAO) ، يُفقد حوالي ثلث إجمالي الغذاء ، أي ما مجموعه 1.3 مليار طن سنوياً. كما تشير التقديرات إلى أن ما يقرب من خمسة مليارات شخص في جميع أنحاء العالم يتعرضون للسموم الفطرية ، مثل الافلاتوكسين، ومع ذلك ، كان من الصعب للغاية تطوير صيغ لتقييم الأثر الاقتصادي العالمي لوجود السموم الفطرية في الغذاء (Montanha *et al.* , 2018) (Pizzolato *et al.* , 2018) السموم الفطرية هي مشكلة صحية عامة عالمية ، حيث تشكل التوابل والمحاصيل واللحوم ومنتجات الألبان المصادر الرئيسية للسموم الفطرية (Darwish *et al.* , 2014) .

## 9-2 التشخيص الجزيئي للفطريات

اشارت جملة من الدراسات إلى أن الصفات المظهرية لا يمكن الاعتماد عليها في تشخيص الفطريات لعدة أسباب هي: 1-تحتاج إلى خبرة عالية في تصنيف الفطريات وعلى وجه الخصوص مع الأنواع أو السلالات القريبة الشبه. 2- وان اللون وأشكال وأحجام المستعمرات الفطرية او الأبواغ تتأثر بالعوامل البيئية. 3- تحتاج الى جهد ووقت كبيرين ( Stanis *et al.* ,2016) .

لذا استخدمت تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR ) Polymerase chain reaction في تضخيم منطقة معينة من الحمض النووي للفطر ، ثم ترتب القطع بشكل متسلسل يليها تحليل التسلسل ( Al-Sanae *et al.* , 2016) .

تتلخص الطريقة بتنقية الحامض النووي للفطر المراد تشخيصه ، وبأختيار باديء مناسب وبأستعمال تقنية PCR يتم تشخيص الفطر . للتمييز بين أنواع *Aspergillus* تستخدم منطقة Internal transcript spacer ( ITS4-ITA1 ) الموجودة ضمن rDNA ، ومنطقة S28 YRNA ( D1-D2 ) ( Varga *et al.* , 2011) .

تعد المنطقة البيئية ITS في الحمض النووي الأكثر ملائمة في تشخيص الأنواع الفطرية ( Cadez *et al.* , 2002) . فهي لا تخضع للقيود التطورية لذا فهي تبقى محافظة الى درجة كبيرة ولهذا تستعمل في التمييز بين الأنواع ضمن الجنس الواحد ( Bakkeren *et al.* , 2000) . إن تعاقبات المناطق البيئية ITS للعزلات التابعة للنوع الواحد متشابهة ، ولذلك فهي طريقة أساسية للتمييز بين الأنواع المختلفة ( Schoch *et al.* , 2012) .

أشار (Hernandez *et al.* ,2013) إلى أن أهم متطلبات ال PCR متمثلة ب انزيم البلمرة DNA Polymerase ، البادئ The Primer ، المحلول المنظم الدارىء PCR Buffer ، النيوكليوسيدات منقوصة الأوكسجين ثلاثية الفوسفات ( dNTPS ) Deoxy Nucleoiside Triphosphate ، قالب الدنا

Wu *et al* , (1991) ذكر (1991) ، جهاز البلمرة الحراري Thermocycler . DNA Template Primer تضاعف PCR لل DNA وهي : مرحلة المسخ Denaturation ، مرحلة التهام الباديء annealing ومرحلة الاستطالة Extension . يبلغ حجم جينوم A.flavus حوالي 37 ميغا بايت على ثمانية كروموسومات ، وهو يشفر أكثر من 12000 جين وظيفي ( Chang and Ehrlich , 2010 )

## 10-2 النباتات الطبية

يعرف النبات الذي يستخدم طبيا بالنبات الطبي ( Medicinal plant ) حيث يحتوي على المواد الفعالة ( Active constituents ) التي قد تكون مادة واحدة أو أكثر . تتواجد في أحد أجزاء أو جميعها كما تتفاوت نسبتها اعتمادا على الأجزاء النباتية التي تحتويها فقد تتركز في جزء خاص من النبات بحيث يشكل مصدرا ل احد المواد الفعالة فيجمع للاستغلال الاقتصادي . وتجدر الإشارة إلى أن تركيز المواد الفعالة يتأثر بعمر النبات وبوقت جمع الأجزاء النباتية خلال النهار ( حمزة , 2006 ) .

تتواجد المواد الفعالة في النبات بشكل نواتج ابيضية أو بشكل مكونات أساسية تدخل في تركيبه , وهي ذات تأثيرات طبية سواء كانت بصورة نقية بعد أستخلاصها او بصورة خام الا ان تأثيرها في الكائنات الحية يختلف فمنها ما هو مفيد ومغذي ومنها ما هو سام وقاتل ولكن عندما تؤخذ بكميات مناسبة وتحت اشراف مختصين قد يكون لهذه المواد السامة وغير السامة تأثيرات علاجية كثيرة ( ستاري و جيراسيك , 1986 ) .

استخدمت النباتات على نطاق واسع في الطب الشعبي منذ زمن سحيق من أجل علاج ومنع الامراض المختلفة من جيل إلى آخر (Horn وVargas ، 2008 ، Street وPrinslo ، 2013) على الرغم من التقدم الذي حصل في الطب الحديث ، لا يزال العديد من السكان في البلدان النامية يعتمدون على الطب التقليدي للوقاية من الامراض المختلفة وعلاجها. ويرجع ذلك إلى المعتقدات الثقافية وانخفاض التكلفة والفعالية (Costa -Moura *et al* ,2012 ) وفقا لمنظمة الصحة العالمية ، لا يزال حوالي 80% من سكان العالم يعتمدون على الطب التقليدي للرعاية الصحية الأولية (Parkash *et al* , 2020) أحدثت الدراسات الحديثة أيضا اهتماما متجددا باستخدام النباتات ومركباتها كمغذيات في هذا الصدد في كل من البلدان المتقدمة والنامية (Galvano *et al* ,2001 ؛ Anjorin *et al* , 2013 ؛ Dikhobal *et al* , 2019).

ترجع ميزة استخدام النباتات لاكتشاف الأدوية إلى وفرتها في الطبيعة وتوزيعها الواسع جغرافياً، إذ تم تصنيع عدد كبير من الادوية من النباتات بناء على استخدامها في الطب التقليدي ( Wyk Van *et al* ، 1997 ، Dias *et al* ,2012) ، على الرغم من وجود النباتات بكثرة في الطبيعة إلا أنه توجد دراسات قليلة جدا حول استغلال مكوناتها لازالة السموم الفطرية ( Stoev Stoev *et al* ,2019 )، ومن ثم

تستلزم إجراء دراسات عن مختلف النباتات التي تعرض أنشطة مضادة للفطريات، تنتج النباتات نواتج ثانوية كآلية دفاع ضد الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض والحشرات والظروف البيئية المعاكسة، تُعرف هذه المستقلبات بالمواد الكيميائية النباتية وهي غير مغذية (Prakash *et al*, 2020). التي يمكنها حماية البشر والحيوانات من بعض الأمراض التي تسببها الكائنات الدقيقة أو السموم المرتبطة بها بسبب الخصائص المضادة للميكروبات التي; (Park, 2018; Blanco-Redondo, 2019).

الفطريات هي أكثر العوامل الوقائية الكيميائية الواعدة لاكتشاف الادوية وتطويرها في المستقبل (Alabi *et al*, 2011). هناك مجموعات رئيسة مختلفة من المركبات الكيميائية النباتية التي تم اكتشافها حتى الان وتختلف وفقاً لتركيبها الكيميائي (Das *et al*, 2020).

تشمل هذه المجموعات الرئيسية المركبات الفينولية، والفلافونويد، والفيستول، والكاروتينات، والترينويدات، والقلويدات، والصابونيات، والاحماض العطرية، والجلوكوزينولات، والكاروتينات، والزيوت الاساسية، والكلوروفيل والاحماض العضوية وكذلك مثبطات البروتياز (Proteases inhibitors) (Loi *et al*, 2020؛ 2019، Medina -Meza and Adebo؛ Bhattachar 2011). قد تعمل هذه المركبات بشكل مباشر أو غير مباشر للحماية من الامراض أو مسببات الامراض، لأنها تحتوي على مضادات الجراثيم، ومضادات الجينات، ومضادة للسرطان، ومضادة للتكاثر، ومضادة للالتهابات وكذلك خصائص مضادة للأكسدة (Velu *et al*, 2018، Makhafola *et al*, 2017).

وقد قسمت هذه المواد الفعالة على أساس صفاتها الكيميائية والطبيعية الى مايلي :

## 1. الكلايكوسيدات Glycosides

هي مركبات عضوية صلبة متبلورة عديمة اللون غير قابلة للتطاير، مرة المذاق، تذوب في الماء والكحول، ينتج عن تحللها بواسطة الاحماض أو الانزيمات نوع أو اكثر من السكريات غالباً ماتكزن سكر الكلوكوز فضلاً عن مادة او اكثر غير سكرية تعرف بـ Aglycon، التي قد يختلف تركيبها الكيميائي مما يؤدي الى اختلاف الخواص الكيميائية والطبيعية للكلايكوسيدات فضلاً عن اختلاف تأثيرها الفسيولوجي (حسين، 1981).

هناك العديد من الكلايكوسيدات مثل كلايكوسيد الساليسين Salicin الذي يوجد في نبات الصفصاف وكلايكوسيد الالومودين الذي يوجد في أوراق وثمار السنا وجذور الحميض.

تعد الكلايكوسيدات ذات أهمية طبية كبيرة اذ يستخدم كلايكوسيد الروتين الذي يوجد في أوراق نبات الحنطة السوداء والسافورا والسدب في تقوية جدران الشعيرات الدموية الدقيقة ومنع النزف كما تعد

الكلايكوسيدات الستيرويدية Steroid glycosides التي تتواجد في أوراق نبات ال Digitalis وبصل العنصل وأوراق ورد الدفلة مقوية للقلب ( حمزة , 2006 ) .

## 2. القلويدات Alkaloids

هي مركبات عضوية قاعدية متبلورة تحتوي في تركيبها الكيميائي على ذرة واحدة او اكثر من النتروجين , تمتاز بكونها عديمة اللون ذات مذاق مر , لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في المذيبات العضوية على العكس من أملاحها حيث تكون قابلة للذوبان في الماء وقليلة الذوبان في المذيبات العضوية مع بعض الاستثناءات حيث يمكن استخلاص قلويد الكافيين Caffein بسهولة بأستخدام الماء ( حمزة , 2006 ) .

تمتلك القلويدات خصائص علاجية مهمة حيث تستخدم في علاج السرطان *Bowsher et al*, (2008), وتعد النباتات التي تحتويها من اهم النباتات الطبية ومن أمثلتها المورفين والافيون في نبات الخشخاش والحرمول والحرمين والحرملول في نبات الحرمل ( حسين , 1981 )

## 3. الدباغيات ( التانينات ) Tannins

هي مركبات عضوية فينولية معقدة , يصعب فصلها وتنقيتها لها خاصية دبغ الجلود إذ ترتبط مع بروتينات الجلد فتجعلها غير قابلة للتحلل بفعل الانزيمات مما يساعد على حفظها لمدة طويلة ومن هنا جاءت تسميتها بالدباغيات ( حمزة , 2006 ؛ حسين , 1981 ) . والدباغيات أما أن تكون قابلة للتحلل تذوب في الماء وتتحلل في الكحول أو أنها تكون قليلة الذوبان في الماء ولكنها تذوب في الكحول من دون تحلل ( Reed,1995 ) . للدباغيات أهمية علاجية كبيرة حيث تستخدم في علاج الاسهال نتيجة امتلاكها خواص قابضة حيث تتواجد في نبات العفص والرمان والسذب , ولها تأثير مطهر لقدرتها على قتل البكتريا كما تساهم في إيقاف النزف ( Greulach , 1973 ) .

## 4. الراتنجات Resins

هي مواد ذات تركيب كيميائي معقد تمتاز بكونها غير متبلورة , شفافة , عند تسخينها تلين ثم تنصهر , غير قابلة للذوبان في الماء الا أنها تذوب في الايثر والكحول والكلوروفورم . تتواجد في النبات ضمن تجاويف أو قنوات افرازية أو في شعيرات غدية , غالبا ما تتواجد مختلطة بالزيت الطيار فتسمى بالراتنجات الزيتية كما في حالة راتنج زيت التربينينا الذي يوجد في أشجار الصنوبر وقد تختلط بالصمغ فتدعى بالراتنجات الصمغية كما في المر والحلتيت ( حمزة , 2006 ) . وللراتنجات خصائص مضادة لنمو البكتريا والفطريات ( Savluchinske et al ., 1997 ) .

## 5. الصابونينات Saponines

هي مركبات عضوية تشابه الكلايكوسيدات في تركيبها وقد تعد أحد أصناف الكلايكوسيدات فتعرف بالكلايكوسيدات الصابونية لأنها غالباً ما ترتبط بجزء سكري , لذا اعتماداً على التركيب الكيميائي للكلايكون فقد قسمت إلى صابونينات التربينات الثلاثية التي تتواجد في النبات الـ Agave والزعتر والعرق سوس , والصابونينات الاستيرويدية التي تعد أقل انتشاراً في الطبيعة . تتميز الصابونينات بأنها تكون رغوة عند رجها مع الماء , كما تؤثر على كريات الدم الحمر فتسبب خروج الهيموكلوبين منها , وبقدر سميتها وأضرارها إذا حقنت في الدم فإنها غير ضارة إذا أخذت عن طريق الفم لأنها لا تمتص في الأمعاء , كما أن من صفاتها أنها تقتل الأسماك وتسبب تهيج الأغشية المخاطية ( حمزة , 2006 ؛ سعد , 1977 ) , ومن أهمها الديجيتونين والجيتونين المتواجد في نبات الديجيتالس Digitalis

وللصابونينات أهمية كبيرة إذ تدخل في صناعة الكورتيزون المستعمل في علاجات كثيرة ( Tyler et al ., 1988 ) .

## 6. المركبات الفينولية Phenlic Compounds

هي مركبات أروماتية تتكون من حلقة بنزين ترتبط بها واحدة أو أكثر من مجاميع الهيدروكسيل , تعد أحد نواتج الأيض الثانوي للنباتات وتتضمن المركبات الفينولية أحادية الحلقة مثل الفلافونويدات Flavonoids والتي تمثل أكبر مجاميع الفينولات ( Bowsher et al ., 2008 ; Harborne, 1984 ) . حيث يصل عددها إلى 2000 نوع , إضافة إلى الفينولات متعددة الحلقات التي تتضمن التانين Tannin واللكتين Lignin , تمتاز بكونها عديمة اللون والرائحة ذات طعم مر , سامة ولكن يعتقد أن موقع مجاميع الـ OH وعددها في الفينولات له علاقة بسميتها وتأثيرها على الأحياء المجهرية ( Cowan et al ., 2008 ) . لذا تعد المركبات الفينولية عوامل مضادة للفطريات والبكتيريا ( Bowsher et al ., 2008 ) .

## 7. الزيوت الطيارة Volatile Oils

تعرف بأنها الزيوت التي تتطاير أو تتبخر عند تعرضها للهواء بدرجة الحرارة الاعتيادية دون أن تتحلل ( Evans,1999 ) وتسمى بالزيوت العطرية لرائحتها الزكية أو الزيوت الايثرية لسهولة ذوبانها في الايثر ( Shaya et al ., 1991 ; Tyler et al ., 1988 ) . تمتاز بان لها طعماً مستساغاً ورائحة قوية وهي عديمة اللون ولكنها قد تكتسب اللون الداكن في حالة تأكسدها نتيجة تخزينها لمدة طويلة . قد تتواجد في أجزاء معينة من النبات كما في جذور نبات الزنجبيل أو قشور في ثمار البرتقال أو القلف في نبات الدارسين ( حسين , 1981 ) . وللزيوت الطيارة فوائد طبية عديدة فعلى سبيل المثال يستخدم

زيت الزعتر في علاج أمراض الروماتزم والامراض الجلدية مثل الاكزيما ( Mossa *et al* ., 1987 ) . (

## 8. الزيوت الأساسية Essntial Oils

هي بخلاف الزيوت الطيارة تمتاز بكونها لا تتطاير ولا تتبخر , تتألف من كليسين مرتبط مع حامض دهني غير مشبع غالبا , لا تذوب في الماء ولكنها تذوب في مذيبات عضوية مختلفة وتعد غير سامة للإنسان كما تعد مادة غذائية مهمة له ( Tyler *et al* ., 1988 ) . تخزن هذه الزيوت بكميات كبيرة في البذور وبكميات أقل في الثمار والدرنات والأوراق والسيقان ( المنظمة العربية للتنمية الزراعية , 1988 ) , ومن أمثلتها الزيت المستخلص من أوراق اليوكالبتوز الذي يمتلك فعالية مضادة للبكتريا ( Cimmanga *et al* ., 2002 ) .

## 11-2 المستخلصات النباتية

ذكر Naser *et al* ( 2014 ) أن إضافة قشور الرمان أدت إلى تثبيط إنتاج الافلاتوكسين بنسبة 100% أثناء تخزين الأرز تحت درجة حرارة 25 مئوية ورطوبة 18% لمدة أربعة أشهر ، بينما قشور الليمون أدت إلى تثبيط مماثل لكن لفترة ثلاث اشهر فقط تحت تأثير الظروف نفسها .

أكد Hussein ، ( 2015 ) أن إضافة مسحوق قشور الرمان بنسبة 5% ومسحوق القرنفل بنسبة 2% الى عليقة افراخ الدجاج الملوثة بسموم AFB1 و OTA أدى إلى زيادة بوزن الأفراخ إذ وصل أعلى وزن بمعاملة قشور الرمان 5% الى 740.30 غم وأعلى وزن بمعاملة مسحوق القرنفل 2% 730.25 مقارنة بأعلى وزن بأفراخ المقارنة 535.90 غم التي تغذت على أعلاف ملوثة بالسمين ، وحققت كذلك انخفاضاً في معدل الهلاكات إذ أصبح 5% مقارنة بمعدل هلاكات المقارنة وهو 35% .

ذكر Reddy *et al* ( 2008 ) إن القرنفل منع نمو الفطر *A.flavus* وإنتاج AFT . أكد البلداوي ( 2012 ) أن إضافة مسحوق ورد لسان الثور ومسحوق الديباج الى العلائق الملوثة بسم Ochratoxin بتركيز 2 جزء بالمليون وسم DON بتركيز 5 جزء بالمليون حقق أعلى تركيز 5% من معاملات لسان الثور أختزال بنسبة 63.8% أما مسحوق الديباج فأعلى أختزال كان بنسبة 67.79% في أثناء الشهر الأول ، ووصلت نسبة الاختزال بمعاملة الديباج لسم DON 98.1% وبقية المعاملات وصلت 100% في الشهر الثاني .

ذكر الكرطاني ( 2012 ) فاعلية مستخلصات نبات القرفة والزعتر والقرنفل وتأثيرها على نمو الفطر *A.flavus* المنتجة لسم AFB1 وتأثير هذه المستخلصات في السم ، وأكدت النتائج هذه الفاعلية ، إذ أعطت

المستخلصات الهكسائية للقرفة والقرنفل والزعتر تثبيطا لنمو الفطر بنسبة 100% عند التراكيز 110 ، 250 و 250 ميكروغرام / مل على التتابع تليها المستخلصات الكحولية ، وأثبتت المستخلصات نفسها كفاءتها في اختزال سم AFB1 اذ ان جميع طرائق الاستخلاص وبتركيز 24 ميكروغرام / كغم وكان افضلها المستخلص الهكساني للزعتر بالتركيز 250 ميكروغرام / مل بلغت 98.7 % .

## 12-2 نبات الهليون *Asparagus officinalis*

### 1-12-2 الاسم المرادف

أشتقت الكلمة الإنكليزية (*Asparagus*) من اللاتينية الكلاسيكية , لكن النبات كان يعرف سابقاً في اللغة الإنكليزية بأسم *sperage* التي تعني " برعم أو الرمح " وفي اللغة التايلندية " براعم الخيزران الاوربية " وفي اللغة التركية , يعرف الهليون باسم " *Kusknmaz* " , أي " الطيور لا تستطيع الهبوط " في إشارة الى شكل النبات ( Lord,2021) يعرف *A.officin* على نطاق واسع ببساطة باسم الهليون المخزني , كما يسمى حديقة الهليون , وفي الارياف يسمى عشب العصفور *Sparrow grass* وفي بعض البلدان العربية يسمى ( سكوم ) كما وأنه يطلق على النبات الهليون عدة أسماء محلية في فلسطين منها حليون وجربوة ( سلام , 1994 ) .

### 2-12-2 وصف النبات وموطنه

الهليون هو نبات عشبي معمر شائك يصل ارتفاعه الى 100-150 سم يحتوي على جذوع قوية مع أوراق ريشية رمحية كثيرة التفرع تشبه الابريرة وتتجمع أوراقه القشرية بشكل يشبه الوردية أما الجذر فهو يشبه التاج عرضي مجوف درني ينمو جيداً في المناخات الاستوائية وشبه الاستوائية . والأزهار على شكل جرس , لونها أبيض مخضر إلى مصفر , أما الثمرة عبارة عن توت أحمر صغير ( Smith, 2018) .





الشكل ( 2-2) نبات الهليون ( Bowes ,1996 )

هناك نوعان من الهليون , هما الأبيض والأخضر. يستخدم الهليون الأبيض على نطاق واسع في اوربا واسيا ؛ يحظى الهليون الأخضر بشعبية في الولايات المتحدة ويتم أنتاجه في الغالب في كاليفورنيا وواشنطن . ( Pegiou et al ,2019 ) .

يحتل الهليون (*Asparagus officinalis*) المرتبة العاشرة من بين أفضل 14 نوع من الخضروات الصحية في العالم إذ ينشا الهليون من شرق البحر الأبيض المتوسط وأسيا الصغرى إذ يزرع في جميع مناطق العالم تقريبا , وأكبر مناطق الإنتاج هي الصين وامريكا الجنوبية بيرو ( Shahrajabian & Sun, 2022 ) .

كما يتم زراعة المحصول وحصده منذ الاف السنين من قبل العديد من الحضارات القديمة , بما في ذلك المصريون والاغريقيون والرومان القدماء , وبالتالي فإن المحصول له ماضي غني ومتنوع . كما أنه موضح على أفريز مصري قديم , هو أول مؤشر على استخدامه كما استخدام في العصور اليونانية والرومانية القديمة كغذاء ومصدر للأدوية العشبية . ( سلام , 1994 ) .

## 3-12-2 الاستعمالات الطبية Medical Uses

يعد نبات الهليون نباتا ذا قيمة عالية بسبب خصائصه العلاجية ( Iqbal *et al* ., 2017 ). إذ تؤدي الصابونيات المكونة له دوراً محورياً في النشاط المضاد للأورام ( Romani *et al* ., 2021 ). وتقليل مخاطر الاضطرابات مثل الإمساك والاسهال وكذلك هشاشة العظام والسمنة وأمراض القلب والأوعية الدموية والروماتيزم والسكري ( Guo *et al* ., 2020 ).

يعد نبات الهليون غني جداً من الناحية الدوائية لأنه يحتوي على أنشطة مضادة للسرطان ( Zhang *et al* ., 2019 ) ، مضادة الأكسدة ، مضاد للقرحة ، مضاد للفطريات والبكتيريا فضلاً عن أنه يعد مضاداً للالتهابات ( Desoukey *et al* ., 2020 ) ، ارتفاع ضغط الدم ومضاد للتخثر ( Sanae, 2013 )

يعد نبات الهليون هو مصدراً للنشا المغذي القابل للأكل كما أنه منخفض السعرات الحرارية ( Zhu *et al* ., 2010 ) وتستخدم البراعم كفاتحة للشهية ولعلاج الأم القلق ، الخفقان ، وضيق التنفس ، الام الأسنان كما تساعد خصائص المضادات الحيوية في مسحوق البذور في تخفيف الغثيان عن طريق المساهمة في تهدئة المعدة ( Redondo -Cuenca *et al* ., 2022 ; Iqbal *et al* ., 2017 ).

يعد نبات الهليون من النباتات المهمة اقتصادياً وذو قيم غذائية وطبية بسبب احتوائه على مركبات غنية بمضادات الاكسدة والفلافونويد والفيتامينات فضلاً عن محتوى الزنك والالياف . ( Lee *et al* , 2014 . Motoki *et al* ,2019 ).

## 4-12-2 التصنيف العلمي Scientific Classification

Kingdom : Plantae

Phylum : Angiosperms

Class: Monocots

Order : Asparagales

Family : Asparagaceae

Sub family : Asparagoideae

Genus : *Asparagus*

Species: *Asparagus officinalis* L.

( Chakravarty , 1976 ) .

## 13-2 تكنولوجيا النانو Nanotechnology

### 1-13-2 مقدمة في تكنولوجيا النانو Introduction in Nanotechnology

كلمة نانو مشتقة من الكلمة اليونانية نانوس ( Nanos ) التي تعني القزم التي تشير للأشياء ذات حجم واحد بليون (  $10^{-9}$  ) نانوميتر ، لقد جذبت الجسيمات النانوية مزيدا من الاهتمام نظرا لأستعمالها في الكثير من المجالات بما في ذلك الطب النانوي وأيضا بسبب الخصائص الفريدة والمميزة التي تمتلكها هذه المميزات أدت الى توفير تقنيات بسيطة لإنتاج وتخليق الجسيمات المعدنية بحجمها النانوي ، توفر المواد النانوية والجسيمات النانوية حلاً للتحديات البيئية والتكنولوجية في العديد من المجالات وأن هذه المميزات تعتمد بشكل كبير على الشكل والحجم الكلي للجسيمات وتوزيعها ( Plaza et al , 2014 ) .

ظهرت تكنولوجيا النانو الحيوية كعامل متكامل بين التكنولوجيا النانوية والتكنولوجيا الحيوية من أجل تطوير التخليق الحيوي والصدىق للبيئة لإنتاج واعداد المواد والجسيمات النانوية ( Sahayaraj and Rajesh ، 2011 ) .

تمثل هذه التكنولوجيا بديلا اقتصاديا للتقنيات الفيزيائية والكيميائية في تشكيل وإنتاج المواد والجسيمات النانوية في عام 1974 صاغ مصطلح تقنية النانو الأستاذ نوريو تانيجوشي ( Norio Taniguchi ) من جامعة طوكيو للعلوم . يمكن تجميع الجسيمات النانوية على نطاق واسع الى مجموعتين وهما :

1. **الجسيمات النانوية العضوية Organic nanoparticles** : تحتوي هذه المجموعة على مجاميع أصلية من الكربون تم اكتشافها في العقدين الأخيرين ، ومنذ ذلك الحين يتم أستعمالها في العديد من مجالات العلوم . تشمل الجسيمات النانوية العضوية أكسيد الكرافين النانوي وأنابيب الكربون النانوية أحادية الجدار ( Adibkia et al , 2011 ) ، وجسيمات الكربون النانوية التي أظهرت خصائص قوية ومميزة ، تعد مساحة وحجم الجسيمات النانوية الكربونية من العوامل المهمة جداً التي تؤثر في نشاطها المضاد للبكتريا لذا فإن زيادة مساحة سطح المواد والجسيمات النانوية عن طريق تقليل الحجم تؤدي الى تحسين نشاط التفاعل مع البكتريا ( Kang et al , 2008 ) .

2. **الجسيمات النانوية اللاعضوية Inorganic nanoparticles** : تتضمن هذه المجموعة جسيمات النانو المغناطيسية وجسيمات النانو ذات المعادن النبيلة وجسيمات الذهب والفضة النانوية وجسيمات النانو شبه الموصلية ( أكسيد الزنك وأكسيد التيتانيوم ) ، هنالك اهتمام متزايد بالمواد الطبيعية غير العضوية لأنها توفر تنوعا وظيفيا مع خصائص المواد المذكورة إذ تعد جسيمات النانو المعدنية من أهم العوامل الحيوية الطبية مثل الزنك والذهب والكربون والفضة والتيتانيوم والحديد والبلاديوم والنحاس التي تستعمل في الغالب لتخليق هذه الجسيمات ، بسبب الحاجة المتزايدة لهذه الجسيمات النانوية يجب

أن يتم تطوير عمليات تخليق وإنتاج لهذه الجسيمات بطرائق صديقة للبيئة من خلال النهج البيولوجية  
اذ تعد أقل كلفة وأقل سمية من الطرائق الأخرى ( الكيمائية والفيزيائية ) ( Vadlapudi and  
(Kaladhar,2014).

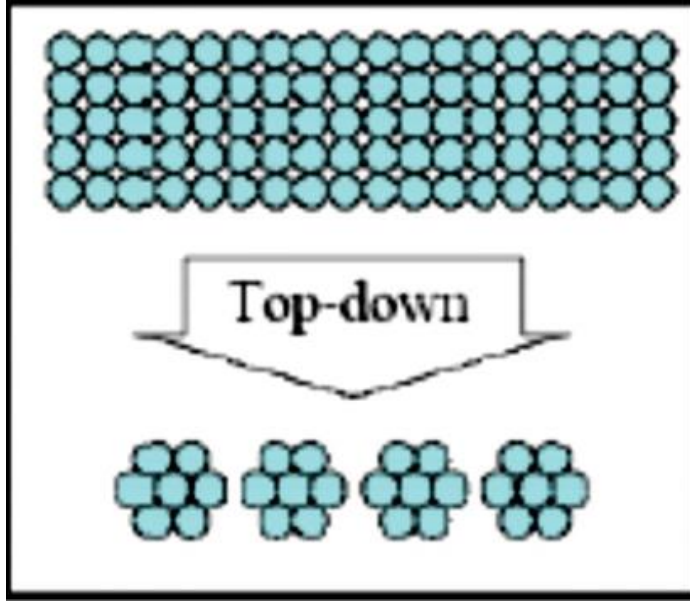
تعد جسيمات النانو مهمة جدا في العديد من المجالات لاسيما الطبية وذلك بسبب خصائصها  
ومميزاتها الفريدة الآتية :

- ❖ حجمها الصغير الذي يتراوح ما بين 1-100 نانوميتر .
- ❖ المساحة السطحية الكبيرة جدا مقارنة بحجمها .
- ❖ الخصائص البيولوجية والكيمائية المميوة .
- ❖ الصلابة الهيكلية التي تملكها هذه الجسيمات على الرغم من تركيبها الذري الصغير .
- ❖ تعتمد جمعات الجسيمات النانوية المحسنة على طبيعة التغيير السطحي الإشارات الضوئية  
التي تتعرض لها المادة .
- ❖ شديدة التحمل للحرارة العالية ، القدرة على التوصيل الكهربائي ، تحسين النشاط السطحي  
المحفز ( Sahayaraj and Rajesh ,2011 ) .

## 2-13-2 بناء الجسيمات النانوية

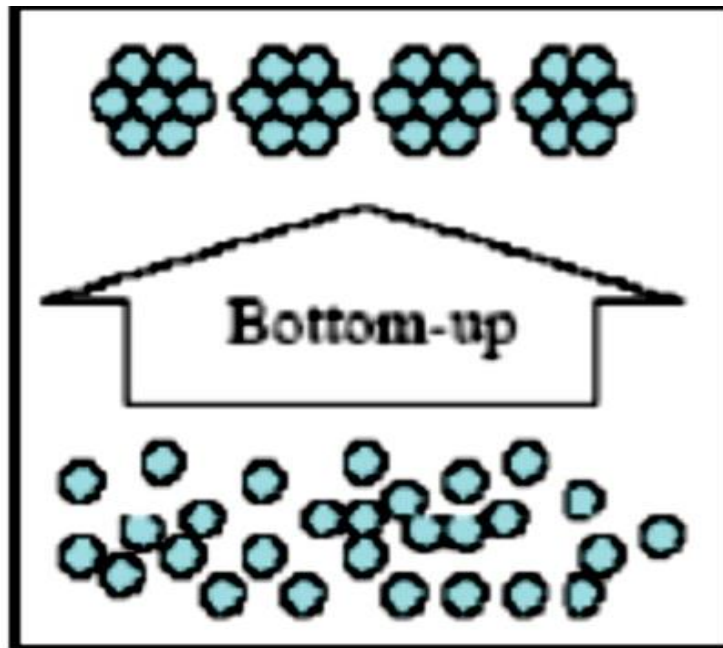
يتم بناء المواد النانوية باليتين رئيسيتين هما من الأعلى الى الأسفل Top-down من الأسفل الى  
الأعلى Bottom -up :

- 1- **من الأعلى الى الأسفل Top-down** : وهي الأعلى كلفة وتشمل استخدام مركبات كبيرة نسبيا والتي  
يمكن السيطرة عليها خارجيا في بناء التراكيب النانوية أي أنها تعتمد على تجزئة المواد الصلبة الكبيرة  
الى قطع أصغر فأصغر باستخدام قوة فيزيائية كبيرة هذه الطريقة تستلزم الكثير من الطاقة ولا يمكن  
الحصول بوساطتها على اسطح مثالية للجسيمات النانوية بسبب القوى الفيزيائية المستخدمة في  
تحضيرها ( Soni et al ., 2018 : Nadaroglu et al ., 2017 )



الشكل ( 2-3 ) بناء الجسيمات النانوية من الأعلى الى الأسفل

2- من الأسفل الى الأعلى **Bottom -up** : معظم التفاعلات التي تحدث هي تفاعلات أكسدة وأختزال وتتضمن تصغير مكونات المادة حتى المستوى الذري ، مع المزيد من التجميع الذاتي مما يؤدي إلى التراكيب النانوية ، وتعمل القوى الفيزيائية على دمج الوحدات الأساسية ضمن هياكل مستقرة أكثر . وتعد هذه الطريقة هي الأفضل بسبب السيطرة التامة على أحجام الجسيمات النانوية وقلة الفضلات الناتجة منها ( Rajeswari& Kalpana, 2018 ) .



الشكل ( 2-4 ) بناء الجسيمات النانوية من الأسفل الى الأعلى

بشكل عام هنالك ثلاث طرائق أساسية لبناء الجسيمات النانوية :

1. الطريقة الكيميائية **Chemical approach** : مثل طرائق الغرويات ( Colloids ) وطريقة الهلام

السائل ( Sol-gel ) والشرائح ( L-B films ) . وتتميز هذه الطرائق بما يأتي :

- تحتاج إلى تقنيات بسيطة
- غير مكلفة اذ تحتاج للى أجهزة اقل مقارنة بالطرائق الفيزيائية .
- تتطلب درجات حرارية واطئة لتصنيعها
- تكون كميات المواد النانوية المصنعة بهذه الطرائق كبيرة
- يمكن تصنيع المواد النانوية بأحجام واشكال مختلفة
- تعد طرائق امينة

3- الطريقة الفيزيائية **Physical approach** : وتتم هذه الطريقة عادة بالية Top-down والتي

يتم فيها تقليص المادة إلى الحالة النانوية باليات فيزيائية كالموجات الصوتية ultra-sonication ، الأشعاع بالموجات الصغرى microwave irradiation والطريقة الالكتروكيميائية electrochemical method ، في هذه الطريقة يمكن استخدام أنبوب التسخين عند وزن البارومتري لدمج الجسيمات النانوية بواسطة تكثيف التبخير ، ويتم تبخير العنصر المصدر للمادة النانوية داخل عوامة والحرارة تقوم بتبخيره إلى غاز محمول ، وهذه الطريقة تستخدم في بناء الجسيمات النانوية للذهب والفضة والرصاص والكاديوم وكثير من الفلزات الأخرى ( Gour & Jain,2019 ) .

3- الطريقة الحيوية **Biological approach** : أن من عيوب الطريقتين الكيميائية والفيزيائية أنهما

مكلفتان نسبيا ، فضلاً أن الطريقة الكيميائية تشتمل على استعمال عناصر ومركبات قد تكون ذات أثر سام وخطر على الباحثين ، كما أن بعض المخاطر تتعدى خطورتها البيئية والاحياء التي تعيش فيها ، كما بعض الأليات الفيزيائية والكيميائية تؤدي إلى إنتاج جسيمات نانوية لا تلائم الشكل والحجم والنقاوة المطلوبة ولا يمكن التحكم بها ، لذا فأن من الضروري البحث عن طريقة اكثر امانا ودقة وأقل كلفة ( Gudikandula & Maringanti,2016 )

إن الطريقة الحيوية أو ما تعرف بالطريقة الخضراء Green method تتضمن الحصول على مواد أكثر تجانسا مع عيوب أقل ، وفيها يمكن أن يتم بناء الجسيمات النانوية عن طريق كائن مجهري كالبكتريا أو فطر أو طحلب أو أحد النباتات أو مستخلص نباتي ، أن عدد من الخصائص للكائن الحي كالمسارات الكيموحيوية ، الفعاليات الانزيمية ، مراحل نمو الخلية والتفاعلات المثالية هي الأعتبارات التي تحدد أختيار الكائن أو مستخلصه لبناء الجسيمات النانوية ( Hussain et al ., 2016 ) . في هذه الطريقة يتم

أنتاج الجسيمات النانوية ضمن الوظائف الطبيعية للكائن ، ولأن البكتريا سريعة التطور والنمو واطئة الكلفة ومن السهل السيطرة على بيئتها ، لذلك تعد هي الكائن الأكثر استخداما في بناء الجسيمات النانوية ، كما إن بعض الأجناس البكتيرية لها القدرة على حجب السمية لبعض الفلزات والمعادن الثقيلة ، كما أن بناء المواد النانوية يمكن أن يكون داخلاً خلويًا أو خارجاً خلويًا مع الانزيمات بواسطة استخدام مزارع لكائنات حقيقية النواة سهلة الزرع و بسيطة الكتلة الحيوية كالفطريات والاعفان . إن عوامل كالحضن ومحلول الايون المعدني يؤثر في حجم الجسيمات النانوية المنتجة ( Nadaroglu et al ., 2017 ) .

#### 4- 14أكسيد الزنك النانوي

يستعمل الزنك النانوي في عدة مجالات مثل المواد الغذائية ومستحضرات التجميل والأدوية والتطبيقات البايولوجية فهو عامل مضاد للميكروبات , يعزز النمو وينظم المناعة ويمنع التلوث البيئي بشكل غير مباشر ( Swain et al ., 2016 ) . نظراً لما تتميز به جسيمات الزنك النانوي من صفات كيميائية وكهربائية وبصرية فريدة فقد حققت اهتماماً خاصاً فيما يتعلق بالعديد من المجالات لاسيما الطبية ( Jiang et al ., 2009 ) .

تظهر جسيمات الزنك النانوية فعالية قوية ضد مجموعة كبيرة من الفطريات المسببة للأمراض , *Botrytis cinerea* , *Rhizopus stolonifera* , *Aspergillus niger* , *Candida albicans* , *Penicillium* ( Christian Dimkpa et al ., 2013 ; He et al ., 2011 ; Sawai and Yoshikawa, 2004 ) .

يستعمل المجهر الالكتروني الماسح لتحليل التغيرات المظهرية للميكروبات المستحثة بالجسيمات النانوية من اجل تحديد الاليات المختلفة , على الرغم من أن نشاط الجسيمات النانوية المضادة للميكروبات لازالت غير واضحة ولا تزال مثيرة للجدل لكون الفعالية المضادة للميكروبات تتطلب تفسير عمق للآليات التي تستعملها الجسيمات النانوية للقضاء على الميكروبات , لكن هناك اليات مميزة للجسيمات النانوية يمكن توضيحها بالشكل الآتي :

1. إطلاق الايونات المضادة للميكروبات لاسيما ايونات الزنك ثنائية الشحنة ( Kasemets et al ., 2009 )
2. الاتصال المباشر لجسيمات الزنك النانوية مع جدار الخلية الميكروبية الذي يؤدي ال تدمير هذا الجدار
3. تشكيل أنواع الاوكسجين التفاعلية أو ما يسمى بالجنور الحرة ( Jalal ROS Reactive oxygen species et al ., 2010 ) .

في مجال البايولوجي أخذ أكسيد الزنك النانوي اهتماماً كبيراً بسبب نشاطه المضاد للميكروبات والذي فتح أفقا جديدة للعلوم البيولوجي ( Allahverdiyev ., 2011 ) .

أوضح Ravishankar Rai (2011) أن لأوكسيد الزنك تأثيراً كبيراً وواضح كمضاد ميكروبي , وعليه تم استغلاله في مجالات الصناعية منها معالجة المياه , الاصباغ , ومستحضرات التجميل . تتميز الجسيمات النانوية بكونها نشطة وفعالة مع الأنظمة الحيوية , وذلك لأمتلاكها أشكال متباينة , ومساحة سطحية كبيرة , وذات أسطح عالية الشحنة , وقدرة أمتصاص السطح فيها عالية ( Kasemets *et al* ., 2009 ) .

تعزى الفعالية التثبيطية لأوكسيد الزنك اتجاه الممرضات ربما تأتي بوساطة تكوينه للجذور الحرة ROS على السطح مما يؤدي إلى تحطيم الغشاء الخلوي للخلايا المايكروبية ( Brayner *et al* ., 2006 ; Reddy *et al* ., 2007 ) .

تم اقتراح اليات مختلفة لمناقشة تأثير الجسيمات النانوية على نمو الفطريات الأول هو تكوين جذر  $H_2O_2$  على سطح ZnO NP بسبب احتمال تكوين رابطة هيدروجينية بين مجموعة هيدروكسيل من جزيئات السليلوز مع ذرة الاوكسجين من ZnONP مما يؤدي الى تثبيط نمو الفطريات , والألية الثانية هي إطلاق ايونات  $Zn^{2+}$  اتي تسبب في تلف غشاء الخلية ويتفاعل مع المحتويات في داخلها ( Moraru *et al* ., 2003 ) .

تقوم جسيمات الزنك النانوية بتكوين الجذور الحرة مثل جذر الهيدروكسيل وجذر الاوكسجين المفرد الذي يحفز على موت الخلايا ( Lipovsky *et al* ., 2011 ) . تؤثر جسيمات الزنك النانوية على الخلايا حيث تلامس الجزء الخارجي من الغشاء البلازمي وتتفاعل معه وهذا التفاعل يغير من هيكل الغشاء ويغير من نفاذيته ويؤدي الى تحطيم في الغشاء البلازمي وتراكم في السائتوبلازم ويحدث تداخل مع العمليات الأساسية لنمو الخلية مما يؤدي إلى تثبيط نموها ( Zhang *et al* ., 2007 ) .

في إحدى الدراسات التي قام بها ( Navale *et al* ., 2015 ) لوحظ أن الوزن الجاف للكتلة الحيوية للفطر *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus* كانت ضئيلة جدا عند معاملة الفطر بالزنك النانوي بتركيز 100 Part Per million (PPm) ذو الحجم 20-25 nm (nano meter) واطهر الزنك تأثيرا مثبطا للفطر والبكتريا وربما يعود التأثير إلى قدرة الزنك النانوي على توليد وإنتاج الجذور الحرة التي بدورها تعمل على تحطيم الخلية الحية وكذلك توليد الضغط التأكسدي تجاه - Glycine- Cystine - glutamyl وهو المسؤول عن التثبيط للفطر والبكتريا .



بين Ahmad وجماعته (2020) انه عند تركيز 100 ppm للزنك النانوي أدى الى تثبيط في معدل نمو الفطريات إذ بلغ معدل التثبيط 76.6% لفطر *Alternaria mali* , 65.4% لفطر *Botryosphaeria dothidea* و55.2% لفطر *Diplodia seriata* وقد لوحظ من خلال الفحص المجهرى للخلايا المعاملة بالزنك النانوي تحطم في طبقات الجدار للخلية الفطرية مما يؤدي إلى اختزال في أعداد الخيوط الفطرية , هذه الخاصية للزنك النانوي المضاد للفطريات تكون ذات تأثير كبير في استغلال الزنك النانوي في مكافحة الافات الفطرية وضمان حماية لمحاصيل الفاكهة . يرتبط أيضا تأثير الجسيمات النانوية المضادة للفطريات بحجمها وتركيزها في الوسط حيث كلما كانت بحجم اصغر كلما أعطت نسبة تثبيط اعلى ( Padmavathy and Vijayaraghavan.,2008 ; Buzea et al ., 2007 ) .

بينت دراسة أجراها Mehdi وجماعته ( 2018 ) أن جسيمات أكسيد الزنك النانوية أثرت على خلية الفطر بوساطة تجمع المادة البروتوبلازمية وانفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي وحصول انحراف في مجرى سريان المادة الغذائية وانكماش الخلية الفطرية وتحطيمها . وأظهر الزنك النانوي تغيراً في شكل الغزول الفطرية للفطر *Fusarium graminearum* إذ ظهرت أنحف وتميل الى التجمع مع بعضها البعض وحصل فيها تحطم للجدار وظهر مزيد من الفجوات وسيولة السائتوبلازم وأن هناك تثبيطاً للنمو الفطري مقارنة لأوكسيد الزنك العادي , من أن كلاهما حررت نفس المستويات من الزنك القابل للذوبان , مما يؤكد على أن سمية الزنك تعتمد على حجم الجسيمات فكلما كانت أصغر كانت أكثر تثبيطاً وفعالية وهو ما يمثله أكسيد الزنك النانوي ( Christian O . Dimkpa et al ., 2013 ) . من المزايا الرئيسية لأستعمال الجسيمات النانوية ومنها أكسيد الزنك النانوي هو الاستقرار أو ذات عمر طويل مع العوامل المضادة للميكروبات العضوية ( Kolodziejczak-Radzimska and Jesionowski., 2014 ) .

## 5- 15 الاجهزة والتقنيات المستخدمة في تشخيص المواد النانوية :

يمكن الحصول على المواد النانوية بتراكيب مختلفة فقد تكون محاليل غروية أو مساحيق جافة أو شرائح رقيقة لذا فإن تنوع تراكيب هذه المواد يستلزم توفر تقنيات مختلفة لغرض تشخيصها . وعموماً فإن أهم التقنيات المستخدمة في هذا المجال هي ( Kulkarni , 2009 ) :

### A – المجاهر ( Microscopes ) :

مثل المجهر الضوئي ( Optical Microscope ) والمجهر الالكتروني الماسح ( Scanning Electron Microscope, SEM ) والمجهر الالكتروني النافذ ( Transmission Electron Microscope, TEM ) ومجهر القوة الذرية ( Atomic Force Microscope ,AFM ) وغيرها

, وتفيد المجاهر في تحديد شكل والحجم وتركيب المادة وعند الاستعانة ببعض التقنيات الأخرى فإن المجاهر يمكن أن تقدم معلومات قيمة عن الخصائص الضوئية ( Optical ) والمغناطيسية ( Magnetic ) والخواص الأخرى للمواد النانوية .

**B – تقنيات الحيود للأشعة السينية ( X ray diffraction techniques ) :**

مثل جهاز حيود الأشعة السينية ( XRD ) , ( X – ray Diffraction ) وحيود الإلكترون ( Electron Diffraction ) وحيود النيوترون ( Neutron Diffraction ) وغيرها . تستخدم تقنيات الحيود في تحديد حجم الدقيقة النانوية فضلا عن تحديد تركيبها .

**C – الأجهزة الطيفية ( Spectroscopies ) :**

مثل جهاز مطيافية الأشعة تحت الحمراء FT-IR ومطيافية الامتصاص الذري ومطيافية الرنين النووي المغناطيسي ومقياس الأشعة فوق البنفسجية المرئية ( Uv – visible spectroscopy ) وغيرها , وتفيد الأجهزة الطيفية في تحديد الحالة الكيميائية والتركيب الإلكتروني للمادة النانوية فضلا عن خواص المادة الأخرى .

# **الفصل الثالث**

## **المواد وطرائق العمل**

## **Materials and Methods**

#### 4- المواد وطرائق العمل Materials & Methods

#### 1-3 المواد 1-3

#### 1-1-3 الأجهزة والادوات المستخدمة في الدراسة

#### جدول ( 1-3 ) الأجهزة والأدوات المستخدمة في الدراسة

المنشأ والشركة المجهزة	الاسم بالإنكليزي	اسم الجهاز بالعربي	ت
China	Petri Dish	اطباق البتري	1
USA	Filter paper	أوراق الترشيح	2
USA-All-American	Autoclave	المؤصدة	3
Chicaco -QL	Incubator	الحاضنة	4
India	Cork Borer	ثاقب فلين	5
Korea-LabTech	Hood	غرفة العزل	6
Concored- Lebanon	Refrigerator	ثلاجة	7
Germany	Water Distiller	جهاز التقطير	8
Germany	Sensitive Balance	ميزان حساس	9
France	Ultraviolet Analyzer	جهاز الأشعة فوق البنفسجية	10
India	Capillare tubes	انابيب شعرية	11
China	Plastic tubes	انابيب بلاستيكية	12
China	Electric grinder	طاحونة كهربائية	13
China	Blender	خلاط كهربائي	14
Malaysia-Motic	Light microscope	مجهر ضوئي	15
China	Glass slides	شرائح زجاجية مع غطاء	16
Korea – Lab tech	Water bath	حمام مائي	17
England	TLC jar	وعاء الفصل	18
Switzerland	Thin Layer chromatography	صفائح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	19
China	Indicator Paper	أوراق لقياس PH	20
China	Magnetic stirrer	مازج مغناطيسي	21
Belglum	Micropipette	ماصات دقيقة	22
India	Hot Plate	صفيحة ساخنة	23
USA	Centrifuge	جهاز طرد مركزي	24
Japan	Electric oven	فرن كهربائي	25
USA	Vortex	مازج	26
Germany	Laboratory glass ware	أدوات زجاجية مختلفة الأحجام	27
France	Electrophoresis tank	حوض الترحيل الكهربائي	28
Korea	Digital Camera	كاميرا رقمية	29

3-1-2: المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

جدول ( 2-3 ) المواد الكيميائية والبايولوجية المستخدمة

المنشأ	المادة الكيميائية	ت
Switzerland	Ethyl % 96 كحول ايثيلي alcohol	1
	Chloramphenicol مضاد حيوي	2
Switzerland	كلوروفورم Chloroform	3
Switzerland	Methanol ( CH <sub>4</sub> O) كحول مثيلي	4
England	Ammonium Sulphate امونيا (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
India	Sillica Gal جل السليكا	6
England	Lactophenol صبغة اللاكتوفينول	7
India	Agar-Agar اكار - اكار	8
India	هيدروكسيد الصوديوم NaOH	9
India	كلوريد الزنك Zncl <sub>2</sub>	10
Iraq	D.W	11
England	HfeSo <sub>4</sub> كبريتات الحديد المائية	12
England	MgSO كبريتات المغنسيوم المائية	13
Germany	KCl كلوريد البوتاسيوم	14
England	I <sub>2</sub> اليود	15
Germany	H <sub>2</sub> So <sub>4</sub> حامض الكبريتيك المركز	16
England	AgCl كلوريد الزنبيق	17
England	KPb فوسفات البوتاسيوم	18
England	Dmso ثنائي مثيل السلفوكسيد	19
England	كلوريد الحديدك	20
England	خلات الرصاص	21
England	بلورات الفينول	22
germany	محلول الفا - نفتول	23
England	حامض الهيدروكلوريك	24
England	كبريتات النحاس الزرقاء	25

3-1-3 : الكواشف المستخدمة

جدول ( 3-3 ) الكواشف المستخدمة

ت	الكواشف	مصدر طريقة العمل
1	كاشف كلوريد الزئبقيك HgCl <sub>2</sub>	Shihata.( 1951)
2	كاشف حامض الخليك الالاماني	Al-Abid.(1985)
3	كاشف كلوريد الحديدك FeCl <sub>3</sub>	Harbone.(1973)
4	كاشف الكبريتك المركز H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cannell.(1998)
5	كاشف هيدروكسيد الصوديوم NaOH	Gelsman.(1962)
6	كاشف الفينول مع حامض الكبريتك المركز	Meyer and Walther.(1988)
7	كاشف موليش	Sofowora.(1993)
8	كاشف واكنر	Harborne .( 1984)
9	كاشف ماير	Harborne .(1984)
10	كاشف خلات الرصاص	Ahmed et al ., 1998

4-1-3 : المواد والعدد المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

أولا : عدة استخلاص ال DNA

جدول ( 4-3 ) عدة استخلاص ال DNA

ت	المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
1	Cell Iaysis Solution (AP1)	Qiagen	Germany
2	Proteins and carbohydrate rempval buffer (P3)	Qiagen	Germany
3	Pruification buffer ( AW)	Qiagen	Germany
4	Elution buffer(TE)	Qiagen	Germany

ثانيا : البوادئ المستخدمة في تقنية ال ( PCR )

جدول ( 5-3 ) البوادئ المستخدمة في تقنية ال ( PCR ) Polymerase Chaina reaction

Primer	Sequence	PCR Product Size
18S-F	CTTCGGAAGGGGTGTATTTAT	
18S-R	TTCACAGTAAAAGTCCTGGTT	

ثالثا : عدة اجراء تفاعل ال PCR

جدول ( 6-3 ) عدة اجراء تفاعل PCR

Product Name	Description and Components	Company (Origin)
<b>FavorPrep™ Fungi/Yeast Genomic DNA Extraction Mini Kit</b>	<b>The FavorPrep™ Fungi/Yeast Genomic DNA Extraction Mini Kit is designed for the purification of DNA from fungus and yeast cells. The enzyme 38audi38oph (lyticase &amp; proteinase K) and bead-beating homogenization are applied to lyse samples efficiently and improving DNA yield. This kit provides the most complete and effective method to extract application-ready pure genomic DNA from fungi and yeast samples.</b>	<b>Favorgen-Thailand</b>

5-1-3 الأوساط الزرعية Culture media

جدول (7-3) الأوساط الزرعية

الغرض من استخدام الوسط	المنشأ	اسم الوسط الزراعي	ت
لعزل وتنقية وتشخيص الفطريات	Italy	وسط البطاطا الدكستروز اكار	1
لاختبار قدرة الفطريات على انتاج السم	تحضير	وسط جوز الهند	2

2-3: طرائق العمل

1-2-3: جمع العينات الفطرية من اللحوم والمعلبات

تم جمع 45 عينة من اللحوم الطازجة والمجمدة بصورة عشوائية من الأسواق المحلية في محافظة كربلاء , حيث شملت هذه العينات قطع صغيرة أخذت من الأسواق المحلية ( اللحوم والحم المفروم والكبد

ودجاج وكبدة الدجاج والنقانق بأنواعها الدجاج واللحم) ونقلت بواسطة أكياس معقمة إلى مختبر الدراسات العليا لكلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء بتاريخ 2024/6/1-2024/6/30 وتم حفظها في الثلاجة لحين الاستعمال .

### 3-2-2: تحضير الأوساط الزراعية Culture media

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

حضر هذا الوسط بأضافة (39) غم من مسحوق PDA الى (1000) ملتر من الماء المقطر في دورق زجاجي نو غطاء محكم ، ثم رج جيدا وسخن بواسطة المسخن الحراري water bath حتى الغليان وبعدها عقم بجهاز المؤصدة بدرجة الحرارة 121 م ثم أضيف اليه 250 ملغم من المضاد البكتيري الكلورومفنكول لمنع نمو البكتيريا ، ثم رج الوسط جيدا وضبط الاس الهيدروجيني عند 5.5 بأضافة حامض Lactic acid وترك ليبرد ثم وزع في أطباق بتري معقمة وأستعمل لعزل وتشخيص الفطريات من اللحوم.

#### 3-2-2-2 وسط اكار مستخلص جوز الهند (CEA) Coconut Extract Agar

حضر هذا الوسط حسب طريقة Saito and Machida (1999) بأضافة (100) غم من المبروش جوز الهند المتوفر في الأسواق الى (300) مل من الماء المقطر وسخن المزيج لمدة 20 دقيقة ، ثم رشح المزيج بقطعة من الشاش النظيف ، ثم أضيف 1.5 % من مادة الاكار وأكمل الحجم الى 300 مل بأضافة الماء المقطر ، وقد حضر الوسط للكشف عن الفطريات القادرة على أنتاج سم الافلاتوكسين.

### 3-2-3 عزل الفطريات وتنقيتها (Isolation and Purification of Fungi)

تم أخذ ثلاثة قطع بوزن 5 غم من مناطق مختلفة من كل عينة من اللحم بواسطة السكين والملقط معقمين وزرعت في أطباق بتري قطرها (9cm) حاوية على الوسط الزراعي PDA المحضر مسبقاً بمعدل ثلاث مكررات لكل عينة في مركز كل طبق في ظروف التعقيم ثم حضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة (25±2 م°) لمدة سبعة أيام مع المتابعة ، بعد ظهور النمو الفطري تم تنقية المزارع بأخذ مسحة من حافة المستعمرة بواسطة ابرة معقمة وأعيد تنميتها على نفس الوسط وحضنت لسبعة أيام أخرى في نفس درجة الحرارة السابقة وهكذا تم الحصول على مزارع نقية ، حفظت العينات في أنابيب اختبار بلاستيكية نظيفة ومعقمة حاوية على وسط PDA بصورة مائلة slant زرعت أقراص منها على الوسط الزراعي لمدة سبعة أيام ، وقد حضرت هذه الأوساط لغرض حفظ الفطريات مدة أطول والمحافظة عليها دون تلوث لحين اكمال الدراسة ، وحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م .



### 3-2-4 الكشف عن قابلية العزلات الفطرية على إنتاج السموم ability of fungal isolates to produce toxins

#### 3-2-4-1 باستخدام وسط جوز الهند ومحلول الامونيا

تم الكشف والتمييز بين العزلات التي تنتج السموم والعزلات غير المنتجة للسموم وذلك وفقا للطريقة التي ذكرها (Saito & Machida, 1999) ، بتتميتها على وسط جوز الهند المحضر مسبقا ولقح بمستعمرات نقية نمت على وسط PDA بعمر سبعة أيام من الفطريات المعزولة وحضنت لمدة سبعة أيام في الحاضنة بدرجة الحرارة  $25 \pm 2$  م وبعد ظهور الغزل الفطري تم وضع أوراق ترشيح مبللة بقطرات من محلول الامونيا بتركيز 20 % على غطاء الاطباق التي نمت عليها الفطريات واعيد حضنها لمدة أربعة أيام بصورة مقلوبة وتم تمييز الفطريات المنتجة للسموم من غيرها بتلون قواعد المستعمرات باللون الأحمر أو البرتقالي بدلا من اللون الشفاف (Saito & Machida, 1999) .

#### 3-2-4-2 باستعمال طريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة

تم تنمية عزلات الفطريات على وسط (PDA) وذلك بوضع أقراص من الفطريات المدروسة وبقطر 5 ملم بعمر أسبوع في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث (مكررات) لكل عزلة فطرية بعدها حضنت عند درجة حرارة  $25 \pm 2$  م ° لمدة أسبوع بعدها اختير طبق من كل عزلة وتم تقطيع الوسط الزراعي المنمى على عذلة الفطر بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بواسطة ابرة معقمة الى الخلاط كهربائي حاوي على 20 مل من الكلوروفورم وثم مزج الخليط لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ثم أخذ الراشح ووضع في دورق نظيف ومعقم ووضع في الفرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م ° إذ ركزت الكمية الى ما يقارب 1 مل فقط . تم الكشف عن وجود سم الافلاتوكسين B1 , باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة ( TLC ) ذات ابعاد (10\*20) سم حيث نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة ( 120 ) م لمدة ساعة قبل الاستعمال حيث اتبعت طريقة ( الجميلي . 1996). واستخدم نظام الفصل كلوروفورم: ميثانول 98: 2.

### 3-2-5 تشخيص الفطريات المعزولة Identification of Isolated Fungi

#### 3-2-5-1 التشخيص المظهري

شخصت العزلات الفطرية التي تم الحصول عليها بالاعتماد على الصفات المظهرية لمستعمرة والفحص المجهرى الدقيق بعد زراعتها على وسط (PDA) باستخدام المجهر الضوئي وبعده قوى تكبير اعتماداً على شكل الخيط الفطري وحسب المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Pitt ; Samson et al ., 2011 ; Hockyng , 2009) .

### 3-2-5-2 التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة

لغرض تأكيد التشخيص المظهري للفطريات المنتجة للسموم المعزولة من اللحوم تم إجراء تشخيص جزيئي باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction ( PCR ) لغرض تشخيصها على مستوى النوع حيث تم أنتخاب العزلات المنتجة للسموم والتي أظهرت اختلاف مظهري أما العزلات المتشابهة فلم ترسل للتشخيص الجزيئي وكانت عملية التشخيص تتضمن ثلاث خطوات رئيسية الأولى أستخلاص المادة الوراثية والخطوة الثانية هي إجراء فحص PCR والأخير تحليل المعلومات ببرنامح تحليل التشابه Blast ومعرفة نسبة التشابه بين عزلاتنا والعزلات العالمية ثم رسم الشجرة الوراثية لكل عزلة عن طريق برنامح Mega لمعرفة درجة القرابة بين الأنواع والسلالات الأخرى ومن ثم تسجيل تلك العزلات في البنك الجيني : GenBank

#### DNA extraction and Purification

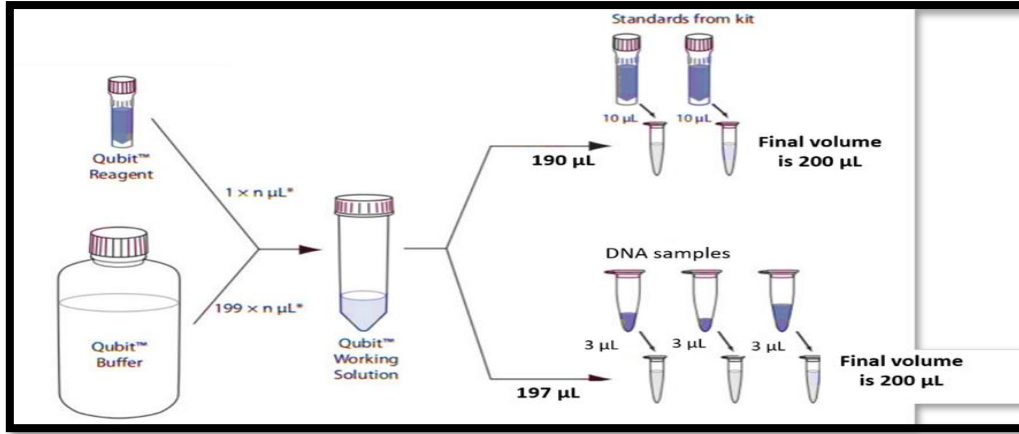
#### أولاً : استخلاص وتنقية ال DNA

لغرض عملية استخلاص وتنقية DNA من المستعمرات الفطرية المنتجة للسموم التي تم عزلها وتنقيتها بالاعتماد على ما ذكره Narayanasam (2011) وحسب الخطوات التالية :

1. جمعت العزلات الفطرية المنتجة للسموم بعمر 7 أيام ونقلها كلا على حده الى انبوبة اختبار ( Eppendorf tube ) معقمة سعة 1.5 مل مضافا اليها 400 مايكروليتر من المحلول الداري FAPG1 سحقت العينة باستخدام المدقة البلاستيكية الصغيرة ( Micropestle ) لتحطيم جدر الخلايا الفطرية مع رج العينة عدة مرات باستخدام جهاز الهزاز ( Vortex ) .
2. حضنت الانابيب الحاوية على الخليط لمدة 10 دقائق في حمام مائي بدرجة حرارة 65م مع الحرص على رج الانبوبة يدوياً 2-3 مرات أثناء فترة الحضانة .
3. اضيف 130 مايكروليتر من المحلول الداري FAPG2 الى الانابيب الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات بشكل جيد باستخدام جهاز الهزاز بعدها حضنت على الثلج لمدة 5 دقائق في هذه الخطوة تترسب البروتينات والسكريات المتعددة الخاصة بالفطر والمنظفات الخاصة بالمحلول الداري.
4. أجريت عملية الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 14000 دورة \ دقيقة ثم نقل المحلول الطافي الى الانابيب ذات اللون الارجواني نوع Q1Ashredder Mini spin column تحتوي على مرشح خاص وايضاً أجريت لها عملية الطرد المركزي ولكن لمدة 3 دقائق بالسرعة نفسها أعلاه يعمل مرشح هذه الانابيب على إزالة حطام الخلايا الفطرية ومعظم الرواسب .

5. نقل الراشح الى أنابيب اختبار جديدة معقمة سعة 2 مل واضيف اليه 700 مايكروليتر من المحلول الداريء FAPG وتم مزج المحتويات بواسطة ماصة صغيرة .
6. اضيف الايثانول بتركيز (96-100%) الى المحلول الداريء FAPG3 وتخلط جيداً.
7. نقل 750 ميكروليتر من الخليط باستخدام ماصة صغيرة إلى أنابيب ذات اللون الأبيض نوع Dneasy Mini spin column والتي أيضا تحتوي على مرشح خاص لغرض تنقية الـ DNA و جرت عملية طرد مركزي للأنابيب لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 دورة \ الدقيقة وبعدها تم التخلص من الراشح ونقل المتبقي من الخليط الى نفس الانابيب و جرت عملية الطرد المركزي بنفس الفترة الزمنية وبالسرع نفسها مع التخلص من الراشح أيضا .
8. اضيف 400 ميكروليتر من المحلول الداريء W1 الى نفس الانابيب أعلاه مع اجراء عملية طرد مركزي لها لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 دورة \ دقيقة بعدها تم التخلص من الراشح ثم أضيف مرة أخرى لنفس الانابيب 500 ميكروليتر من المحلول الداري W1 وأجريت عملية طرد مركزي لمدة دقيقتين بسرعة 14000 دورة \دقيقة بعدها تم التخلص من الراشح . الغرض من هذه الخطوة هو لتنقية الـ DNA العالق بالراشح .
9. وضعت الانابيب Dneasy Mini spin column بداخل انابيب اختبار معقمة سعة 2 مل وأضيف الى غشاء مرشح الانابيب 100 ميكروليتر من المحلول الداريء FAPG مباشرة وحضنت بعدها الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق ثم جرت عملية الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة بسرعة 14000 دورة \دقيقة للحصول على الراشح الذي يحتوي على الـ DNA الكلي الغرض من هذه الخطوة هو إزالة الـ DNA العالق بغشاء مرشح الانابيب ليكون مع الراشح
10. حفظت الانابيب الحاوية على الـ DNA الكلي تحت درجة حرارة 20 م لحين الاستعمال .

وهذه الخطوات موضحة في الشكل التالي (1-3)



شكل ( 1-3 ) استخلاص وتنقية DNA

ثانيا - برنامج التضاعف الخاص (ITS1-ITS4) تم تنفيذ هذه الخطوة عن طريق إضافة 12.5 ميكرو لتر من ماستر ميكس (OneTaq (NEB®) ، و 3 ميكرو لتر من عينة الحمض النووي ، و 1 ميكرو لتر 10 ميكرو لتر / ميكرو لتر من كل برايمر و 7.5 ميكرو لتر من ماء نوكلياز حر. التفاعل الذي يتم في ظل ظروف تفاعل البوليميراز المتسلسل المثلى للجين كما هو موضح في الجدول (7-3).

جدول ( 8-3 ) يوضح خطوات تضاعف DNA

الخطوات	الحرارة	الزمن	عدد الدورات
المسخ الاولي Denaturation	94 °C	5 mins	1
المسخ Denaturation	94 °C	30 sec.	30x
الربط Annealing	60 °C	45 sec.	
الاستطالة Extension	72 °C	45 sec.	
الاستطالة النهائية Final extension	72 °C	7 mins.	1

ثالثا : الترحيل الكهربائي

1- تحضير للهلام الأول -1 TAE Buffer X تم تخفيف 200 مل من المخزن المؤقت (TAE) 50x (M Tris 0.08 و M EDTA 0.02) إلى X10 عن طريق أخذ 200 مل من X TAE50 وإضافته إلى 800 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات (ddH<sub>2</sub>O) ، وإعادة تخفيف هذا المخزن المؤقت X10 إلى X1 (تركيز العمل) عن طريق أخذ 100 مل وإضافته إلى 900 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات (ddH<sub>2</sub>O).

## 2- تحضير جل الاكاروز 2%

- 1- تم قياس 60 مليلتر من X TAE1 المؤقت في أسطوانة حجمية.
- 2- تم وزن مسحوق الاكاروز 1.2 جم ل (2%) و 1.8 جم ل (3%) ووضعها في قارورة.
- 3- تم سكب X TAE1 المؤقت على الاكاروز لإذابته.
- 4- تم تسخين المحلول حتى الغليان باستخدام فرن الميكروويف حتى تذوب جميع جزيئات الجل.
- 5- تم ترك المحلول ليبرد إلى 70 درجة مئوية ، وأضيفت صبغة RedSafe سعة 4 ميكروولتر كصبغة تلوخي الحمض النووي.
- 6- انخفضت درجة حرارة المحلول إلى 50 درجة مئوية.
- 7- سكب محلول الاغاروز في صينية الجل.
- 8- سمح للمحلول بالتصلب في درجة حرارة الغرفة (20-25) دقيقة .
- 9- تم ملء الخزان ب 400 مل من X TAE 1 .

## 3- تحميل العينات في هلام

- 1- تم تحميل عشرة ميكروولتر من منتج PCR وسلم الحمض النووي في آبار الجل.
- 2- تم إصلاح جهد مصدر الطاقة في الغالب بين 80 فولت لمدة 80 دقيقة.
- 3- في نهاية التشغيل ، تم استخدام وثائق الهلام بكاميرا عالية الدقة لالتقاط الصور وتحليل البيانات .

## رابعا – تحضير محلول البرايمر

تم إعداد برايمر الدراسة من قبل الشركة الألمانية (QIAGEN ، ألمانيا) وإعدادها وفقا لتعليمات الشركة عن طريق أخذ 10 ميكروولتر من محلول المخزون واستكمال الحجم إلى 100 بيكومول / ميكروولتر بالماء منزوع الأيونات .

## خامسا – تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية

أرسلت منتجات تكرر الحمض النووي المعزولة من فطريات الدراسة إلى شركة Macrogen الكورية. تمت مقارنة نتائج تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليلها باستخدام أداة البحث عن المحاذاة المحلية الأساسية (BLAST) والمركز الوطني للمعلومات الفنية (NCBI)

### 6-2-3 جمع عينات النبات الهليون Collecting Plants

تم شراء نبات الهليون كأعشاب من محلات العشابين غير مطحونة وكانت الأعشاب تشمل سيقان وأوراق وجذور نبات الهليون ، ثم نقيت من الشوائب وطحنت بطاحونة كهربائية وحفظت في أكياس نايلون نظيفة ومعقمة لحين الاستعمال .



شكل ( 2-3 ) نبات الهليون

#### 6-2-3-1 تحضير المستخلص الكحولي لنبات الهليون

حضر المستخلص الكحولي بوزن 50 غم من مسحوق الجاف لنبات الهليون واضيف اليه 1000 مل من الكحول الايثيلي بتركيز (96%) ( Khanzada *et al.* , 2006 ) وذلك بأستخدام جهاز السكسوليت ثم تم ترشيح المستخلص بواسطة أوراق الترشيح Wattman 0.1 ومن ثم قمنا بتجفيف المستخلص بواسطة جهاز روتري البخاري ومن ثم صب في أطباق وغلف بواسطة السليفون وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام

#### طريقة تحضير تراكيز المستخلص الكحولي لنبات الهليون

تم تحضير التراكيز ( 0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5 ) ملغم \ مل حيث تم حساب التراكيز بحسب القانون  $C1V1=C2V2$  كما يلي :

- 1- تم اذابة 0.5 غرام من المستخلص في 100 مل وسط زرعي للحصول على التركيز 5 ملغم \مل.
- 2- تم اذابة 1 غرام من المستخلص في 100 مل وسط زرعي للحصول على التركيز 10 ملغم \مل .

3- تم اذابة 1.5 غرام من المستخلص في 100 مل وسط زرعي للحصول على التركيز 15 ملغم امل

4- تم اذابة 2 غرام من المستخلص في 100 مل وسط زرعي للحصول على التركيز 20 ملغم امل .

5- تم اذابة 2.5 غرام من المستخلص في 100 مل وسط زرعي للحصول على التركيز 25 ملغم امل .

### 3-2-6-2 اختبار تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات المنتجة للسّم الافلاتوكسين المعزولة من اللحوم :

حضر الوسط الزرعي PDA وعقم بجهاز المؤصدة وبرد الى درجة حرارة 45 م° واضيف اليه المضاد الحيوي Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم / لتر لتثبيط النمو الفطري ثم تم مزج المستخلص النباتي المجفف مع الوسط الزرعي بحسب طريقة Sundhakar وجماعته (2009) لتحضير التراكيز ( 0.5 و 1 و 1.5 و 2 و 2.5 ) ملغم / مل وسط زرعي بمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز وبعد تصلبه في الاطباق وضع قرص من الفطريات النامية بقطر 5 ملم على وسط PDA بعمر سبعة أيام في مركز الطبق ، تم استخدام سيطرة سالبة تضمنت طبق يحتوي وسط زرعي بدون أية إضافة لأي مادة ، وسيطرة موجبة وفيها اضيف المضاد الفطري Kenazole بتركيز 2 ملغم / مل الى طبق يحتوي وسط زرعي PDA ( الجنابي ، 2004 ) ، وحضنت الاطباق بدرجة حرارة ( 25 ± 2 ) لمدة 7 أيام ، ثم قيس قطر المستعمرة الفطرية النامية ( معدل قطرين متعامدين ) ، وسجلت النتائج وحسبت نسبة التثبيط المئوية حسب المعادلة التالية : ( Lima et al ., 1992 ; Wanchaitanawong et al ., 2005 ) .

النسبة المئوية للتثبيط = ( معدل قطر المستعمرة في اطباق السيطرة - معدل قطر المستعمرة في اطباق المعاملة / معدل قطر المستعمرة في اطباق السيطرة ) \* 100 %

### 3-2-7-7 الكشف عن المركبات الفعالة لنبات الهليون

#### 3-2-7-1 الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة لنبات الهليون

#### 3-2-7-1-1 الكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates Test

##### A- كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز

تم اذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر وأضيف اليها 2.5 مل من حامض الكبريتيك المركز لتحضير كاشف الفينول ، أضيف 5 مل من الكاشف إلى 5 مل من المستخلص ، ظهور اللون الأحمر البني هذا يدل على وجود الكربوهيدرات ( Meyer and Walther ,1988 ) .

### B \_ كشف مولش Molish Test

تم نقل 1 مل من المستخلص المائي والمستخلص الكحولي كل على انفراد إلى أنبوبة اختبار ، ثم أضيف إليه عدة قطرات من محلول ألفا - نفتول ، وبعد رج الأنبوبة جيداً أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) على جانب الأنبوبة ، فظهور حلقة بنفسجية في المحلول يدل هذا على وجود الكربوهيدرات ( Sofowora , 1993 ) .

### 3-1-7-2-2-1-2 الكشف عن القلويدات Alkaloids Test

#### A - كاشف ماير Mayer reagent

حضر الكاشف بتحضير محلولين ، المحلول الأول اضيف 1.36 غم من كلوريد الزئبقوز إلى 60 مل من الماء المقطر ، وفي المحلول الثاني تم اذابة 5 غم من يوديد البوتاسيوم KI في 10 مل من الماء المقطر ، وبعد مزج المحلولين الأول والثاني معل أكمل الحجم الى 100 مل بأستخدام الماء المقطر ، اضيف 3 مل من الكاشف إلى 5 مل من المستخلص ، يمكن أعتبار الكشف موجب في حالة ظهور راسب أبيض أو عكورة .

#### B \_ كاشف واكنر Wagner reagent

تم تحضيره من اذابة 1.3 غم من اليود (I<sub>2</sub>) مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر ظهور راسب بني يدل على وجود القلويدات .

### 3-1-7-2-3 الكشف عن التانينات Tannins Test

#### A - كشف خلات الرصاص Lead acetate Test

بعد تحضير محلول من خلات الرصاص بتركيز 1% ، أضيفت عدة قطرات منه إلى 0.5 مل من المستخلص النباتي ، فظهور راسب أبيض هلامي القوام دليل على وجود التانينات (Ahmed *et al* ., 1998) .

#### B - كشف كلوريد الحديدك Ferric Chloride Test

بعد تحضير محلول كلوريد الحديدك (FeCl<sub>2</sub>) بتركيز 1% ، اضيف قطرات منه الى 0.5 مل من المستخلص النباتي ، فكان ظهور لون اخضر مزرق دليلا على وجود التانينات (Adedayo *et al* ., 2001; Trease and Evans , 2002) .



### 4-1-7-2-3 الكشف عن الصابونيات Saponins Test

وضع المستخلص المائي والكحولي كل على انفراد في أنبوبة اختبار ورجت بشدة فظهور رغوة كثيفة تبقى لفترة طويلة دليلا على وجود الصابونيات ( Sowfowora , 1993 ).

### 5-1-7-2-3 الكشف عن الراتنجيات Resins Test

تم مزج 1 غم من المسحوق النباتي مع 10 مل من الكحول الايثيلي تركيزه 95 %، بعد ذلك وضع المحلول لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي بدرجة حرارة 100 م°، وبعد ترشيح العالق أضيف إليه 10 مل من حامض الهيدروكلوريد بتركيز 4%، فكان ظهور العكورة دليلا على الكشف الموجب (Shihata, 1951).

### 6-1-7-2-3 الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides Test

حضر كاشف فهلنك من إذابة 2.9 غم كبريتات النحاس الزرقاء في 40 مل من الماء المقطر وبعدها أضيف إلى 3 مل من المستخلصات النباتية ، فظهور اللون الأحمر الداكن يدل على وجود الكلايكوسيدات ( Adedayo et al ., 2001 ).

### 7-1-7-2-3 الكشف عن الفلافونات Flavonoids Test

بعد تحضير المستخلص المائي والكحولي للنبات تم مزج 1 مل منه مع 1 مل حامض الكبريتيك المركز  $H_2SO_4$ ، فتغير لون المحلول إلى الأصفر الداكن يدل على وجود الفلافونيدات (Al-Khazragi , 1991).

### 8-1-7-2-3 الكشف عن الفينولات Phenols Test

استخدم كاشف كلوريد الحديدك Ferric Chloride في الكشف عن الفينولات وقد حضر هذا الكاشف بأذابة 1 غم من كلوريد الحديدك  $FeCl_3$  في 100 مل من الماء المقطر ثم اضيف 3 مل من المستخلص المائي والكحولي الى 2 مل من الكاشف فعند ظهور اللون الأخضر المزرق يدل على وجود الفينولات ( Harbone , 1973 ).

### 9-1-7-2-3 الكشف عن الكومارين Caumarines Test

اتبعت طريقة ( Geisman , 1962 ) في الكشف عن الكومارين وذلك بوضع القليل من المستخلصات في انابيب اختبار وغطيت بأوراق ترشيح مبللة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم ( NaOH ) تركيزه 5% ووضعت الانابيب في حمام مائي لعدة دقائق ثم عرضت أوراق الترشيح الى مصدر للاشعة فوق البنفسجية فظهور لون اصفر مخضر براق يدل على وجود الكومارين .

### 10-1-7-2-3 الكشف عن الزيوت الطيارة Volatill Oils Test

اعتمدت طريقة ( Anthony ( 1976 ) في الكشف عن الزيوت حيث اخذ 10 مل من كل مستخلص ورشح كل على انفراد وبعد ان تشبعت أوراق الترشيح عرضت للاشعة فوق البنفسجية فاذا ظهر لون وردي براق يدل على وجود الزيوت الطيارة .

### 2-7-2-3 فصل وتشخيص المركبات الكيميائية لنبات الهليون بتقنية (GC-MS)

باستعمال جهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS) الموجود في جامعة الزهراء للنبات Al-Zahraa Center for Medical and Pharmaceutical Research Sciences (ZCMPRS), تم فصل وتشخيص المركبات الفعالة من مستخلص المركبات الخام للأجزاء النباتية الكاملة لأنواع قيد الدراسة *Asparagus officinalis* بتاريخ 2024/10/5 .

اذ خُلل المستخلص الايثانولي بواسطة جهاز GC-MS نوع SciON 436 من شركة Scion Instruments هولندي الصنع ويرتبط جهاز كروماتوغرافيا الغاز GC بجهاز الطيف الكتلي MS ووفقا للظروف الآتية :

عمود الفصل الشعري capillary column نوع SciON -5MS والذي سجل ابعاده

$$ID = 0.25\text{mm}, \text{ length} = 15\text{m}, \text{ df} = 0.25\mu\text{m}$$

1. استعمل غاز الهيليوم (99.99%) كغاز ناقل بسرعة جريان ثابتة 1 مل/ دقيقة.
2. حقن الجهاز بما يقارب 1 مايكرو لتر من المستخلص الايثانولي و بنسبة انقسام (1:15).
3. برمجة درجة حرارة الى 280 م° للحاقن ، و 250 م° للمصدر الأيوني.
4. تم برمجة درجة حرارة الفرن على 95 م° لمدة 3 دقائق، وبزيادة تصل الى 5 م° لكل دقيقة حتى تصل الى 210 م° ولمدة 3 دقائق ثم 280 م° بزيادة تصل الى 5 م° بالدقيقة لحين النهاية ولمدة 10 دقائق
5. تم القصف ب 70 الكترون فولت
6. الضغط داخل الجهاز: 10 psi , النطاق 1 m/z -2000 .
7. الوقت المحتسب لبدء تشغيل الجهاز وانتهاءه للعينة هو 53 دقيقة.
8. استعمال برنامج MS-Workstation بنسخته 8.2 المثبت على الجهاز لحساب ناتج الطيف الكتلي لكل مركب كمقدار نسبي لمتوسط مساحة قمته Peak Area على أجمالي المساحات Total area وكل هذه المعلومات تبرمج بشكل مباشر على الجهاز للعينة النباتية قيد الدراسة.

### تشخيص المركبات الكيميائية الخام

اعتماداً على نتائج الطيف الكتلي للمكون المجهول، شُخصت المركبات الكيميائية بمقارنتها مع البيانات المسجلة والمعتمدة لدى المعهد الوطني للقياس والتكنولوجيا National Institute of Standards and Technology (NIST) من خلال هوية المركب، ووزنه الجزيئي، وصيغته التركيبية والجزيئية .



لوحة (3-3) صورة لجهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف ال كتلة Gas Chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)

### 8-2-3 دراسة تقنية النانو

#### 1-8-2-3 التخليق الاخضر لجزيئات أكسيد الزنك النانوي

أتبعت الطريقة الموصوفة من قبل Bashi *et al.* (2013) مع بعض التحوير في تحضير المركب النانوي الهجين ، تحضير مادة ZnONPs بطريقة التخليق النباتي ، تم إضافة 34 غرام من  $ZnCl_2$  في 500 مل من الماء منزوع الايونات، ووضع المحلول على محرك مغناطيسي ، بعدها أضيف له 50 مل من مستخلص نبات الهليون قطرة قطرة بواسطة السحاحة مع التحريك المستمر بواسطة جهاز المازج المغناطيسي والتسخين عند  $45^{\circ}C$  لمدة ساعتين وأضافة الأمونيا و هيدروكسيد البوتاسيوم حتى تشكل راسب أصفر باهت مع المراقبة الأسس الهيدروجيني PH بواسطة أوراق خاصة لقياس PH إلى أن يصل إلى  $PH=12$  وترك المحلول النانوي ليوم كامل في المختبر ومن ثم قمنا بترشيح المحلول بواسطة أوراق الترشيح وغسل الراسب بواسطة الماء منزوع الايونات عدة مرات ومن ثم غسله بواسطة الكحول الايثانول وتم تجفيف الراسب بدرجة حرارة  $60^{\circ}C$  لمدة 8 ساعات ومن ثم طحنه بالهاون الخزفي جيداً للحصول على مسحوق ناعم وحفظ في الثلاجة لحين استخدامه في الدراسة.

### 2-8-2-3 اختبار تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO ومستخلص نبات الهليون في نمو

#### الشعاعي للفطريات *A. flavus* و *A. niger* و *A. oryzae* و *A. fumigatus*

أجريت عملية تقييم لمادة أكسيد الزنك النانوي ومستخلص الكحولي لنبات الهليون حيث تم تحضير محلول الأساس Stock Solution من تعليق 2 غم من المادة النانوية المحضرة مسبقاً في 10 مل من الماء منزوع الأيونات وأضيف إليه القليل من المادة المذيبة DMSO بتركيز 1% وأكمل الحجم إلى 100 مل وتريك على جهاز Magnetic Sterrir لمدة ساعتين وأخذت التراكيز ( 5 و 10 و 15 و 20 و 25 ) ملغم \ مل أضيف إلى الوسط الزراعي ( PDA ) الذي عقم بالمؤصدة لمدة 20 دقيقة تحت ضغط 1.5 جو ودرجة حرارة 121 م ° ، ثم لقت الأطباق بقرص قطره 5 ملم من الفطريات *A. flavus* و *A. niger* و *A. oryzae* و *A. fumigatus* مأخوذاً من مستعمرات نقية بعمر 7 أيام كل على حدا فضلاً عن تلقيح أطباق خالية من المادة النانوية والمستخلص لغرض المقارنة علماً أن كل المعاملات والمقارنة قد كررت ثلاث مرات . حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 27 ولمدة أسبوع وتم حساب النسبة المئوية للتنشيط وفق المعادلة الآتية :

$$\text{نسبة التنشيط \%} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في اطباق السيطرة} - \text{معدل قطر الفطر في اطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر الفطر في اطباق السيطرة}} * 100$$

### 3-8-2-3 تشخيص المركبات النانوية

استخدمت خمسة طرائق لتشخيص أكسيد الزنك النانوي الهجينة قيد الدراسة ، أشتملت هذه الطرائق مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultraviolet visible spectrophotometer مطياف الأشعة تحت الحمراء ( FTIR ) Fourier transform infrared spectroscopy فضلاً عن استخدام مجهري طيف حيود الأشعة السينية ( XRD ) X-ray diffraction المجهر الإلكتروني الماسح ( SEM ) Scanning Election Microscope ومجهر القوى الذرية Atomic Force Microscopy (AFM) .

#### 1. مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UV) Ultraviolet visible spectrophotometer

تم توصيف جزيئات أكسيد الزنك المحضرة وأستقرار هذه الجزيئات عن طريق أذابة 0.1 غم من جزيئات أكسيد الزنك النانوية المخلفة في 10 مل من Dimethyl Sulfoxide ثم عرضت للموجات فوق الصوتية لمدة 15 دقيقة ثم قيست في جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية إذ تم رصد كل من الفحص البصري والقياسات الأمتصاصية تم عمل تصفير للجهاز بواسطة المادة المستعملة بالأذابة ومن ثم قيست العينة بعد ذلك تتراوح نتيجة قراءة مطيافية جزيئات أكسيد الزنك النانوية عن طول

موجي من 200 نانوميتر الى 800 نانوميتر . ويستعمل هذا الفحص للتأكد من تكون جزيئات أكسيد الزنك النانوية ( Chauhan *et al* ., 2015 ; Pavani *et al* ., 2011 ) .

## 2. التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared Spectroscopy ( FTIR )

سجلت مطيافية الأشعة تحت الحمراء لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة ضمن المدى من 4000-400 سم وبأستعمال أقراص بروميد البوتاسيوم اذ اخذ جزء من المادة المذابة 0.01 غم في 10 مل من المحلول Dimethyl Sulfoxide وعرض الى جهاز الموجات فوق الصوتية لكي تذوب المادة بالمحلول بشكل كامل من ثم مزجت مع أقراص بروميد البوتاسيوم من ثم حولت الى كريات بأستعمال ضغط عال ناتج عن استعمال مكبس هيدروليكي وادخلت في الجهاز . الهدف من استعمال الجهاز هو تحليل المجاميع الموجودة في المادة المحضرة ( Hassan *et al* ., 2013 ; Rajan *et al* ., 2016 )

## 6- مجهر حيود الأشعة السينية (XRD) X – ray diffraction :

تم تحليل التوصيف الهيكلي من اجل الحصول على معلومات حول حجم الجسيمات ، التركيب البلوري وشكل الاسطح بواسطة جهاز من نوع ( Shimadzu 600 ) بأستعمال حزمة أحادية اللون من النحاس ذات طول موجي ( 0.15406nm ) في التشغيل ( 40 كيلوفولت ) وبتيار 30 امبير وسرعة مسح ( 0.02deg/s ) وضمن مدى زاوي مقداره  $2\theta=(60-0)$  وبفتحة لدخول الأشعة قطرها ( 0.3 ) ملليمتر ، وضعت المادة المراد فحصها بشكل مسحوق على شريحة زجاجية حاوية على ركيزة من السليكون ، ( Baskar *et al* ., 2013 ) .

## 7- المجهر الالكتروني الماسح ( SEM) Scanning election microscope :

يعتمد هذا الجهاز على مسح سطح العينة بواسطة شعاع الكترون مركز بدقة لغرض الحصول على صور مجهرية لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة مع التحقق من تجانس المادة المفحوصة ( Elkady *et al* ., 2015 ) . يتم قياس ومطابقة الأبعاد النانوية المظهرية لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة ( Shamsuzzaman *et al* ., 2013 ) . غلفت العينة بالذهب لضمان التوصيل الكهربائي ( Vielkind *et al* ., 2013 ) .

### 8- المجهر القوى الذرية (AFM) Atomic Force Microscopy :

تمت دراسة شكل الاسطح وجغرافيتها لجزيئات أكسيد الزنك المحضرة بواسطة هذا المجهر أذ اخذ 0.1 غم من المادة المراد فحصها وذوبت في 10 مل من Dimethyl Sulfoxide ثم عرضت للموجات فوق الصوتية لمدة 20 دقيقة . بعد ذلك تم إجراء التحليل وفق تعليمات قياسية ( Jayaseelan *et al* ., 2013 ; Nagarajan and Kuppusamy , 2012 ) .

### 3-2-9 التحليل الاحصائي

أستخدم اختبار تحليل التباين الثنائي بالتفاعل لدراسة الفروق بين المستخلصات والتراكيز المختلفة ، كما أستخدم اختبار اقل فرق معنوي ( L.S.D) Least significant difference بين المتوسطات ( ساهوكي ووهيب ، 1990 ) ، وتم استخدام البرنامج الاحصائي Spss V.25 لعمل التحليلات الإحصائية .

**الفصل الرابع**

**النتائج والمناقشة**

**Results and**

**Discussion**

#### 1-4 عزل الفطريات من اللحوم

أوضحت نتائج عزل الفطريات من عينات اللحوم التي جمعت عشوائياً من الأسواق المحلية في محافظة كربلاء المقدسة ، كما موضح في الجدول ( 1-4 ) :

الجدول ( 1-4 ) عينات اللحوم التي تم جمعها لعزل الفطريات منها

ت	منتجات اللحوم	العدد الكلي للعينات
1	اللحم الأحمر ( الغنم والعجل )	20
2	الكبد	2
3	الشحم	2
4	صدر دجاج	3
5	دجاج ذبح	4
6	افخاذ دجاج	3
7	كبد دجاج	2
8	نقانق دجاج	2
9	نقانق لحم	2
10	لحم مفروم	3
11	كباب لحم	1
12	كباب دجاج	1
	المجموع	45

توفر اللحوم ومنتجاتها وسط نمو ممتاز لمجموعة متنوعة من الكائنات الدقيقة ومنها الفطريات ، وبعضها مسببات الأمراض ( Jay et al ,2005 ) . قد يحدث تلوث منتجات اللحوم بالعفن في المراحل المختلفة التي يتم فيها تحضير المنتجات ، فقد يحدث أثناء ذبح الحيوانات في ظل ظروف صحية سيئة باستخدام المياه والمعدات والأواني الملوثة أو أثناء المعالجة بإضافة إضافات للحوم ملوثة بأبواغ العفن أو أثناء التعبئة . المناولة والنقل والتخزين ( Morshdy et al ,2015 ) .

ينظر تلوث اللحوم بمختلف أنواع العفن خطراً حقيقياً لأنه يؤثر على جودة منتجات اللحوم هذه بوساطة زيادة احتمالية فسادها وتدهورها . الجانب الأكثر أهمية في تلف العفن في الطعام هو تكوين السموم الفطرية . أكثر أنواع السموم الفطرية شيوعاً والأكثر خطورة هي الافلاتوكسينات ، وهي المستقلبات الثانوية السامة الرئيسية لبعض أنواع الرشاشيات مثل *A. flavus* و *A. Parasiticus* و *A. Nomius* ( Alcaid – Molina ، 2009 ؛ Morshdy et al ,2015 )



تظهر بعض الفطريات تأثيراً مباشراً أقل، ولكنها يمكن أن تؤثر بطرق عديدة غير مباشرة. ولكن الرشاشيات هي من هذه الفطريات التي تصيب الانسان بها. فهو لا يسبب الأمراض فحسب، بل يسمم النظام الغذائي البشري أيضاً. بعض الأنواع *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* هي فطريات منتجة للمواد السامة ويمكن أن تلوث الغذاء وتنتج الافلاتوكسينات وغيرها (Medeiros et al, 2011).

يمكن أن يكون تلوث منتجات اللحوم بالافلاتوكسين قد نشأ أما من الأنسجة الحيوانية التي كانت تتغذى سابقاً على أعلاف ملوثة بالافلاتوكسين أو عن طريق استخدام المكونات الملوثة بالافلاتوكسين ، على سبيل المثال الحبوب (Zohri et al, 1995).

#### 4-2 تشخيص الفطريات المنتجة للافلاتوكسين

من هذه الدراسة تم الحصول على خمس أنواع فطرية منتجة لسم الافلا تعود جميعها للفطر *Aspergillus* وهي كالاتي *A.flavus* و *A.niger* و *A.oryzae* و *A.fumigatus*

#### 4-2-1 التشخيص المظهري والمجهري للفطريات المعزولة

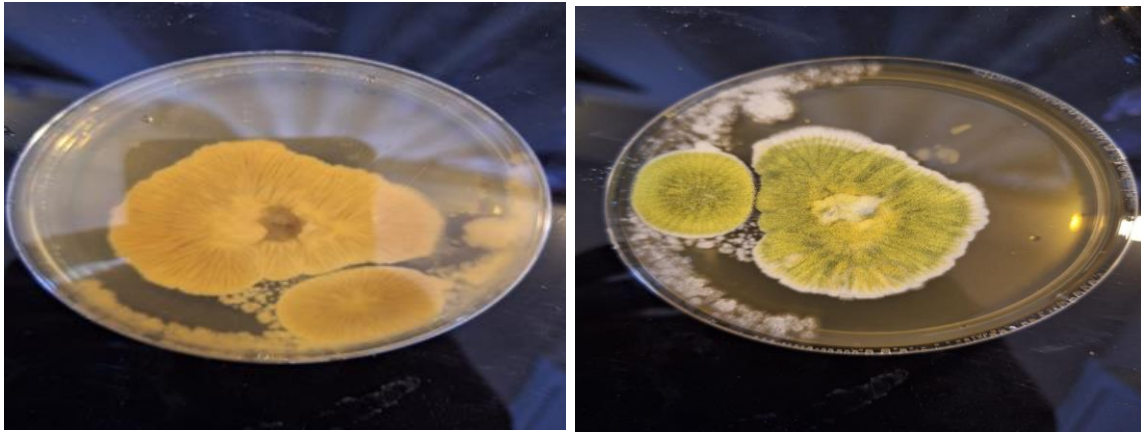
##### أولاً: الفطر *Aspergillus flavus*

##### الوصف العام والتواجد:

فطر خيطي متفرع يمتلك معقد انزيمي عالي لتحطيم المواد الغذائية والحصول على الغذاء يعيش على النباتات الميتة وأنسجة الحيوانات في التربة مترمم على هذه البقايا، ممكن أن يعيش هذا الفطر كمرض pathogenic على العديد من النباتات وأنواع من الحيوانات ومن ضمنها الانسان. ينمو هذا الفطر على مصادر الغذاء يكون غالباً مصاحب لتلوثها بالافلاتوكسين وهو أحد أشهر السموم المسرطنة وهو الفطر الأشهر والأول في إنتاج هذا السم حتى أن تسمية (Aflatoxin) اشتق من أسم هذا النوع (*A. Flavus*). كما يسبب مرض aspergillosis للإنسان في حالة استنشاق كميات كبيرة من سبورات هذا الفطر وهو مرض رئوي شبيه بمرض السل غالباً ما يعاني الأشخاص المصابين بهذا الفطر من ضعف أو نقص في جهاز المناعة ينمو بمديات حرارية واسعة (25-42) م<sup>o</sup> (Gomi, 2014; Pit and Hocking, 2009).

### الصفات المظهرية والمجهريّة:

تكون مستعمرات مخملية معتدلة الكثافة خضراء مصفرة على وسط PDA ظهر الطبق عديم اللون أو بني يكون كونيدات صغيرة باللون الأصفر والأخضر تتحول إلى اللون الرصاصي الغامق مع تقدم عمر المستعمرة تكون كروية أو شبه كروية محاطة بجدار سميك عادة خشن ونادراً أملس (ناعم). تظهر المتبولات Metulae والفياليدات Phialides واضحة وأحياناً يمكن مشاهدة الفياليدات فقط (Varga et al, 2011; Bharathi et al, 2003)



السطح السفلي للمستعمرة

السطح العلوي للمستعمرة

شكل ( 1-4 ) الصفات المظهرية للفطر *Aspergillus flavus* على وسط PDA وبعمر سبعة أيام وبدرجة حرارة 27 م

ثانياً : الفطر *Aspergillus oryzae*

### الوصف العام والتواجد:

يلعب هذا الفطر دوراً محورياً في صناعة الأغذية الآسيوية مثل الساكي والسوشي والشويو (صلصة الصويا) منذ آلاف السنين تم استخدامه لصنع الأطعمة والمشروبات المخمرة فضلاً عن استخدامه في إنتاج الإنزيمات الصناعية لمعالجة الأغذية ويعتبر فطر آمن من ناحية استخدامه في الأغذية، هو فطر هوائي خيطي ينتمي إلى مجموعة *Aspergillus Subgenus section flavi* والتي كانت تعرف سابقاً بمجموعة *A. flavus* تضم هذه المجموعة فطريات مهمة جداً صناعياً مثل النوع *oryzae* وفطريات أخرى مهمة طبيياً مثل *A. parasiticus* والتي تمتاز بإنتاج مواد مسرطنة مثل سم الأفلاتوكسين من الناحية التصنيفية يرتبط *A. Oryzae* ارتباطاً وثيقاً بـ *A. parasitics* و *A. flavus* و *A. sojae* ومن ثم الارتباط الوثيق إلا أن *A. sojae*

*A. oryzae* لا تنتج ابدأ الافلاتوكسين وبالتالي تستخدم في تصنيع الأغذية المخمرة, تم عزل الفطر *Oryzae* من التربة والنباتات خصوصاً الرز. (Pit and Hocking , 2009).

### الصفات المظهرية والمجهريّة:

وهو فطر خيطي متعدد الأنويه، بهيايات مقسمة تمتاز بالنمو السريع من الأطراف القمية للنهايات التي تمتاز بالتفرع تكون المستعمرات في البداية بيضاء اللون ثم تتحول إلى الخضراء المصفرة مع انتاج كميات كبيرة من السبورات اللاجنسية (conidia) ومع مرور الوقت وعند قدم المستعمرة تتحول إلى اللون البني أو أخضر مع ظلال بنية، الكونيدات متعددة النوى، كروية الشكل إلى بيضاوية. *Et al* (Woudenberg ,2015 )



السطح السفلي للمستعمرة



السطح العلوي للمستعمرة

شكل ( 2-4 ) الصفات المظهرية للفطر *Aspergillus Oryzae* على وسط PDA وبعمر 7 أيام وبدرجة حرارة 27 م

ثالثاً : الفطر *Aspergillus niger*

### الوصف العام والتواجد :

أحد أشهر أنواع الفطريات على الإطلاق، الاسم *Aspergillus niger* الذي كان مستخدماً طوال معظم هذا القرن، سبقته أسماء أخرى لها الأولوية بموجب قانون علم النبات. لكن تم الاحتفاظ بأسم *Aspergillus niger* من قبل المؤتمر النباتي الدولي في عام 1993 (Greuter et al., 1994), أظهرت الدراسات الجزيئية أن *A. niger* يتكون من نوعين، *A. niger* و *A. Tubingensis*, تم فصلهما في البداية عن طريق تحليل ( Varga et al., 1991 ; RFLP Kusters-van Sommeren et al., )

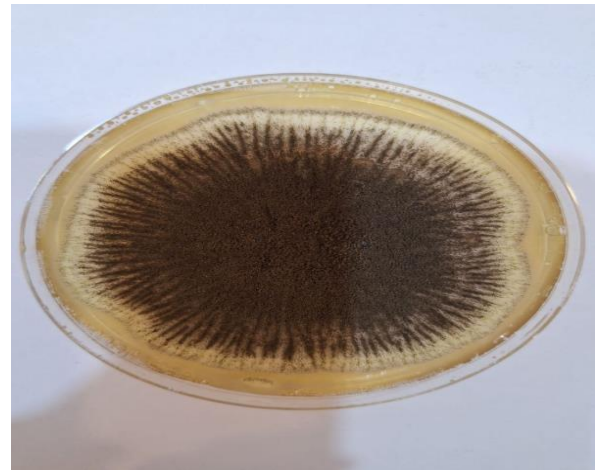
(1994) ثم لاحقاً عن طريق تحليل التسلسل sequence analysis (Peterson, 2000). لا يمكن التمييز بين النوعين من الناحية الشكلية، ولأغراض عملية، يمكن إطلاق تسمية *A. niger* على النوعين. يعتبر من الفطريات الأكثر شيوعاً التي يتم الإبلاغ عنها في الأطعمة، فهو أكثر انتشاراً في المناخات الأكثر دفئاً، سواء في المواقع الميدانية أو الأطعمة المخزنة. تمتلك الجراثيم السوداء التي يكونها الحماية من أشعة الشمس والأشعة فوق البنفسجية، مما يوفر ميزة تنافسية (Valero et al, 2007), تم عزله من العديد من الأغذية بما فيها الأغذية المجففة مثل الأسماك المجففة والمدخنة والمملحة، وحبوب الكاكاو والتوابل, كما يعتبر من أكثر أنواع *Aspergillus* شيوعاً المسؤولة عن تحلل الفاكهة الطازجة بعد الحصاد، بما في ذلك التفاح والكمثرى والخوخ والحمضيات والعنب والتين والفاصوليا والمانجو والبطيخ. (Snowdon, 1990 ; Pitt and Hocking, 1997)

### الصفات المظهرية والمجهريّة :

ظهرت المستعمرات على أجار دكستروز البطاطا (PDA) بلون بني غامق مع حواف بيضاء فاتحة إلى صفراء، أما ظهر المستعمرة فقد كان عديم اللون، كانت المستعمرات الفطرية تنقر إلى أي إفرازات. تميزت المستعمرات بالنمو السريع، حيث وصل قطرها إلى 7-8 سم في غضون 7 أيام. تميزت عزلات الفطر بأبواغ شفافة سوداء اللون محمولة على حوامل كونيديية تراوحت أقطارها بين 3 ملم طولاً و1.5 ملم عرضاً. كانت عديمة اللون في بداية النمو ثم تحولت إلى اللون الأسود مع تقدم العمر. رؤوس الأبواغ كبيرة، كروية الشكل، كروية إلى شبه كروية عند التكتل ومعظمها 3-4 ميكرومتر، الحويصلات لامعة شفافة إلى بنية اللون، فياليدات شفافة أمبولية الشكل. (Zhang et al, 2009).



السطح السفلي للمستعمرة



السطح العلوي للمستعمرة

شكل ( 3-4 ) صفات المظهرية للفطر *Aspergillus niger* على وسط PDA بعمر سبعة أيام ودرجة حرارة 27 م .

### رابعاً : الفطر *Aspergillus fumigatus*

#### الوصف العام والتواجد :

الموطن الرئيسي لفطر *Aspergillus fumigatus* هو النباتات المتحللة، وخاصة العشب، وحبوب الكاكاو أثناء التخمر وبعده وفي العديد من التوابل، وقد تم تسجيله بشكل متكرر من السلع المخزنة في المناطق الاستوائية، حيث توفر قدرته على النمو في وقت واحد عند درجات حرارة منخفضة وعالية ميزة بيئية، على سبيل المثال البذور الزيتية المخزنة والبيض المخزن، جوز الهند وفول الصويا والخضروات. (Pitt and Hocking, 1997).

#### الصفات المظهرية والمجهرية :

تمتاز مستعمرات الفطر على وسط البطاطا دكستروز اكار (PDA) بقطر 40-60 ملم، مسطحة أو مجعدة قليلاً، منخفضة، كثيفة ومخملية أو ذات نمو مفرط متفرق ومتكتل، بيضاء، الأبواغ محمولة في طبقة متواصلة ومضغوطة بكثافة، فيروزية رمادية إلى داكنة، قد ينتج الفطر إفرازات شفافة أحياناً بكميات صغيرة، لون المستعمرات رمادية إلى رمادية مزرقّة إما ظهر المستعمرات فقد كان شاحب أو أخضر مائل إلى اللون الرمادي.



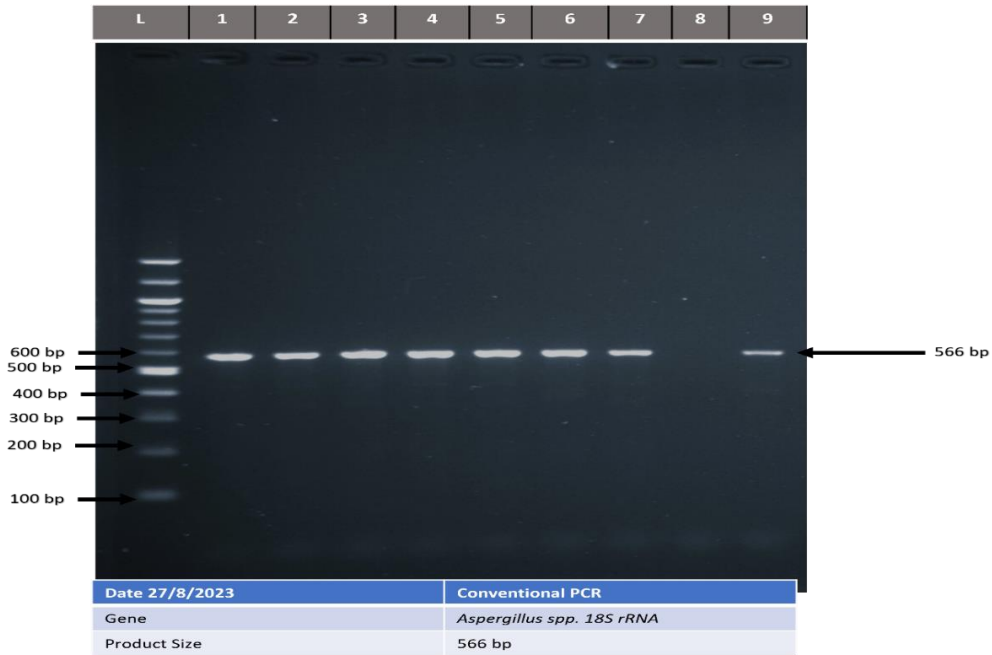
السطح السفلي للمستعمرة

السطح العلوي للمستعمرة

شكل ( 4-4 ) صفات المظهرية للفطر *Aspergillus fumigatus* على وسط PDA وبعمر 7 أيام وبدرجة حرارة 27 م .

#### 2-2-4 التشخيص الجزيئي للفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين

أوضحت نتائج التشخيص الجزيئي مدى التقارب والتشابه بين الفطريات المسجلة وقد استخدمت الشجرة الوراثية لمعرفة ارتباط الأنواع الخاصة لكل جنس مع النوع المطلوب تحديده فضلاً عن الخصائص المظهرية كطريقة للتوصل إلى التشخيص الدقيق إضافة إلى التشخيص بالطريقة التقليدية . كما أن تحديد النمط الجيني مهم جداً في تصنيف الفطريات وقد استعملت منطقة 18S rRNA بصورة كبيرة في التشخيص الجزيئي والتصنيف الجين 18S rRNA يستخدم على نطاق واسع في التشخيص الجزيئي للفطريات لعدة أسباب منها : سهولة تضخيمه ودقة في تحديد الأنواع على مستوى الجنس أو النوع والسرعة والتكلفة المنخفضة والأهمية من استخدام الجين 18S rRNA في تشخيص الفطريات هي التعرف السريع والدقيق على الفطريات والكشف عن أنواع مختلفة من الفطريات وتوفر قواعد بيانات ضخمة للمقارنة ، وقد تم استخدام تضخيم منطقة 18S الخاصة ب rRNA لغرض تحديد الأنواع حيث تم فحص تسلسل الحمض النووي وذلك للتأكد من تسلسل النيوكلييدات ثم بعد ذلك مقارنتها بالسلالات العالمية الأخرى . وتم استخدام البرامج BLAST-NCBI وقد أعطى نتائجاً دقيقة بمقارنتها مع السلالات العالمية كما تم استخدام برنامج التحليل الوراثي التطوري الجزيئي ( BLAST ) الذي يعد من التطبيقات التي تم تصميمها بصورة خاصة للتحليل المقارن لتسلسل الجينات المتماثلة والعلاقات التطورية والنمط الذي يحدث في تطور الحمض النووي والبروتين وكذلك يعطي وكذلك يعطي برنامج MEGA الكثير من التسهيلات عبر بيانات تسلسلية من مستويات بيانات شبكة الأنترنت التي يمكن عرضها على شكل أشجار ( Kumar,et al , 2008 ) .



شكل ( 4-5 ) يبين تفاعل البلمرة المتسلسل ( PCR ) وتحديد منطقة الجين 18S rRNA

لغرض تأكيد التشخيص المظهري للفطريات ال 5 المنتجة لسم الافلاتوكسين اختبرت عزلة لكل فطر لغرض تشخيصها جزيئاً إذ أن جميع الفطريات المعزولة في هذه الدراسة قد أحتوت على حزمة مفردة من الحامض النووي المستخلص وقد تم قياس نقاوته بواسطة استخدام جهاز الطيف المرئي Spectrophometer تحت أطوال موجية 500 و 600 نانوميتر وان نتائج التحليل للجين rRNA 18S موجبة لجميع الفطريات وتم استخدام نفس البادئات في تحديد تتابع القواعد النايتروجينية لجميع الفطريات المراد تشخيصها والتي أودعت في قاعدة بيانات GenBank التابعة للمركز الدولي لمعلومات التقانات الأحيائية (NCBI) National Center of Biotechnology Information أظهرت النتائج أن جميع الفطريات تفاعلت جينوماتها مع البادئ وتطابقت مع نظيراتها بنسبة 99-100% وتعد أول تسجيل لهذه الأنواع من العراق بحسب ما موضح في معلومات التسجيل ودراسة التقارب والتشابه بين الفطريات المسجلة وقد حدد العزلة الأولى *Aspergillus flavus* الرمز التسلسلي PQ654182 والرمز التسلسلي PQ654183 والعزلة الثانية *Aspergillus niger* الرمز التسلسلي PQ654181 والعزلة الثالثة *Aspergillus oryzae* الرمز التسلسلي PQ654184 والعزلة الرابعة *Aspergillus fumigatus* الرمز التسلسلي PQ654185 كما موضح في الجدول ( 2-4 ) :

جدول ( 2-4 ) الأرقام التسلسلية للعزلات الفطرية في البنك الجيني GenBank

ت	العزلة	اسم الفطر	الرقم التسلسلي في البنك الجيني
1	العزلة الأولى	<i>Aspergillus flavus</i>	PQ654182 PQ654183
2	العزلة الثانية	<i>Aspergillus oryzae</i>	PQ654185
3	العزلة الثالثة	<i>Aspergillus niger</i>	PQ654181
4	العزلة الرابعة	<i>Aspergillus fumigatus</i>	PQ654184

### 4-2-3 تحديد تسلسل القواعد النتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية والشجرة الوراثية Phylogeny

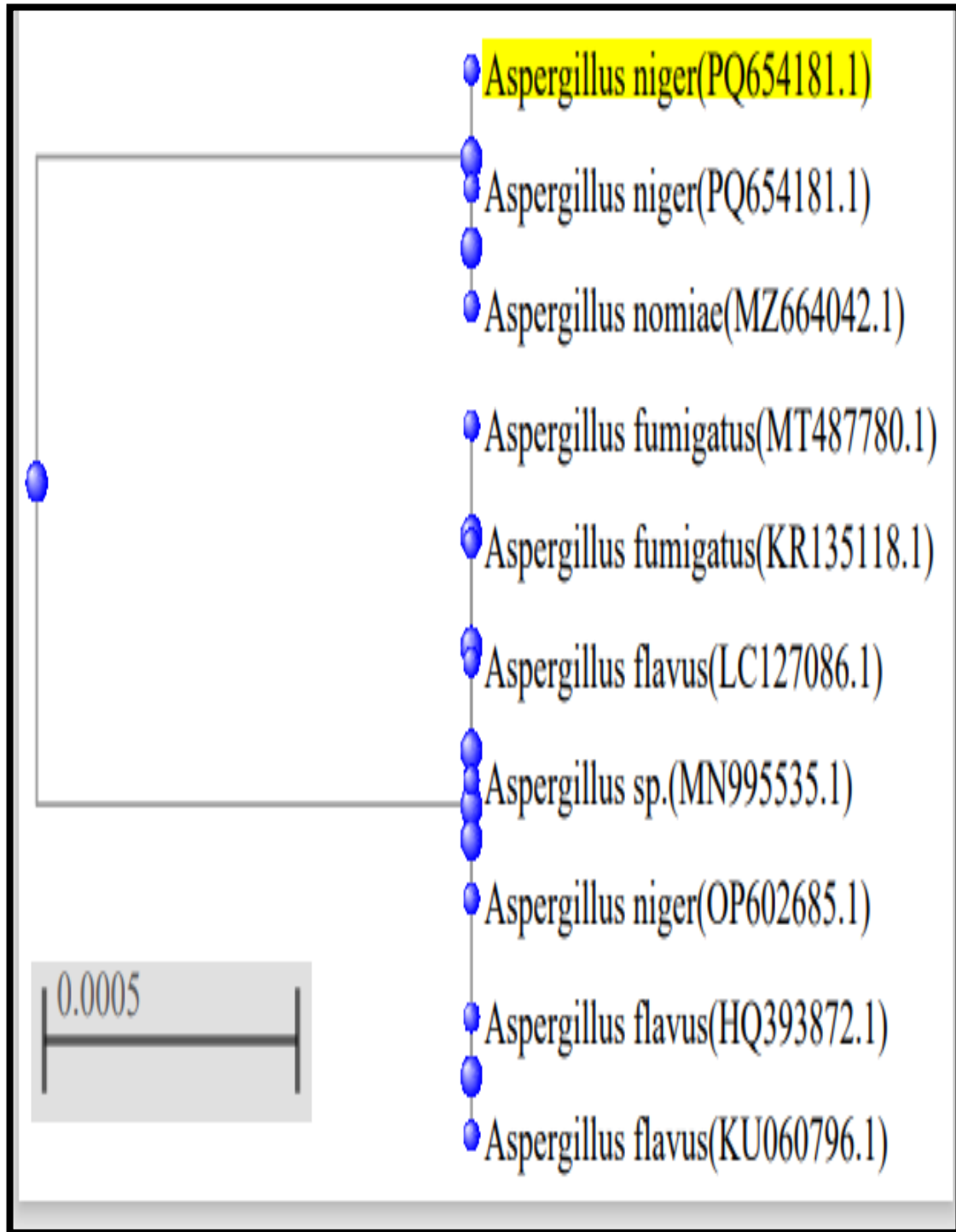
بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النتروجينية (Nucleotide Sequence) لحزم الحامض النووي المضاعف وباستعمال برنامج N.S.B.I و Mega/6 وبمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز العالمي لمعلومات التقانات الاحيائية (NCBI) والعائدة للفطر *Aspergillus niger* المشخص والمسجل في البنك الجيني والتي تحمل الرقم التسلسلي PQ654181 مطابقة بنسبة 100% مع العزلة المعزولة في الصين ، وبنسبة 99% مع العزلات الأخرى المعزولة في كل من مصر والهند والصين وتايلند والعربية السعودية .

جدول (3-4) مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر *A.niger* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	اسم السلالة
Kerbala/ Iraq	PQ654181.1		<i>Aspergillus niger</i>
China	MZ664042.1	100%	<i>Aspergillus nomiae</i>
Egypt	KU060796.1	99%	<i>Aspergillus flavus</i>
India	HQ393872.1	99%	<i>Aspergillus flavus</i>
China	MT487780.1	99%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
China	KR135118.1	99%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Thailand	LC127086.1	99%	<i>Aspergillus flavus</i>
Saudi Arabia	MN995482.1	99%	<i>Aspergillus terreus</i>
India	OP602685.1	99%	<i>Aspergillus niger</i>



يبين الشكل (4-6) تحليل الشجرة الوراثية للفطر *A niger* حيث أظهرت النتائج تطابقها بنسبة 100% مع العينة الصينية والتي تحمل الرقم التسلسلي MZ664042.1 ، وتطابقت بنسبة 99% مع العزلات الأخرى .



الشكل (4-6) شجرة التطور الوراثي للفطر *Aspergillus niger* ( محددة بالون الاصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه .

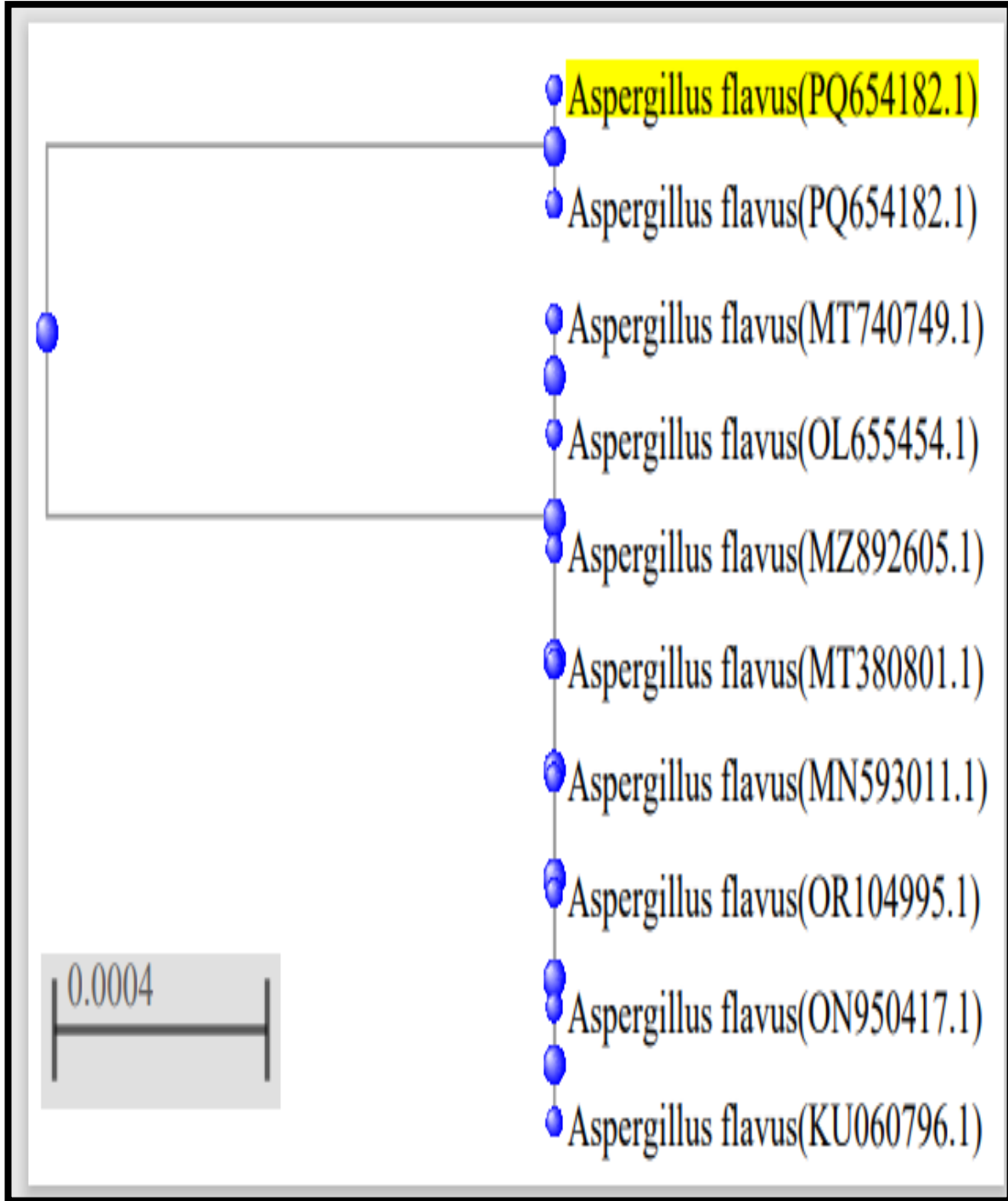
## Results and discussion.....النتائج والمناقشة

يبين الجدول (4-4) مقارنة تسلسل الجين 18S rRNA للفطر *Aspergillus flavus* والتي تحمل الرمز التسلسلي PQ654182 مطابقة بنسبة 99% مع العزلات الأخرى المعزولة كل من مصر والهند وتايلند والصين .

جدول (4-4) مقارنة تسلسل القواعد النروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر *A.flavus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI:

المنشأ	الرقم التسلسلي	النسبة المئوية	اسم العزلة
Iraq	PQ654182.1		<i>Aspergillus flavus</i>
Egypt	OL655454.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
India	(MT740749.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
India	(MN826320.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
Thailand	(MZ892605.1)	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
India	(MT380801.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
Egypt	(MN593011.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
India	(OR104995.1)	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
China	ON950417.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>
Egypt	KU060796.1	99.81%	<i>Aspergillus flavus</i>

يبين الشكل (4-7) تحليل الشجرة الوراثية للفطر *A.flavus* أظهرت النتائج تطابقها بنسبة 99% مع كل العزلات الموجودة ف مصر والهند وتايلند والصين



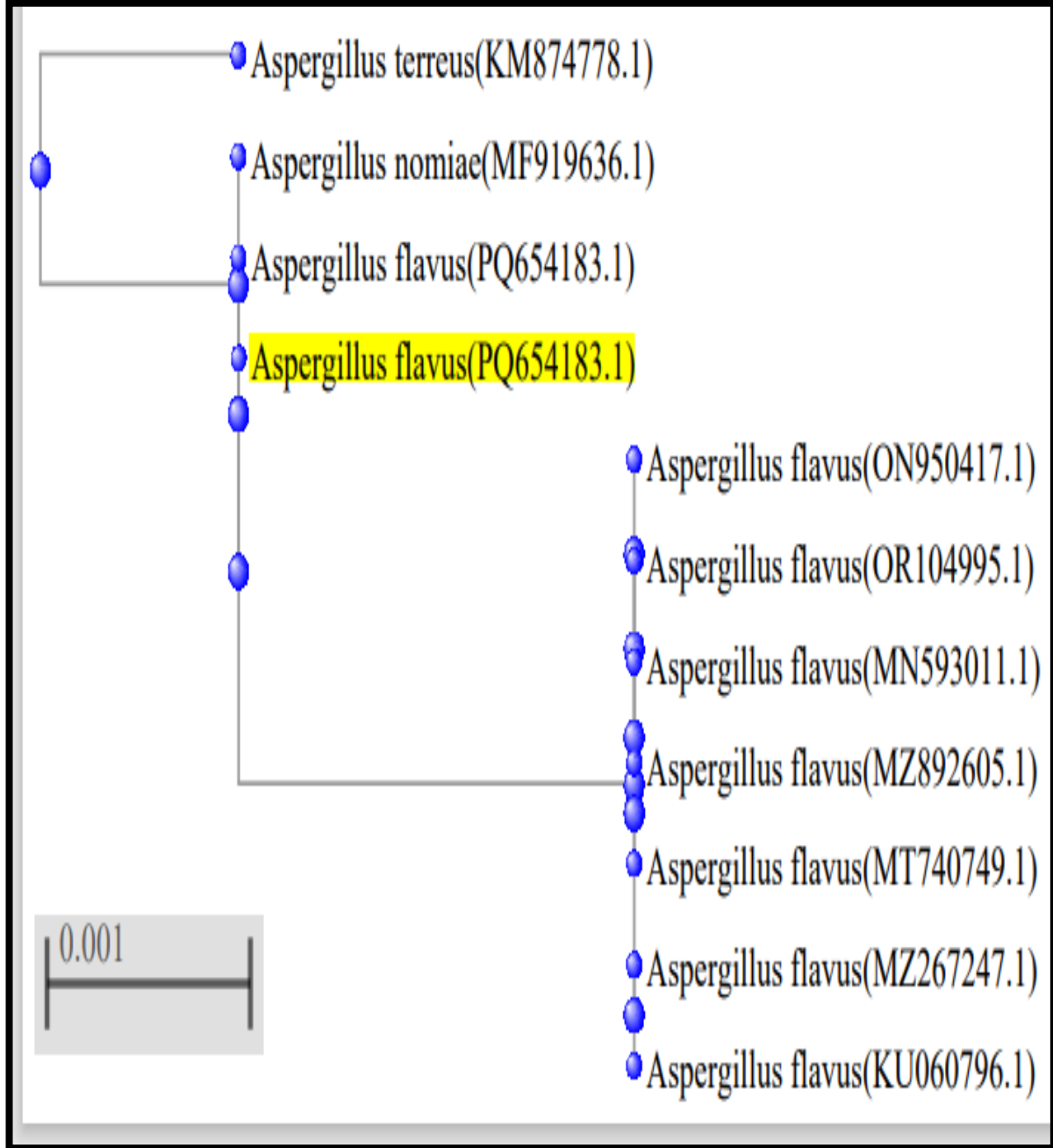
الشكل ( 4-7 ) شجرة التطور الوراثي للفطر *Aspergillus flavus* ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود الى الجنس نفسه .

يبين الجدول (4-5) مقارنة العزلة للفطر *Aspergillus flavus* والتي تحمل الرمز التسلسلي PQ654183 تطابقها بنسبة 100% مع العزلة الموجودة في تايلند وتطابقها بنسبة 99% مع العزلات الموجودة في كل من الولايات المتحدة الأمريكية والصين والهند ومصر وتايلند .

جدول (4-5) مقارنة تسلسل القواعد النتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر *A. flavus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالمياً في NCBI

اسم العزلة	النسبة المئوية	الرقم التسلسلي	المنشأ
<i>Aspergillus flavus</i>		(PQ654183.1)	Iraq
<i>Aspergillus terreus</i>	99.81%	(KM874778.1)	USA
<i>Aspergillus nomiae</i>	100.00%	(MF919636.1)	Thailand
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(ON950417.1)	China
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(OR104995.1)	India
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(MN593011.1)	Egypt
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(MZ892605.1)	Thailand
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(MT740749.1)	India
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(MZ267247.1)	China
<i>Aspergillus flavus</i>	99.81%	(KU060796.1)	Egypt

يبين الشكل (4-8) تحليل الشجرة الوراثي للفطر *A.flavus* حيث أظهرت النتائج نسبة التطابق 100% مع العزلة الموجودة في تايلند والتي تحمل الرقم التسلسلي ( MF919636.1 ) ، إذ تطابقت بنسبة 99% مع العزلات الموجودة في الولايات المتحدة الأمريكية والصين والهند و مصر وتايلند .



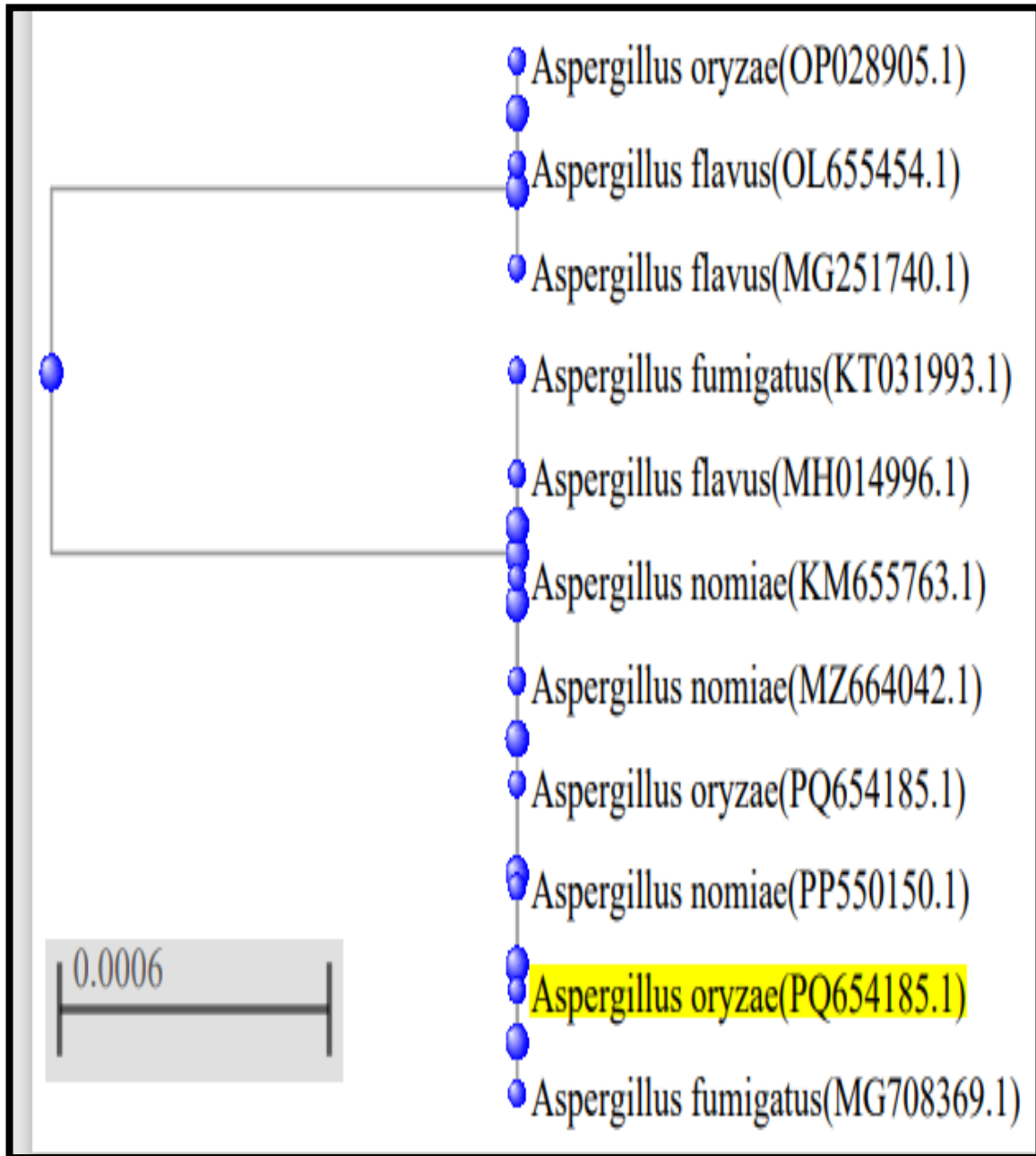
الشكل (4-8) الشجرة التطور الوراثية للفطر *A.flavus* ( المحددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى ولانواع معروفة تعود الى نفس العزلة

يبين الجدول ( 4-6) تم مقارنة تسلسل الجين 18S rRNA للعينة المدروسة مع التسلسلات المسجلة في قاعدة البيانات NCBI ، تم تحديد العزلة *Aspergillus oryzae* التي تحمل الرقم التسلسلي PQ654185 وتطابقها بنسبة 100% مع كل من العزلات الموجودة في اوزباكستان والهند والصين وكينيا وتطابقها بنسبة 99% مع كل من العزلات في الصين ومصر وباكستان.

جدول (4-6) مقارنة تسلسل القواعد النروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر *A.oryzae* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

المنشأ	الرقم التسلسلي	النسبة المئوية	اسم العزلة
Iraq	(PQ654185.1)		<i>Aspergillus oryzae</i>
Uzbekistan	(PP550150.1)	100.00%	<i>Aspergillus nomiae</i>
India	(KT031993.1)	100.00%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
China	(MZ664042.1)	100.00%	<i>Aspergillus nomiae</i>
India	(KM655763.1)	100.00%	<i>Aspergillus nomiae</i>
Kenya	(MH014996.1)	100.00%	<i>Aspergillus flavus</i>
China	(MG708369.1)	100.00%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
China	(MG251740.1)	99.79%	<i>Aspergillus flavus</i>
Egypt	(OL655454.1)	99.79%	<i>Aspergillus flavus</i>
Pakistan	(OP028905.1)	99.79%	<i>Aspergillus oryzae</i>

يبين الشكل ( 4-9 ) تحليل الشجرة الوراثية للفطر *A.oryzae* حيث أظهرت النتائج تطابقها بنسبة 100% مع كل من العزلات في الصين والهند والاوزباكستان ، وتطابقت بنسبة 99% مع كل من العزلات في الصين والمصر وباكستان .



الشكل ( 4-9 ) شجرة التطور الوراثي للفطر *Aspergillus oryzae* ( محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه .

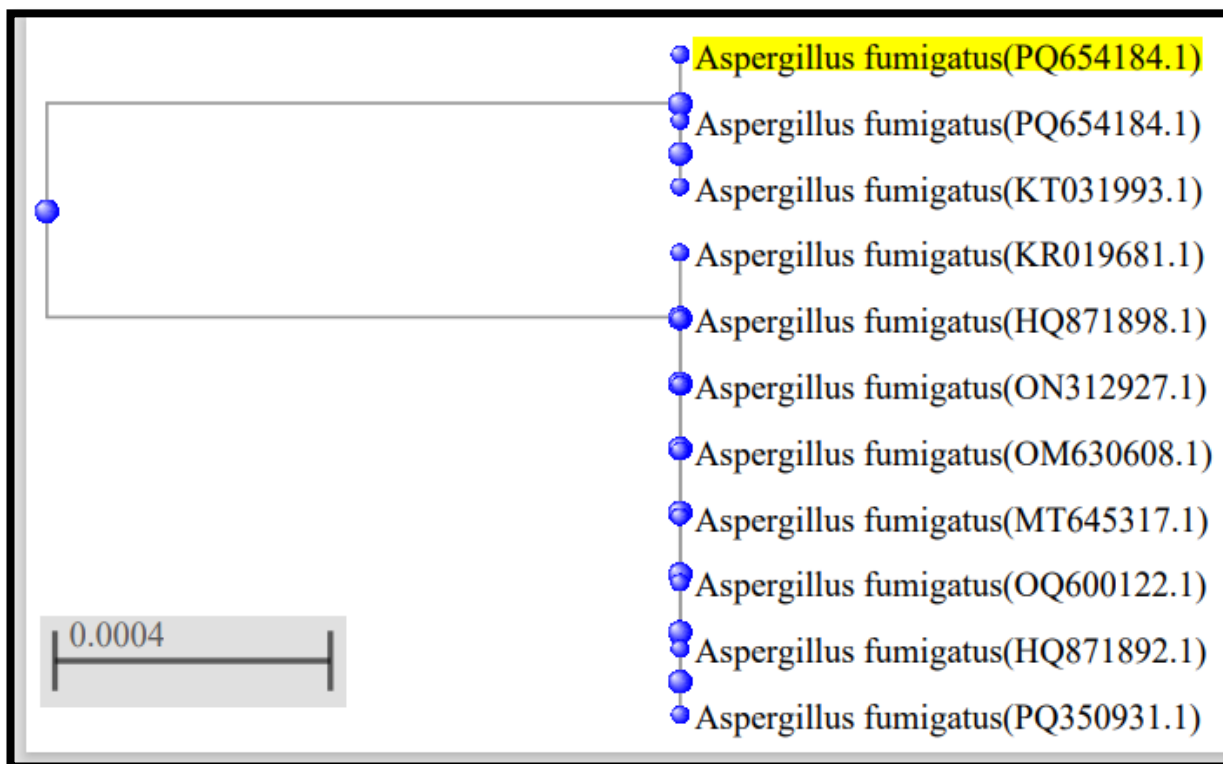
يبين الجدول (4-7) مقارنة تسلسل الجين 18S rRNA للعينة المدروسة مع التسلسلات المسجلة في قاعدة البيانات NCBI للفطر *Aspergillus fumigatus* والذي يحمل الرمز التسلسلي PQ654184 وتطابقها بنسبة 100% مع كل من العزلات الموجودة في الهند وتطابقها بنسبة 99% مع كل من العزلات الموجودة في الصين ومصر والفلبين .

جدول (4-7) مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة 18S rRNA للفطر *A. fumigatus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

اسم السلالة	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus fumigatus</i>		PQ654184.1	Kerbala/ Iraq
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100%	KT031993.1	India
<i>Aspergillus fumigatus</i>	100%	PQ350931.1	India
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	HQ871892.1	China
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	OQ600122.1	Egypt
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	MT645317.1	Philippines
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	OM630608.1	China
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	ON312927.1	China
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	HQ871898.1	China
<i>Aspergillus fumigatus</i>	99%	KR019681.1	China



يبين الشكل ( 4-10) تحليل الشجرة الوراثية للفطر *A. fumigatus* أظهرت النتائج تطابقها بنسبة 100% مع العزلات في الهند ، وتطابقت بنسبة 99% مع العزلات في الصين والمصر والفلبين .

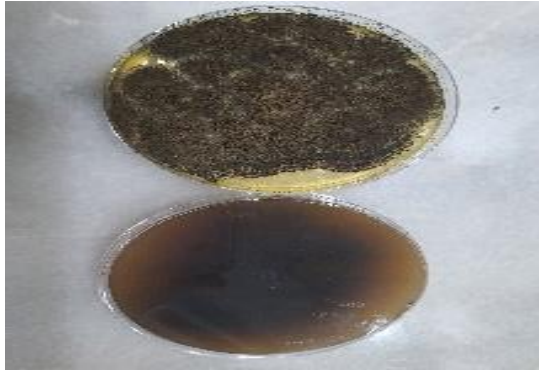


الشكل ( 4-10 ) شجرة التطور الوراثي *Aspergillus fumigatus* (محددة بالون الأصفر ) مع سلالات أخرى وأنواع معروفة تعود للجنس نفسه .

#### 3-4 الكشف عن الفطريات المنتجة لسّم الافلاتوكسين

##### 1-3-4 استخدام وسط جوز الهند مع الامونيا

أوضحت نتائج الكشف الكيميائي بأستعمال وسط جوز الهند والأمونيا قدرة عدد من العزلات للفطريات *A. flavus* و *A. oryzae* و *A. niger* و *A. fumigatus* المختبرة على إنتاج سم الافلا ، إذ ظهر تغير واضح في لون قواعد المستعمرات وظهور اللون الأحمر أو البرتقالي وبدرجات مختلفة كما في الشكل (4-11) ، وهذا التدرج في اللون ربما يعود إلى اختلاف قدرة العزلات على إنتاج سم الافلا وهذا ما ذكره كل من Machida & Saito ( 1999 ) ، إذ اوضحا أن درجة اللون الأحمر تعزى إلى كميات المنتجة من سم الافلا ، فالعزلة ذات اللون الأحمر أو البرتقالي الغامق تدل قدرتها على إنتاج كميات أكبر من العزلات التي تكون قواعد مستعمراتها حمراء فاتحة أو وردية .



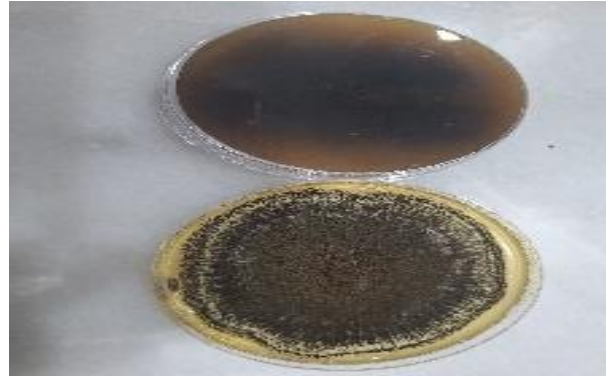
**A-A.oryzae**



**B-A.flavus**



**C- A.fumigatus**



**D-A.niger**

الشكل ( 4-11 ) يظهر الجهة الخلفية لبعض المستعمرات الفطرية النامية على وسط جوز الهند في درجة حرارة  $27 \pm 2$  م ولمدة 7 أيام لاختبار قابلية الفطر لإنتاج سموم الفطرية

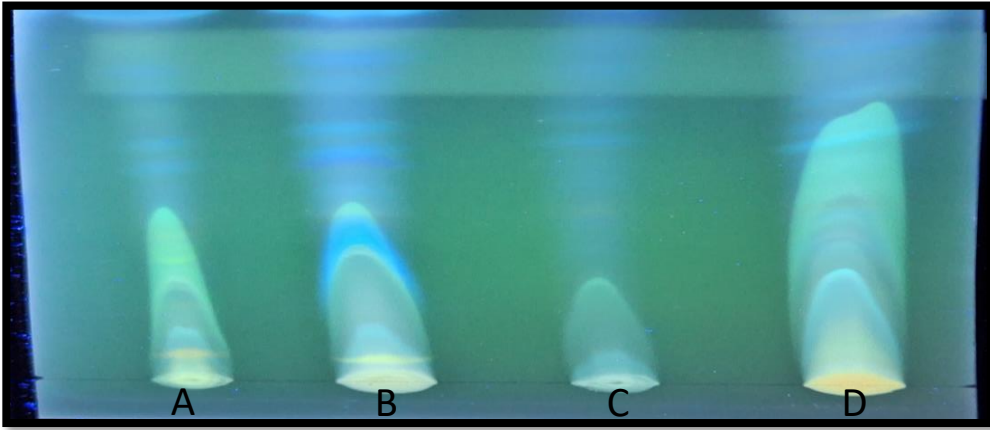
إن تخليق السموم الفطرية من أهم عمليات الأيض الثانوي في الفطريات وهي عمليات فسيولوجية تحدث في الخلايا الفطرية واكتمل فيها التطور ونواتج الأيض الأولي التي تنتج من التفاعلات التمثيل الغذائي والتنفس والنمو وعمليات الهدم والبناء والتي تنتج مواد كيميائية يستعملها الفطر في عمليات الأيض الثانوي ، عندما تتجمع نواتج الأيض الأولي في محيط الفطر أو نتيجة لنفاذ الغذاء أو لظروف بيئية خارجية يمر بها الفطر أو في المزارع الصناعية كل هذه العوامل سوف تؤثر على نمو الفطر فيتباطأ مما يدعو جزء من مايسليوم الفطر على التحول لتكوين مسارات بايو كيميائية تستعمل نواتج الأيض الأولي لمنع الفطر من تسمم نفسه وقتلها واستمرار العمليات الفسيولوجية للفطر هذه المسارات هي مسارات الأيض الثانوي ، خلايا الفطر تستلم إشارات تحفز على تكوين مركبات كيميائية ( من ضمنها السموم الفطرية ) يعتقد أستلام إشارات وتوظيفها للسيطرة على مسارات الأيض الثانوي ومنتجات هذا الأيض يكون عن طريق سيطرة وتوجيه الجينات أو العوامل الوراثية ، يعتقد العلماء أن بعض هذه المركبات ( السموم الفطرية وغيرها من نواتج الأيض الثانوي ) تعمل كعوامل ضراوة للفطر أي تعطيه إمكانية التنافس في محيطه مع بعض الأحياء

المجهرية أو أنها تزيد من مقاومة السبورات للظروف البيئية المحيطة أو أنها تساعد في تسريع عملية تكوين السبورات لذلك يؤثر على تطور الفطر ( نخيلان ، 2012 ) .

#### 2-3-4 الكشف عن السموم الفطرية باستخدام الالواح TLC

أوضحت نتائج الكشف الكيميائي باستعمال تقنية الصفائح الرقيقة ( TLC ) لمستخلصات العزلات *A.flauvs* و *A.oryzae* و *A.niger* و *A.fumigates* ، ظهور بقع ذات تآلق أزرق وأخضر عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية ( UV ) وهذا يتطابق تماما مع لون البقع لسم الافلا B و G ، وظهر تباين في شدة التآلق للعزلات المختلفة مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في انتاجها الكمي للافلاتوكسين B و G .

كما وجد Arseculeratne وأخرون ( 1969 ) أن للمادة الأساس علاقة كبيرة بتخليق سم الافلا فكلما احتوت المادة الأساس على تراكيز عالية من الكاربوهيدرات والأحماض الدهنية فأنها تعزز من انتاج سم الافلا .



الشكل ( 4-12 ) قدرة عزلات من جنس *Aspergillus* على انتاج سم الافلاتوكسين باستخدام صفائح كروماتوغرافيا ( TLC ) .

*A.flauvs* – A

*A. oryzea*- B

*A.fumigates*- C

*A.niger*- D

سموم الافلاتوكسين الأربعة الرئيسية المنتجة بشكل طبيعي لسم الافلاتوكسين B1,B2,G1,G2 ، يشير "G" "B" إلى الألوان المتولدة الزرقاء والخضراء التي تنتجها هذه المركبات تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية على الواح كروماتوغرافيا رقيقة الطبقة TLC ، في حين يشير رقم 1 و2 إلى المركبات الرئيسية والثانوية على التتابع ( Pitt, 2000 ) .

يعد الافلاتوكسين من أشد السموم الفطرية سمية وتنتج بعض أنواع الفطريات مثل *A.flavus* و *A. Niger* التي تنمو في التربة والنباتات ومتبقيات النباتات والحبوب وغيرها ، وأكثر محاصيل الحبوب عرضة للإصابة من أنواع *Aspergillus* هي الذرة والذرة الرفيعة والقمح والأرز ، وكذلك البذور الزيتية ، كما يمكن أن توجد السموم في حليب الحيوانات التي تتغذى على أعلاف ملوثة ، في شكل افلاتوكسين M1 ، وقد ثبت أيضا أن الافلاتوكسين يحدث طفرات في الجينات أي أنها تضر بالحمض النووي ( Kumar et al ,2017 Pitt ,2000; Rodricks et al,1977 ).

#### 4-4 الكشف عن المركبات الفعالة لنبات الهليون

##### 1-4-4 الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة لنبات الهليون

بينت النتائج الجدول (4-8) في الكشف عن المواد الفعالة في نبات الهليون وجود عدد من المركبات الفعالة حيث أظهرت النتائج باحتواء نبات الهليون على كل من الفلافونوات والكلايكوسيدات والفينولات التانينات والراتنجات والزيوت الطيارة الصابونيات والقلويدات والكربوهيدرات وهذا يتفق مع ما جاء به عباس والصباحوي ( 2022 ) في دراستهم حول تشخيص بعض المركبات الفعالة في نبات الهليون ودراسة فعاليتها التثبيطية في بعض البكتريا والفطريات والباحثة Minh وجماعتها ( 2019 ) فقد كشفت دراستها احتواء نبات الهليون على مركبات نشطة بيولوجيا مثل مضادات للاكسدة وللطريات مثل الفلافونويد والقلويدات والفينولات والصابونين والزيوت العطرية .

يعد نبات الهليون غنياً جداً من الناحية الدوائية لأنه يحتوي على أنشطة مضادة للسرطان ( Zhang et al ., 2019 ) , مضادة الأكسدة , مضاد للقرحة , مضادة للفطريات والبكتريا فضلاً عن أنه يعد مضاداً للألتهابات ( Desoukey et al ., 2020 ) , وارتفاع ضغط الدم ومضاد للتخثر ( Sanae, & Yasuo,2013 )

جدول ( 4-8) الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات المائية والكحولية لنبات الهليون

ت	الكشوفات النوعية	المستخلص المائي	المستخلص الكحولي
1	الكشف عن الكربوهيدرات		
a	كشف الفينول مع حامض الكبريتيك	-	-
b	كشف موليش	+	+
c	كاشف الفا- نفثول	+	+
2	الكشف عن القلويدات		
a	كشف ماير	-	+
b	كشف واكتر	+	+
3	الكشف عن التانينات		
a	كشف خلات الرصاص	-	+
b	كشف كلوريد الحديدك	+	+
4	الكشف عن الصابونينات	+	-
5	الكشف عن الراتنجات		+
6	الكشف عن الفلافونيدات	+	+
7	الكشف عن الكلايكوسيدات	+	-
8	الكشف عن الفينولات	+	+
9	الكشف عن الكومارين	+	+
10	الكشف عن الزيوت الطيارة	-	+

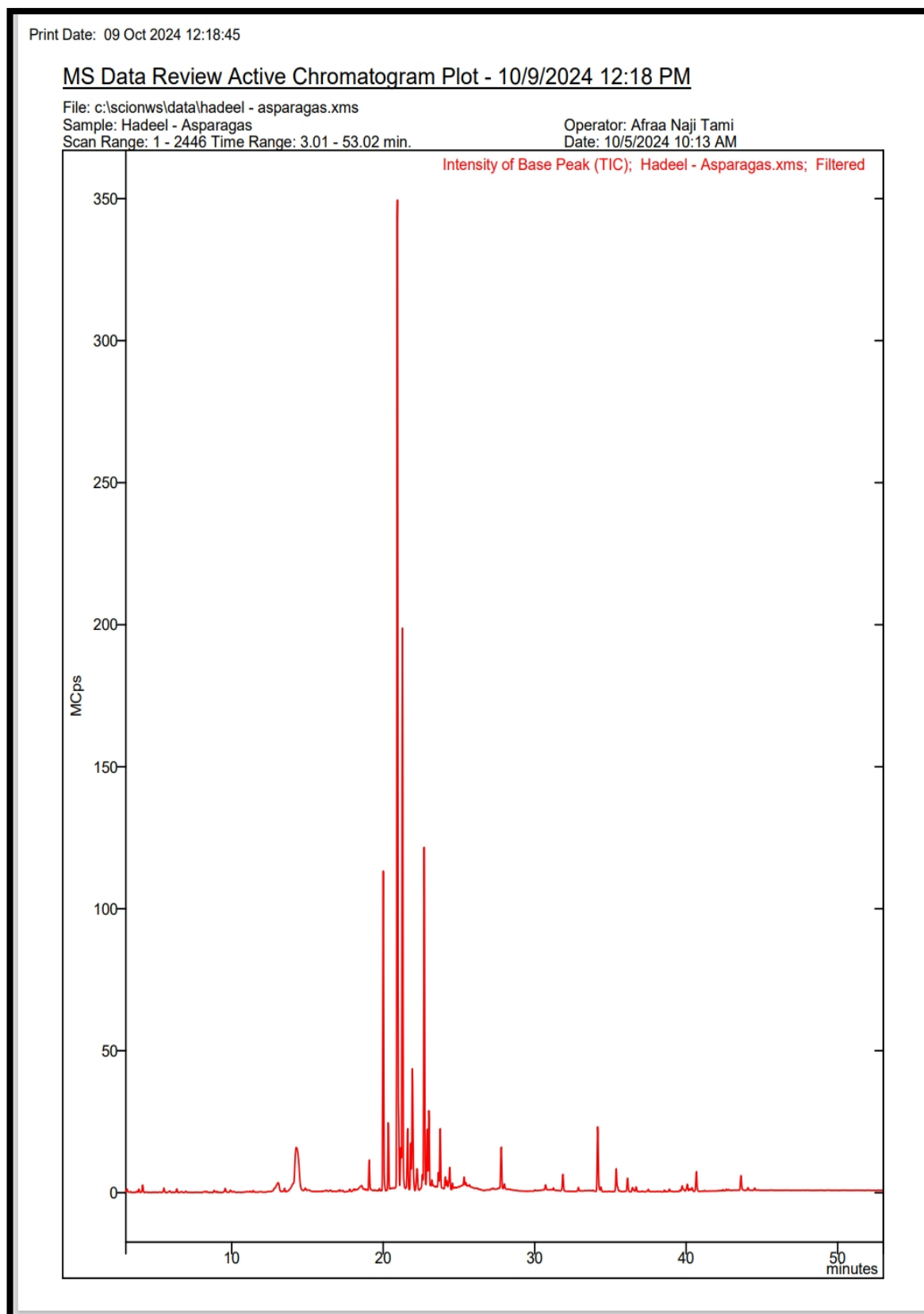
+ وجود - عدم وجود

#### 2-4-4 تشخيص المستخلص الكحولي لنبات الهليون بتقنية GC-MS

تم تحديد المركبات الموجودة في المستخلص الكحولي لنبات الهليون بتقنية كروماتوغرافيا الغاز - طيف الكتلة إذ حددت ستة مواد كيميائية نباتية الحاوي عليها المستخلص الكحولي إذ أدرجت تراكيب المواد وأسمائها في الجدول (4-9) الذي يبين مكونات المستخلص الكحولي لنبات الهليون والشكل ( 4-13) يوضح كروماتوغرافيا الغاز - طيف الكتلة لمستخلص نبات الهليون الكحولي

جدول ( 9-4 ) يبين نتائج تحليل GC-MS لنبات الهليون

Peak number	Retention time ( min)	Area	Total %	Prob %	M.wt	Name
Peak1	14.266	2.267e+8	4.442	22.50	278	Dibutyl Phthalate
Peak2	20.005	4.574e+8	8.960	19.83	278	Dibutyl Phthalate
Peak 3	20.937	1.573e+9	30.815	9.39	278	Dibutyl Phthalate
Peak 4	21.273	8.219e+8	16.102	5.74	306	Phthalic acid , butyl hex-3-yl ester
Peak 5	21.931	2.126e+8	4.164	9.24	368	Phthalic acid ,butyl 8- chlorooctyl ester
Peak 6	22.708	4.977e+8	9.751	27.77	286	Xanthotoxol, trimethylacetate



شكل (4-13) يبين نتائج تحليل كيميائي لنبات الهليون بتقنية GC-MS

5-4 تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو بعض الفطريات المنتجة للسموم المعزولة من منتجات اللحوم

أظهرت النتائج الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي إزاء الفطريات المختبرة قد اعتمدت على تركيز المستخلص ونوع العزلة الفطرية ، وقد تبين بحسب التحليل الاحصائي انخفاض معدلات أقطار المستعمرات الفطرية مع زيادة التراكيز للمستخلص الكحولي .

جدول ( 10-4 ) تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على معدل نمو الفطريات المنتجة للافلاتوكسين

Extract (mg/mL)	<i>A. Flavus</i> (Mean ± S.D.)	<i>A.niger</i> (Mean ± S.D.)	<i>A. Oryzae</i> (Mean ± S.D.)	<i>A. Fumigatus</i> (Mean ± S.D.)
Control	50.0 ± 0.13	55 ± 0.18	65 ± 0.36	41.25 ± 0.18
5	32.5 ± 0.32	25 ± 0.20	30.0 ± 0.13	25.0 ± 0.33
10	25 ± 0.23	24 ± 0.37	27.5 ± 0.31	23.25 ± 0.12
15	23.5 ± 0.30	23.5 ± 0.14	25 ± 0.36	21 ± 0.30
20	21.5 ± 0.17	22.5 ± 0.16	22.5 ± 0.33	19.75 ± 0.12
25	21 ± 0.16	20.0 ± 0.32	20.0 ± 0.28	18 ± 0.35
LSD (0.05)	3.14	1.95	2.51	1.79

أظهرت الدراسة في التأثيرات المثبطة لمستخلص الكحولي لنبات الهليون نباتي في جدول (10-4) على أربعة أنواع من الفطريات (*Aspergillus flavus*، و *A. Niger*، و *A. Oryzae*، و *A. Fumigatus*) بواسطة قياس مناطق التثبيط بالمليمتر على أكار PDA. وقد لوحظت استجابة تعتمد على التركيز، حيث انخفضت مناطق التثبيط باستمرار مع زيادة تركيزات مستخلص النبات، والتي تتراوح من 5 ملغم/مل إلى 25 ملغم/مل. وفي المجموعة السيطرة، التي تكون خالية من أي إضافة، حيث تراوحت القيم من 50.0 ملغم في *A. flavus* إلى 65.0 ملغم في *A. oryzae*. وهذا يشير إلى نمو فطري في أطباق السيطرة. وعندما تم تطبيق مستخلص الكحولي لنبات الهليون بتركيز 5 ملغم/مل، لوحظت مناطق تثبيط كبيرة، وصلت إلى النصف تقريباً، حيث أظهر *A. flavus* 32.5 ملغم وأظهر *A. fumigatus* 25.0 ملغم. مع زيادة تركيز المستخلص، انخفضت مناطق التثبيط تدريجياً. على سبيل المثال، في *A. flavus*، انخفضت منطقة التثبيط من 32.5 ملغم عند 5 ملغم/مل إلى 21.0 ملغم عند 25 ملغم/مل. تشير هذه النتائج إلى أن

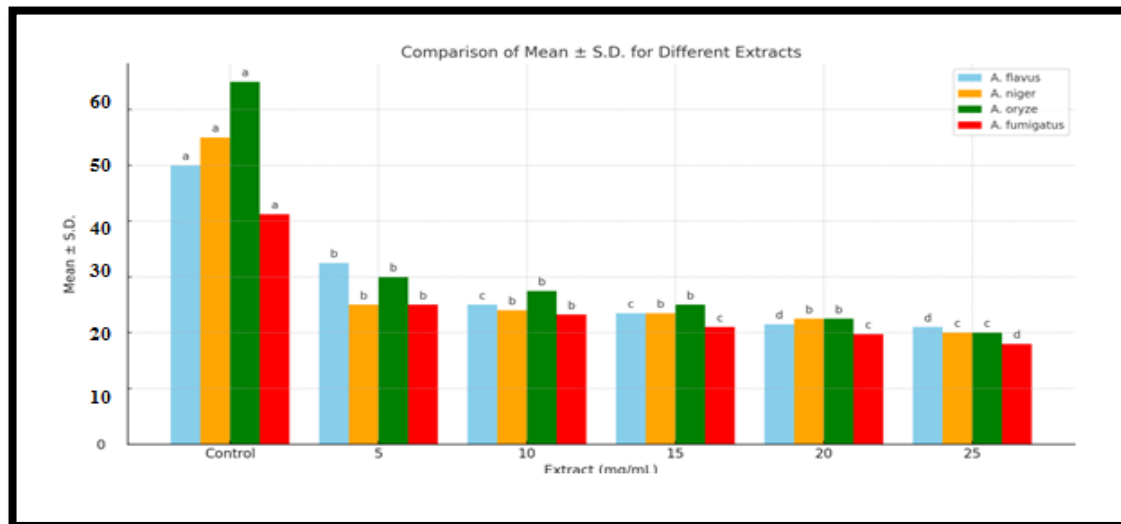


النشاط المضاد للفطريات لمستخلص النباتي انخفض مع زيادة التركيز. لوحظ أن *A. oryzae* أظهر مناطق تثبيط أكبر نسبيًا مقارنة بالأنواع الأخرى، مما يشير إلى حساسية أكبر لمستخلص النباتي. في المقابل، أظهر *A. fumigatus* مناطق تثبيط أصغر في جميع التركيزات، وخاصة عند 20 ملغم/مل و 25 ملغم/مل، مما قد يشير إلى مقاومة أعلى للمستخلص. كشف التحليل الإحصائي باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (LSD) عن اختلافات كبيرة بين مناطق التثبيط عند تركيبات مختلفة. أشارت الحروف المخصصة للإشارة إلى الأهمية الإحصائية إلى انخفاض واضح في النشاط المضاد للفطريات مع زيادة تركيز المستخلص. على سبيل المثال، في *A. flavus*، كانت مناطق التثبيط عند 5 ملغم/مل، و 10 ملغم/مل، و 25 ملغم/مل مختلفة بشكل كبير عن المجموعة المسيطرة، أثبتت النتائج أن مستخلص النبات يمتلك خصائص مضادة للفطريات ضد جميع أنواع *Aspergillus* الأربعة. ومع ذلك، لوحظ انخفاض في الفعالية مع تركيبات أعلى من المستخلص. يمكن أن تُعزى هذه الظاهرة إلى تراكم المركبات النشطة، أو التدخل في توافرها البيولوجي، أو تأثيرات التثبيط الذاتي المحتملة عند جرعات أعلى، وخاصة ضد *A. oryzae* و *A. flavus*.

إن أحد أسباب التثبيط في الفطريات الأسبرجلس يعود إلى أن مستخلص النبات (*Asparagus officinalis*) يظهر خصائص مضادة للفطريات ضد جميع أنواع *Aspergillus* الأربعة. ومع ذلك، تقل فعاليته مع زيادة التركيزات. قد يكون هذا النمط غير البديهي بسبب عدة عوامل: قد تكون المركبات النشطة في المستخلص أكثر توافراً بيولوجياً وفعالية في تثبيط نمو الفطريات. وقد تؤدي التركيزات الأعلى من المستخلص إلى تجميع المركبات النشطة بيولوجياً أو التدخل في توافرها للخلايا الفطرية. أو قد يكون انخفاض الفعالية أيضاً بسبب السمية أو آليات التثبيط الذاتي داخل مستخلص النبات نفسه (Behiry et al., 2022). تشير النتائج وخاصة ضد *A. oryzae* و *A. flavus*. وهذا يسلط الضوء على إمكاناته كعامل مضاد للفطريات طبيعي للتحكم في أنواع *Aspergillus* في التطبيقات الزراعية أو السريرية. ومع ذلك (Tan et al., 2022).

ومن خلال الجدول تبين أن *A. niger* تأثر فقط بالمستخلص النباتي عند تركيز 5% أما باقي التراكيز فكانت نتائجها مقاربة الى تركيز 5% ولم يَأثر بالتراكيز العالية للمستخلص، في مثل هذه الدراسات، قد يلاحظ الباحثون انخفاضاً في حجم مناطق التثبيط مع زيادة تركيز مستخلص نبات الهليون، مما يشير إلى استجابة تعتمد على الجرعة. يمكن استخدام هذه البيانات لتحديد التركيز الأكثر فعالية للمستخلص لتثبيط نمو الفطريات (Desoukey et al., 2020) وكذلك يرجع إلى عوامل عدة وهي مثل طريقة تحضير المستخلص، والسلالات الفطرية المحددة التي تم اختبارها، والظروف التجريبية، وأي

تحليلات إحصائية أجريت على البيانات، فهماً شاملاً لكيفية استخدام نبات الهليون لخصائصه المضادة للفطريات في الدراسة (Ahmad, H., & Matsubara,2020).



شكل (4-14) تأثير المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات *A.flavus* و *A.niger* و *A.oryzae* و *A.fumigatus*

4-6 تأثير أكسيد الزنك النانوي ZnO NPs مع المستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات *A.flavus* و *A.niger* و *A.oryzae* و *A.fumigatus*

تناولت الدراسة الحالية النشاط المضاد للفطريات لجسيمات أكسيد الزنك النانوية المحضرة باستخدام مستخلص نبات الهليون الطبي جدول (4-11) ضد أربعة أنواع من فطر الرشاشيات (*A. flavus*، *A. niger*، *A. oryzae*، و *A. fumigatus*) على أكار PDA. تم قياس مناطق التثبيط بالمليمتر وتم تقييمها عند خمسة تركيزات مختلفة من الجسيمات النانوية المحضرة: 5 ملغم/مل، 10 ملغم/مل، 15 ملغم/مل، 20 ملغم/مل، و 25 ملغم/مل. أظهرت العينات السيطرة، التي لم تتضمن أي إضافة، أكبر مناطق نمو لجميع أنواع الفطريات، تتراوح من 50.0 مم لـ *A. flavus* إلى 65.0 مم لـ *A. oryzae*، عند تطبيق الجسيمات النانوية بتركيز 5 ملغم/مل، لوحظت مناطق تثبيط كبيرة في جميع الأنواع، إذ أظهرت *A. flavus* 40.25 ملم وأظهرت *A. fumigatus* 35.5 ملم.

جدول ( 4-11) تأثير أوكسيد الزنك النانوي مع مستخلص الكحولي لنبات الهليون على نمو الفطريات *A.flavus* و *A.niger* و *A.oryzae* و *A.fumigatus*

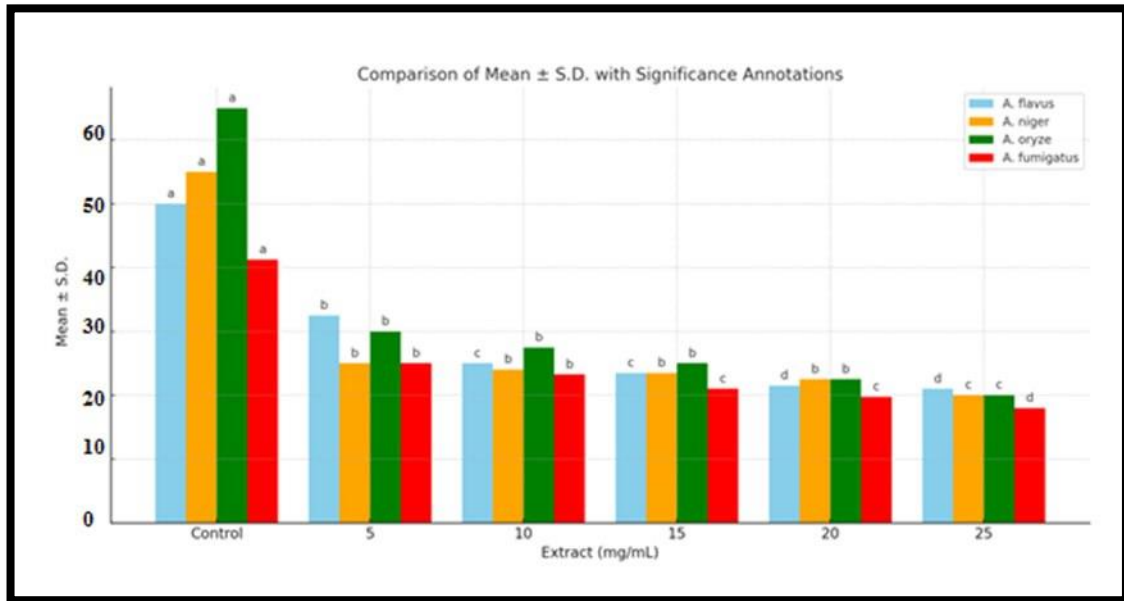
Extract (mg/mL)	<i>A. Flavus</i> (Mean ± S.D.)	<i>A.niger</i> (Mean ± S.D.)	<i>A. Oryze</i> (Mean ± S.D.)	<i>A. Fumigatus</i> (Mean ± S.D.)
Control	50.0 ± 0.13	55.0 ± 0.18	65.0 ± 0.36	41.25 ± 0.18
5	40.25 ± 0.19	37.5 ± 0.14	37.0 ± 0.32	35.5 ± 0.27
10	35.0 ± 0.30	29.5 ± 0.22	35.0 ± 0.25	30.0 ± 0.33
15	34.0 ± 0.25	25.0 ± 0.12	30.0 ± 0.36	15.0 ± 0.25
20	30.0 ± 0.13	23.5 ± 0.32	29.25 ± 0.34	0.0 ± 0.0
25	20.0 ± 0.20	19.75 ± 0.21	16.25 ± 0.25	0.0 ± 0.0
LSD	3.14	3.11	6.19	5.14

توضح هذه النتائج فعالية الجسيمات النانوية بتركيزات أقل في تثبيط نمو الفطريات. فقد لوحظ انخفاض تدريجي في مناطق التثبيط. على سبيل المثال، في *A. flavus*، انخفضت مناطق التثبيط من 40.25 مم عند 5 ملغم/مل إلى 20.0 ملغم عند 25 ملغم/مل، بينما في *A. fumigatus*، انخفضت مناطق التثبيط من 35.5 ملغم عند 5 ملغم/مل إلى 0.0 ملغم عند 20 ملغم/مل و 25 ملغم/مل، مما يشير إلى مقاومة كاملة للعلاج عند تركيزات أعلى. لوحظت اتجاهات مماثلة في الأنواع الفطرية الأخرى، إذ تضاءلت مناطق التثبيط بشكل طردي مع زيادة تركيز الجسيمات النانوية. من بين الأنواع الأربعة، أظهرت *A. oryzae* مناطق تثبيط أكبر نسبياً عند تركيزات أقل ولكنها أظهرت انخفاضاً ملحوظاً عند تركيزات أعلى. في المقابل، أظهرت *A. fumigatus* أدنى مناطق تثبيط بشكل عام ومقاومة كاملة عند تركيزات أعلى من الجسيمات النانوية. تشير النتائج إلى تباين في الحساسية بين الأنواع الفطرية لجسيمات أكسيد الزنك النانوية.

أكد التحليل الإحصائي باستخدام اختبار أقل فرق معنوي (LSD) وجود فروق كبيرة بين مناطق التثبيط عند تركيزات مختلفة. تم تعيين الحروف للإشارة إلى الأهمية الإحصائية، مما يدل على أن التركيزات الأعلى أدت باستمرار إلى مناطق تثبيط أصغر. على سبيل المثال، في *A. flavus*، كانت مناطق التثبيط عند 5 ملغم / مل (b) أكبر بكثير من تلك عند 20 ملغم / مل (d) و 25 ملغم / مل (h). تشير النتائج إلى أن جسيمات أكسيد الزنك النانوية المحضرة بمستخلص الهليون الطبي تمتلك خصائص مضادة للفطريات ضد جميع أنواع *Aspergillus* الأربعة. ومع ذلك، تقل فعاليتها عند التركيزات الأعلى، وهو ما قد يعزى

إلى عوامل مثل تجمع الجسيمات النانوية، أو انخفاض التوافر البيولوجي، أو آليات التحديد الذاتي عند الجرعات المرتفعة. يشير هذا النمط إلى أن الجسيمات النانوية (Sun *et al.*, 2018)

تشير النتائج إلى أن مستخلص النبات يكون أكثر فعالية عند تركيزات أعلى، وخاصة ضد *A. flavus* و *A. Oryzae*. وهذا يسلط الضوء على إمكاناته كعامل مضاد للفطريات طبيعي للتحكم في أنواع *Aspergillus* في التطبيقات الزراعية أو السريرية (Pillai *et al.*, 2018). ومن المعروف أن جزيئات أكسيد الزنك النانوية تولد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، مثل بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ) والجذور الهيدروكسيلية ( $OH\cdot$ ) وأنيونات الأكسجين الفائق ( $O_2^{\cdot-}$ )، عند تعرضها للضوء أو في البيئات المائية. تسبب هذه الأنواع من الأكسجين التفاعلية إجهادًا تأكسديًا في الخلايا الفطرية، مما يؤدي إلى تلف المكونات الخلوية الحرجة مثل الدهون والبروتينات والحمض النووي. يعطل هذا الإجهاد التأكسدي أغشية الخلايا الفطرية والعمليات الأيضية، مما يثبط في النهاية نمو الفطريات ويسبب مناطق التثبيط الملحوظة (Lipovsky *et al.*, 2011).



الشكل ( 4- 15 ) يبين تأثير أكسيد الزنك النانوي على نمو الفطريات *A.flavus* و *A.niger* و *A.fumigatus* و *A.oryzae*.

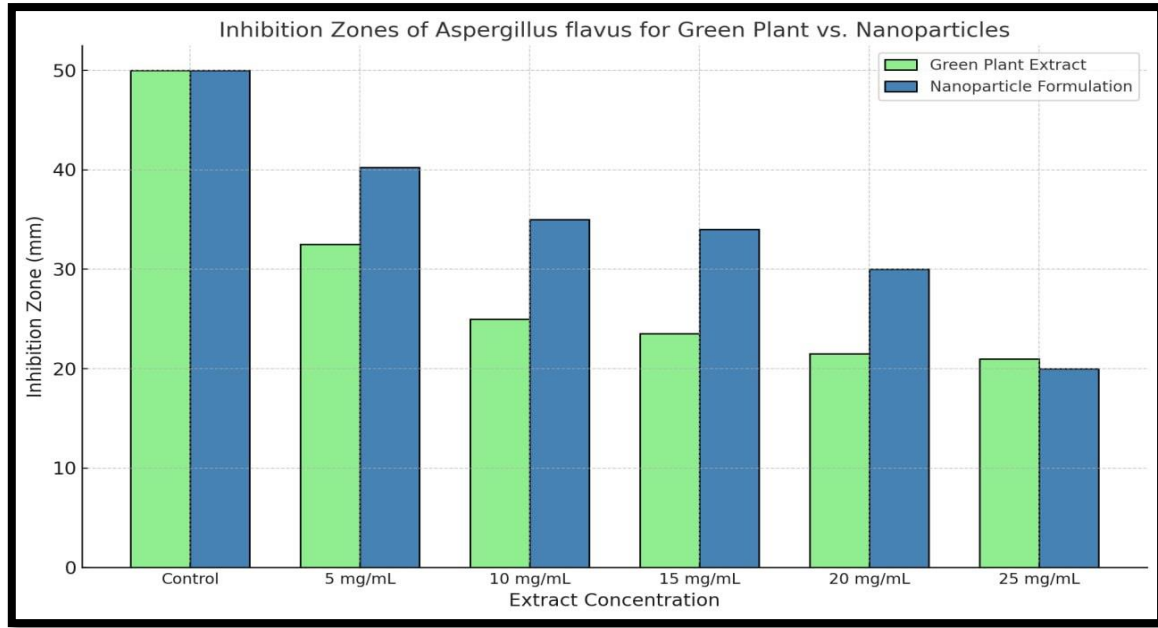
في النتائج الموضحة في جدول (4-12)، يمكن ملاحظة أن نشاط جسيمات أكسيد الزنك النانوية ضد *A. Flavus* كان أقل فعالية مقارنة بمستخلص الكحولي لنبات الهليون. ويدعم هذه الملاحظة البيانات التي تظهر أن متوسط مناطق التثبيط لـ *A. Flavus* كانت أعلى عند معالجتها بمستخلص النبات مقارنة بمعالجتها بجسيمات أكسيد الزنك النانوية بتركيزات مختلفة. ويدعم التحليل الإحصائي، كما هو موضح بـ  $P < 0.05$ ، هذه النتيجة بواسطة إظهار اختلافات كبيرة في التأثيرات المثبطة بين مستخلص النبات

وجسيمات أكسيد الزنك النانوية على *A. Flavus*. وتشير قيم P إلى أن الاختلافات في النشاط بين مستخلص النبات وجسيمات أكسيد الزنك النانوية ذات دلالة إحصائية عند التركيزات المختبرة. يمكن أن تساهم عدة عوامل في النشاط المضاد للفطريات الأعلى لمستخلص النبات مقارنة بجسيمات أكسيد الزنك النانوية. قد تشمل هذه العوامل تركيبة مستخلص النبات، الذي قد يحتوي على مجموعة متنوعة من المركبات النشطة بيولوجيًا ذات الخصائص المضادة للفطريات، بالإضافة إلى التأثيرات التآزرية لهذه المركبات عند دمجها. من ناحية أخرى، قد تكون لجسيمات أكسيد الزنك النانوية قيود من حيث طريقة عملها، أو إطلاق العوامل النشطة، أو التفاعل مع سلالة الفطريات، مما يؤدي إلى تأثيرات مثبطة أقل مقارنة بمستخلص النبات (Rehana et al., 2017).

جدول ( 4-12) يبين المقارنة بين المستخلص الكحولي وأوكسيد الزنك النانوي للفطر *A.flavus*

Extract (mg/mL)	<i>A. Flavus</i> (Mean ± S.D.) Green Plant	<i>A. Flavus</i> (Mean ± S.D.) Nano particle	P value
Control	50.0 ± 0.13	50.0 ± 0.13	-
5	32.5 ± 0.32	40.25 ± 0.19	0.032
10	25 ± 0.23	35.0 ± 0.30	0.021
15	23.5 ± 0.30	34.0 ± 0.25	0.017
20	21.5 ± 0.17	30.0 ± 0.13	0.093
25	21 ± 0.16	20.0 ± 0.20	0.077

بالمستخلص النباتي تثبيط الفطر من 50 الى 32.5 عند 5 % بالنانو تثبيط الفطر من 50 الى 40.25 عند 5 ملم إذا المستخلص افضل من النانو حسب الجدول



الشكل ( 4-16 ) يبين المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون و اوكسيد الزنك النانوي للفطر *A.flavus*

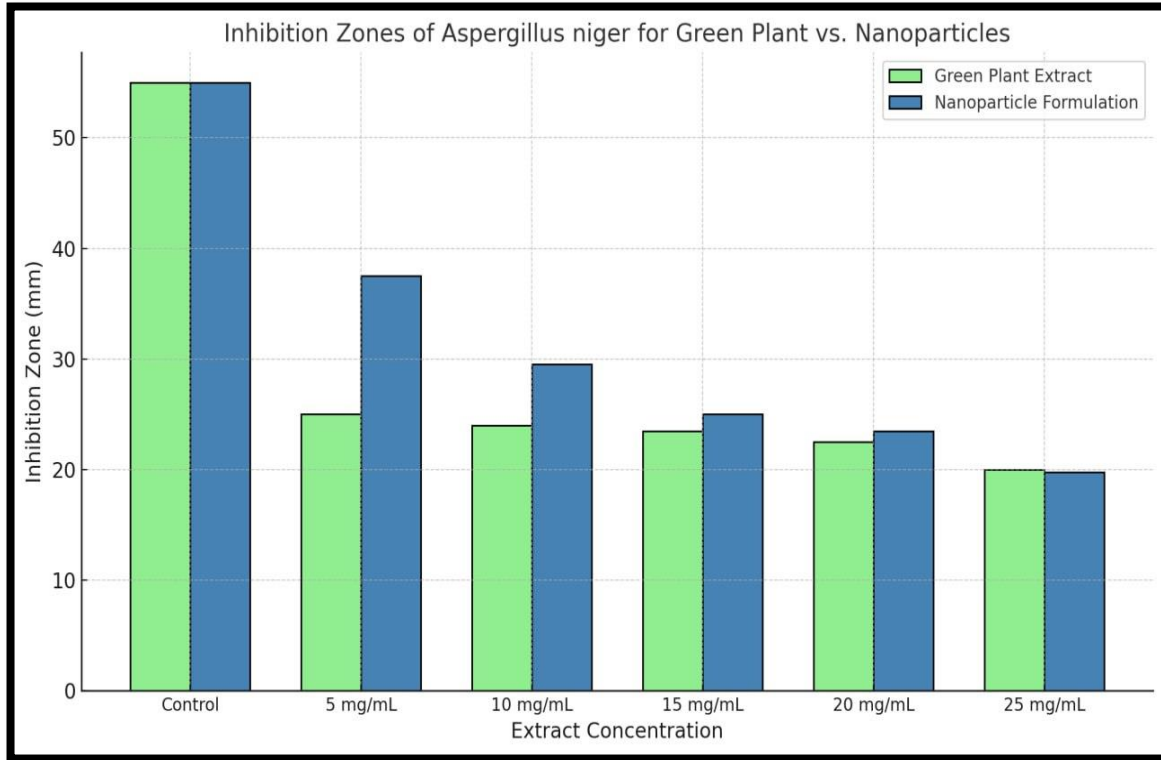
من جانب اخر تسلط النتائج المقدمة في الجدول (4-13) الضوء على النشاط المضاد للفطريات لكل من مستخلص النبات الأخضر وأوكسيد الزنك النانوي ضد *Aspergillus niger* عند تركيزات مختلفة. ومن الواضح أن الجسيمات النانوية أظهرت مناطق تثبيط أكبر من مستخلص النبات الهليون عند تركيزات أقل (5 ملغم / مل و 10 ملغم / مل)، مع ملاحظة اختلافات كبيرة ( $P = 0.026$  و  $P = 0.034$ ، على التوالي). يشير هذا إلى أن الجسيمات النانوية كانت أكثر فعالية من مستخلص النبات الأخضر عند هذه التركيزات، ويرجع ذلك على الأرجح إلى التوافر البيولوجي المعزز واستقرار ونشاط الجسيمات النانوية. ومع ذلك، عند تركيزات أعلى (15 ملغم / مل، 20 ملغم / مل، و 25 ملغم / مل)، أصبحت الاختلافات في مناطق التثبيط بين التركيبتين غير ذات دلالة إحصائية، مع قيم  $P$  أكبر من 0.05 ( $P = 0.067$ ، 0.062، و 0.068، على التوالي). وقد يشير هذا الافتقار إلى الاختلاف الكبير إلى أن النشاط المضاد للفطريات للجسيمات النانوية ومستخلص النبات وصل إلى عتبة مماثلة عند هذه التركيزات الأعلى (Basnet et al., 2018).

يمكن أن تفسر عوامل عديدة إلى تأثير التثبيط عند التركيزات الأعلى، قد تصل المركبات النشطة في كل من المستخلص النباتي والجسيمات النانوية إلى نقطة تشبع، وبعدها تتوقف تأثيراتها المثبطة. وقد يؤدي هذا إلى مستويات مماثلة من النشاط المضاد للفطريات لكلا التركيبتين (Sangeetha et al., 2018) وتجمع الجسيمات النانوية: عند التركيزات الأعلى، قد تتجمع الجسيمات النانوية، مما يقلل من مساحتها السطحية الفعالة وتفاعلها مع الخلايا الفطرية. وقد يحد هذا من ميزتها على المستخلص النباتي الأخضر،

مما يؤدي إلى مناطق تثبيط مماثلة واخيرا انخفاض حساسية *A. niger*: قد يُظهر *A. niger* آليات مقاومة تكيفية أو متأصلة تصبح أكثر وضوحًا عند التركيزات الأعلى، مما يؤدي إلى تسوية التأثيرات المضادة للفطريات من كلا العلاجين (Darvishi et al., 2019).

جدول ( 4-13) يبين مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أوكسيد الزنك التانوي للفطر *A.niger*

Extract (mg/mL)	<i>A.niger</i> (Mean ± S.D.) Green plant	<i>A.niger</i> (Mean ± S.D.) nanoparticle	P value
Control	55 ± 0.18	55.0 ± 0.18	-
5	25 ± 0.20	37.5 ± 0.14	0.026
10	24 ± 0.37	29.5 ± 0.22	0.034
15	23.5 ± 0.14	25.0 ± 0.12	0.067
20	22.5 ± 0.16	23.5 ± 0.32	0.062
25	20.0 ± 0.32	19.75 ± 0.21	0.068



الشكل ( 4- 17) يبين المقارنة بين المستخلص الكحولي مع أوكسيد الزنك النانوي للفطر *A.niger*

يوضح الجدول (4-14) النشاط المضاد للفطريات لمستخلص الكحولي لنبات الهليون وتركيبية الجسيمات النانوية ضد *Aspergillus oryzae* بتركيزات مختلفة. وقد نجح كلا العلاجين في تثبيط نمو الفطريات بشكل ملحوظ مقارنة بالمجموعة السيطرة، إذ أظهرت تركيبية الجسيمات النانوية باستمرار نشاطاً مضاداً للفطريات أكبر عند تركيزات منخفضة ومتوسطة، عند 5 ملغم/مل و10 ملغم/مل، أظهرت تركيبية الجسيمات النانوية مناطق تثبيط أكبر بشكل ملحوظ (37.0 ملم و35.0 ملم، على التوالي) مقارنة بمستخلص الكحولي لنبات الهليون (30.0 مم و27.5 مم، على التوالي)، مع قيم P 0.022 و0.014. وهذا يسلط الضوء على الفعالية الفائقة للجسيمات النانوية عند تركيزات أقل، ويرجع ذلك على الأرجح إلى اختراقها المعزز، وزيادة إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية، وزيادة تعطيل أغشية الخلايا الفطرية. تشير هذه النتائج إلى أن الجسيمات النانوية لها تأثيراً مثبتاً أقوى على *A. oryzae* من مستخلص النبات الأخضر عند هذه المستويات.

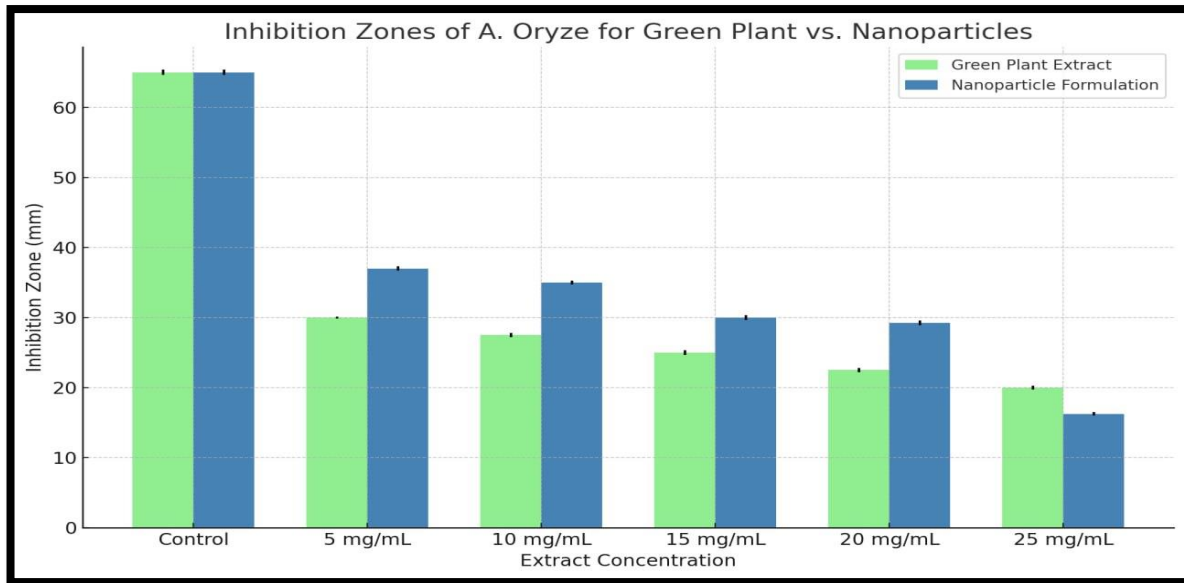
جدول (4-14) بين المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أكسيد الزنك النانوي للفطر *A.oryzae*

Extract (mg/mL)	<i>A. Oryzae</i> (Mean ± S.D.) Green Plant	<i>A. Oryzae</i> (Mean ± S.D.) Nano particle	P value
Control	65 ± 0.36	65.0 ± 0.36	-
5	30.0 ± 0.13	37.0 ± 0.32	0.022
10	27.5 ± 0.31	35.0 ± 0.25	0.014
15	25 ± 0.36	30.0 ± 0.36	0.026
20	22.5 ± 0.33	29.25 ± 0.34	0.025
25	20.0 ± 0.28	16.25 ± 0.25	0.033

عند 15 ملغم/مل و20 ملغم/مل، استمرت تركيبية الجسيمات النانوية في إظهار مناطق تثبيط أكبر بشكل ملحوظ (30.0 ملم و29.25 ملم، على التوالي) مقارنة بمستخلص النبات الأخضر (25.0 ملم و22.5 ملم، على التوالي)، مع قيم P 0.026 و0.025. تشير هذه النتائج إلى أن الجسيمات النانوية تحتفظ بنشاطها المضاد للفطريات عند هذه التركيزات المتوسطة، مع الحفاظ على ميزة واضحة على مستخلص النبات الأخضر. ومن المثير للاهتمام أنه عند 25 ملغم/مل، كانت منطقة التثبيط لتركيبية الجسيمات النانوية (16.25 ملم) أصغر من منطقة التثبيط لمستخلص النبات الأخضر (20.0 ملم)، مع وجود فرق كبير



إحصائياً ( $P = 0.033$ ). وهذا يشير إلى انخفاض في فعالية الجسيمات النانوية عند تركيزات أعلى. تشمل الأسباب المحتملة لهذا النشاط المنخفض لجميع الجسيمات النانوية عند تركيزات أعلى، مما قد يقلل من مساحتها السطحية الفعالة ويحد من تفاعلها مع الخلايا الفطرية، أو التشبع المحتمل لآلية مكافحة الفطريات، مما يؤدي إلى انخفاض النشاط (Husain et al., 2011). بشكل عام، تشير النتائج إلى أن تركيبة الجسيمات النانوية تتفوق على مستخلص النبات الأخضر عند التركيزات المنخفضة والمتوسطة، مما يُظهر مناطق تثبيط أكبر بشكل ملحوظ ضد *A. oryzae*. ومع ذلك، تنخفض فعاليتها عند التركيزات الأعلى، حيث يُظهر مستخلص النبات الأخضر أداءً أفضل نسبياً. تؤكد هذه النتائج على أهمية تحسين تركيزات الجسيمات النانوية لتعظيم التأثيرات المضادة للفطريات مع تجنب القيود المحتملة مثل التكتل أو انخفاض التوافر البيولوجي عند الجرعات المرتفعة (Ansari & Damanhory, 2023).



الشكل ( 4-18 ) يبين مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أوكسيد الزنك النانوي للفطر *A.oryzae*

يسلط الجدول (4-15) الضوء على التأثيرات المضادة للفطريات لمستخلص النبات الأخضر وتركيبية الجسيمات النانوية ضد *Aspergillus fumigatus* عند تركيزات مختلفة. تشير النتائج إلى أن كلا العلاجين قللا بشكل كبير من نمو الفطريات مقارنة بالمجموعة السيطرة. ومع ذلك، لوحظت فروق ملحوظة في الفعالية بين العلاجين عبر التركيزات المختبرة. عند التركيزات المنخفضة (5 ملغم/مل و 10 ملغم/مل)، أظهرت تركيبة الجسيمات النانوية مناطق تثبيط أكبر بكثير مقارنة بمستخلص النبات الأخضر ( $P = 0.036$ ) و ( $P = 0.022$ ، على التوالي). على سبيل المثال، عند 5 ملغم/مل، كانت منطقة التثبيط لتركيبية الجسيمات النانوية 35.5 ملم، مقارنة بـ 25.0 ملم لمستخلص النبات الأخضر. يشير هذا إلى أن الجسيمات النانوية

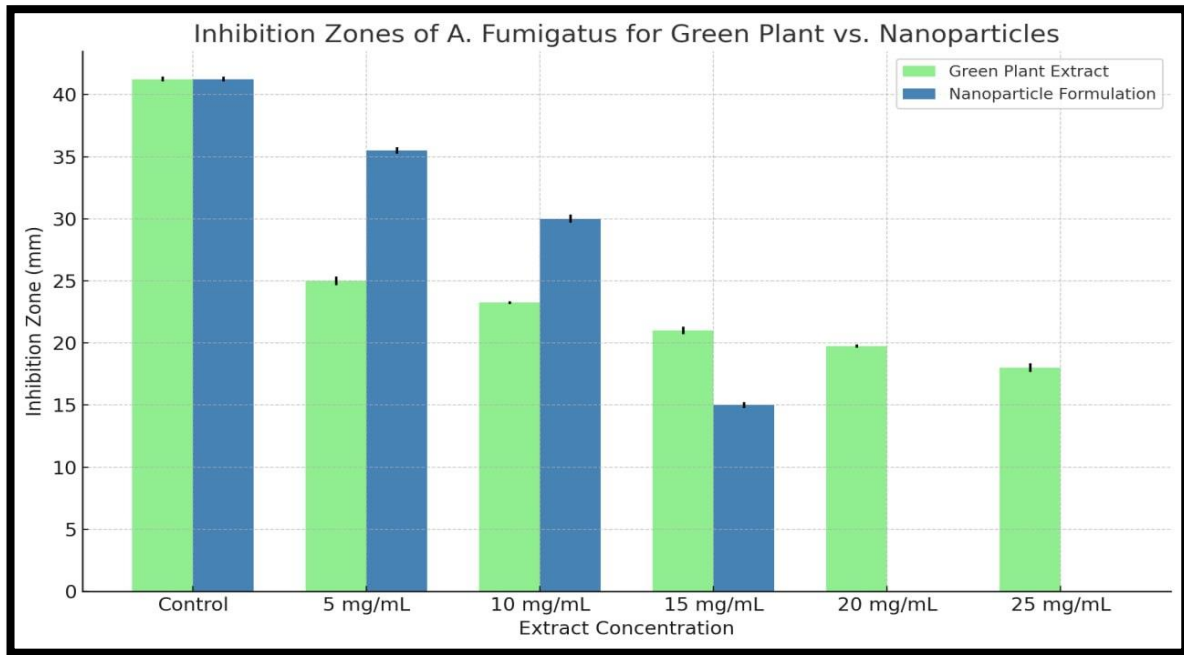
كانت أكثر فعالية في قمع نمو الفطريات عند هذه التركيزات، ويرجع ذلك على الأرجح إلى توافرها البيولوجي المعزز، وزيادة إنتاج ROS، واختراقها الأكبر للخلايا الفطرية (Yu et al., 2013).

جدول ( 4-15) يبين مقارنة المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أكسيد الزنك النانوي للفطر *A.fumigatus*

Extract (mg/mL)	<i>A. Fumigatus</i> (Mean ± S.D.) <i>B. Green plant</i>	<i>A. Fumigatus</i> (Mean ± S.D.) <i>B. Nano particle</i>	P value
Control	41.25 ± 0.18	41.25 ± 0.18	-
5	25.0 ± 0.33	35.5 ± 0.27	0.036
10	23.25 ± 0.12	30.0 ± 0.33	0.022
15	21 ± 0.30	15.0 ± 0.25	0.027
20	19.75 ± 0.12	0.0 ± 0.0	0.046
25	18 ± 0.35	0.0 ± 0.0	0.035

عند 15 ملغم/مل، أظهر المستخلص النباتي النانوي الأخضر منطقة تثبيط أكبر بشكل ملحوظ (21 ملم) مقارنة بتركيبية الجسيمات النانوية (15 ملم) ( $P = 0.027$ ). قد يشير هذا الاتجاه العكسي إلى أن الجسيمات النانوية تفقد فعاليتها عند هذا التركيز بسبب عوامل مثل التجمع أو انخفاض توفر المركبات النشطة. وكذلك عند تركيزات أعلى (20 ملغم/مل و 25 ملغم/مل)، قامت تركيبية الجسيمات النانوية بتثبيط نمو الفطريات تمامًا، في المقابل، استمر المستخلص النباتي الأخضر في إظهار مناطق تثبيط معتدلة (19.75 ملم و 18 ملم على التوالي). تشير الاختلافات الكبيرة عند هذه التركيزات ( $P = 0.046$  و  $P = 0.035$ ) إلى اختلاف أساسي في طرق العمل بين العلاجين. يمكن أن يعزى التثبيط الكامل بواسطة الجسيمات النانوية إلى تأثير طريقة العمل إذ يصل إنتاج ROS أو إطلاق أيون  $Zn^{2+}$  إلى مستويات كافية لقمع قابلية الفطريات للبقاء تمامًا. حافظ مستخلص النبات الأخضر، الذي يفتقر إلى هذه الآليات الخاصة بالجسيمات النانوية، على انخفاض تدريجي في نمو الفطريات. تشير هذه النتائج إلى أن تركيبية الجسيمات النانوية تقدم ميزة مميزة عند تركيزات أقل، حيث تحقق نشاطًا مضادًا للفطريات أكبر من مستخلص النبات الأخضر. ومع ذلك، عند التركيزات المتوسطة، تقل فعاليتها، ربما بسبب التكتل أو التفاعلات بين الجسيمات النانوية. عند

التركيزات الأعلى، أظهرت تركيبة الجسيمات النانوية تثبيطاً كاملاً لـ *A. fumigatus*، وهي النتيجة التي تسلط الضوء على نشاطها المضاد للفطريات القوي عند هذه المستويات (Sharma et al., 2012).



الشكل ( 4-19 ) بين المقارنة بين المستخلص الكحولي لنبات الهليون مع أوكسيد الزنك النانوي للفطر *A.fumigatus*

بينت العديد من الدراسات أن للجسيمات النانوية المحضرة من المستخلصات النباتية تأثيرات حيوية شاسعة في مجالات متنوعة أهمها قدرتها العالية في مكافحة الآفات الزراعية ( الفطريات – البكتيريا – الحشرات ) ( Siddique et al ,2015 ) .

تظهر جسيمات الزنك النانوية فعالية قوية ضد مجموعة كبيرة من الفطريات المسببة للأمراض *Botrytis cinerea* , *Rhizopus stolonifera* , *Aspergillus niger* , *Candida albican* Christian O Dimkpa et al ., 2013 ; He et al ., 2011 ; Sawai and ) . *Penicillium* . ( Yoshikawa, 2004 ) .

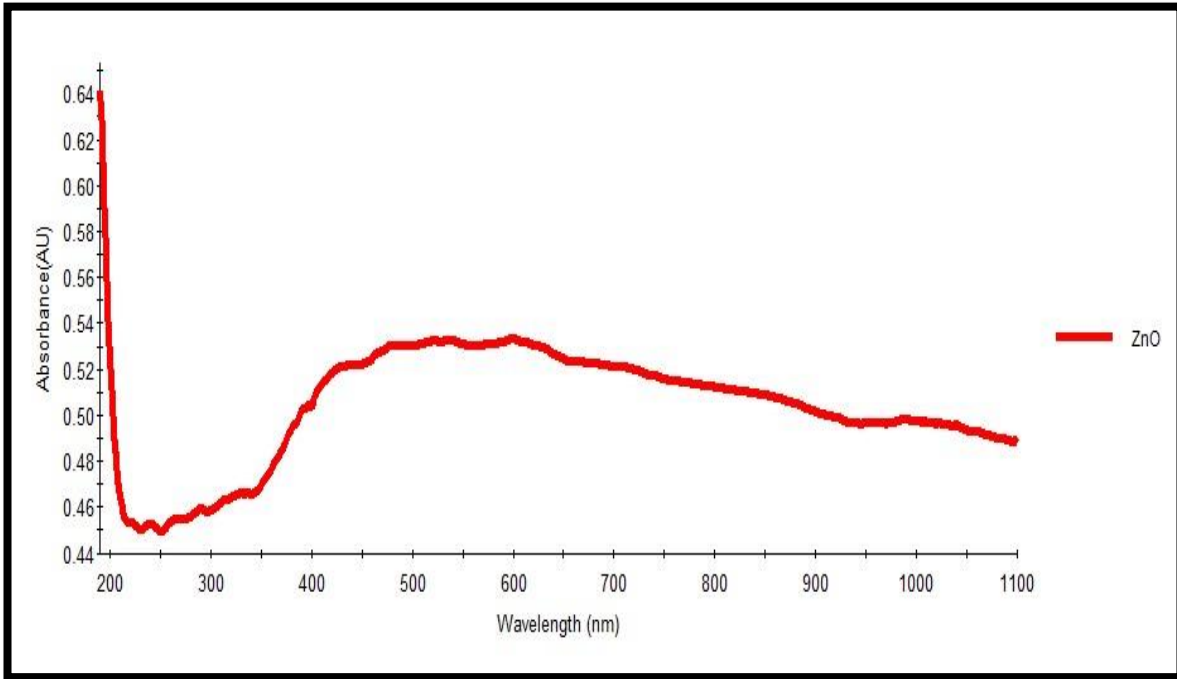
تم اقتراح اليات مختلفة لمناقشة تأثير الجسيمات النانوية على نمو الفطريات الالية الأولى هو تكوين جذر  $H_2O_2$  على سطح  $ZnO$  NP بسبب احتمال تكوين رابطة هيدروجينية بين مجموعة هيدروكسيل من جزيئات السليلوز مع ذرة الأوكسجين من  $ZnONP$  مما يؤدي إلى تثبيط نمو الفطريات , والالية الثانية هي اطلاق ايونات  $Zn^{2+}$  اتي تسبب في تلف غشاء الخلية ويتفاعل مع المحتويات في داخلها ( Moraru et al ., 2003 ) .

#### 7-4 تشخيص المركبات النانوية المحضرة بالطرائق الطيفية :

##### 1- مطياف الاشعة فوق البنفسجية ( UV )

لاحظنا عند اجراء التجربة تغير لون للمحلول من الأخضر الداكن إلى اللون أصفر باهت يرجع إلى ذروة رنين البلازمون والتي تقع ما بين 200 و400 نانومتر ، من أجل فحص نوع البلازمون الموجود في سطح المادة النانوية يتم رسم الدالة التي تكون الأمتصاصية بدلالة الطول الموجي فنشاهد ارتفاع ذروة كما موضح في الشكل ( 19-4 )

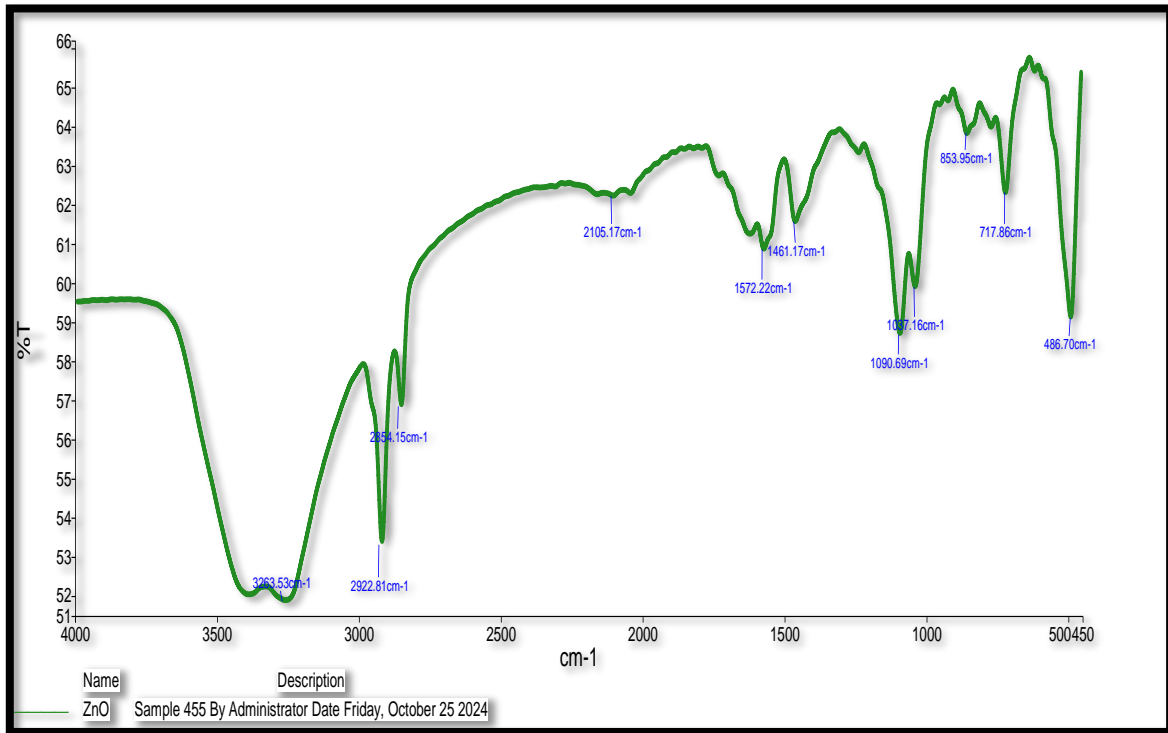
تمتاز تقنية التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية بأنها تقنية بسيطة وحساسة وسريعة وتوفر معلومات قيمة حول المواد النانوية وتستخدم لفحص الحجم وحالة الاكسدة للأنابيب النانوية الكربونية أو لتحديد حجم وشكل الجسيمات النانوية المعدنية . ويعتمد عرض النطاق لطيف الأمتصاص والشدة ، وقيمة الطول الموجي للرنين البلازمون السطحي للجسيمات النانوية المعدنية على تكوينها ، وشكلها ، وحالة نكتلتها وحجمها ( Maria Kaliva, Maria Vamvaki, 2020 ) ، إذ قدم بيتي ووجماسته علاقة خطية وقدر حجم الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك النانوي من العرض الكامل لمنتصف الشدة لذروة طيف الامتصاص كما في الشكل ( 20-4 ) .



الشكل ( 20-4 ) يبين مطياف الاشعة فوق البنفسجية ( UV )

2- طيف الأشعة تحت الحمراء ( FT-IR )

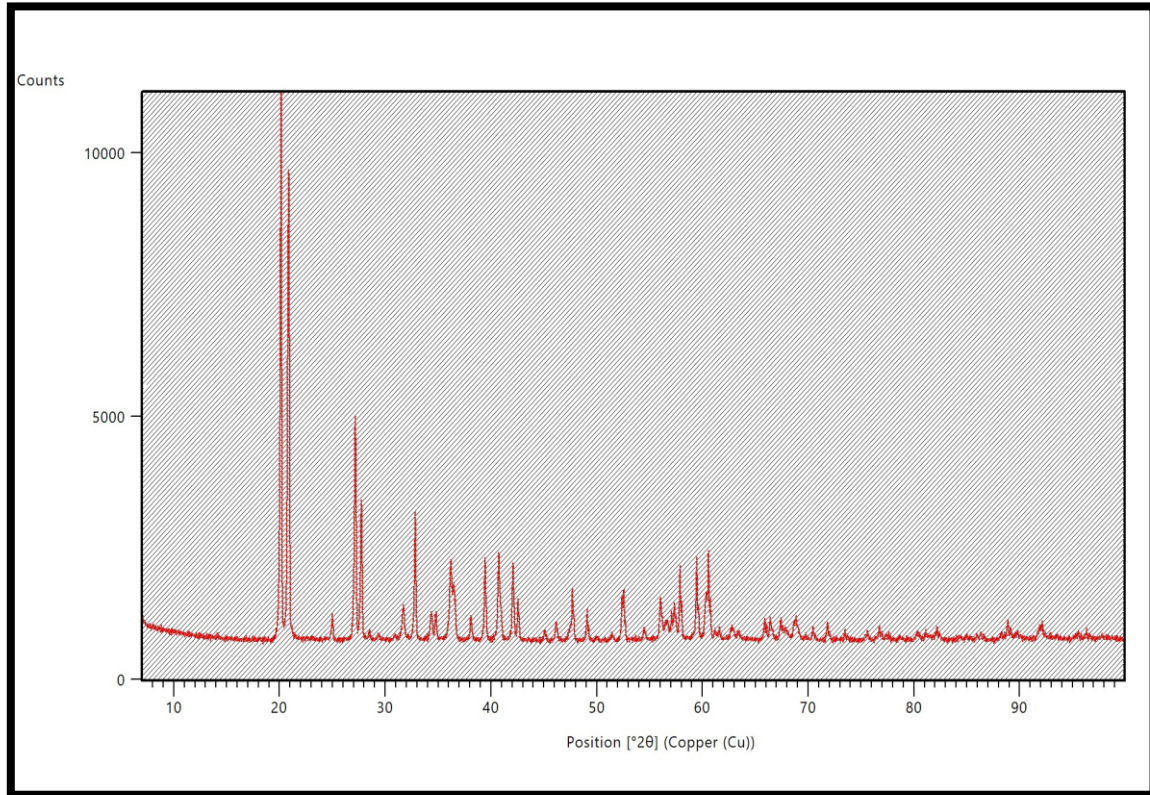
يبين الشكل (4-21) حزم FT-IR من أكسيد الزنك النانوي ZnO Nps من المستخلص الكحولي لنبات الهليون Apergus بشكل مسحوق تبدء حزم FT-IR بمدى بمقدار 450-500 تشير هذه القمة إلى الأهتزازات التمديدية للرابطة Zn-O (الزنك مع الاوكسجين) وهي الميزة الأساسية التي تؤكد وجود أكسيد الزنك النانوي ZnO ، إذا كانت القمة واضحة وحادة عند هذا النطاق فإن ZnO تم تكوينه بنجاح . في حالة الجسيمات النانوية (nanoparticles) ، قد تكون القمة أوسع قليلا بسبب الحجم الصغير للجزيئات وتأثيراتها السطحية ، والمنطقة 3000-3500 (مجموعات o-H) هذه القمم تشير إلى اهتزازات الروابط الهيدروكسيلية (O-H) ، والتي قد تكون ناتجة عن الماء الممتص على سطح الجسيمات النانوية . المجموعات الوظيفية الهيدروكسيلية الموجودة في المستخلص النباتي المستخدم لتخليق الجسيمات النانوية ، القمم العريضة في هذه المنطقة تشير غالباً إلى امتصاص الماء أو وجود مجموعات هيدروكسيل تساهمية ، إذا كان التخليق تم باستخدام مستخلص نبات الهليون فمن الطبيعي أن تظهر هذه القمم نتيجة المركبات النباتية المتبقية ، ومنطقة 1600-1700 (c=o أو c=c) القمم في هذه المنطقة تعود إلى الروابط المزدوجة c=o أو c=c توجد في المركبات العطرية لنبات ، مستخلص النباتي لنبات الهليون يحتوي على مواد مثل الفينولات التي تساهم في تخليق ZnO .



الشكل ( 4-21 ) يبين طيف الأشعة تحت الحمراء FT-IR

### 3- مجهر حيود الأشعة السينية ( XRD )

خضعت جسيمات أكسيد الزنك النانوي المخلفة حيويًا من المستخلص الكحولي لنبات الهليون للفحص بجهاز حيود الأشعة السينية للحصول على التركيب البلوري ومتوسط حجم الجسيمات والشكل (4-22) يوضح طيف حيود الأشعة السينية XRD لجسيمات أكسيد الزنك ويوضح ظهور القمم والزوايا التي تدل على حشر جسيمات أكسيد الزنك النانوي بين طبقات المستخلص الكحولي لنبات الهليون إذ ظهرت القمم الرئيسية مع انعكاسات براك عند قيمة  $2\theta$  2. يعد حيود الأشعة السينية ( XRD ) تقنية تحليلية تستخدم لتحديد البنية البلورية للمواد النانوية. عند تسليط الأشعة السينية على المادة البلورية، تنتشر الأشعة بزوايا محددة تعتمد على الترتيب الذري داخل المادة وينتج هذا التشتت نمطاً مميزاً يعرف بنمط الحيود، والذي يمكن تحليله لتحديد خصائص المادة.



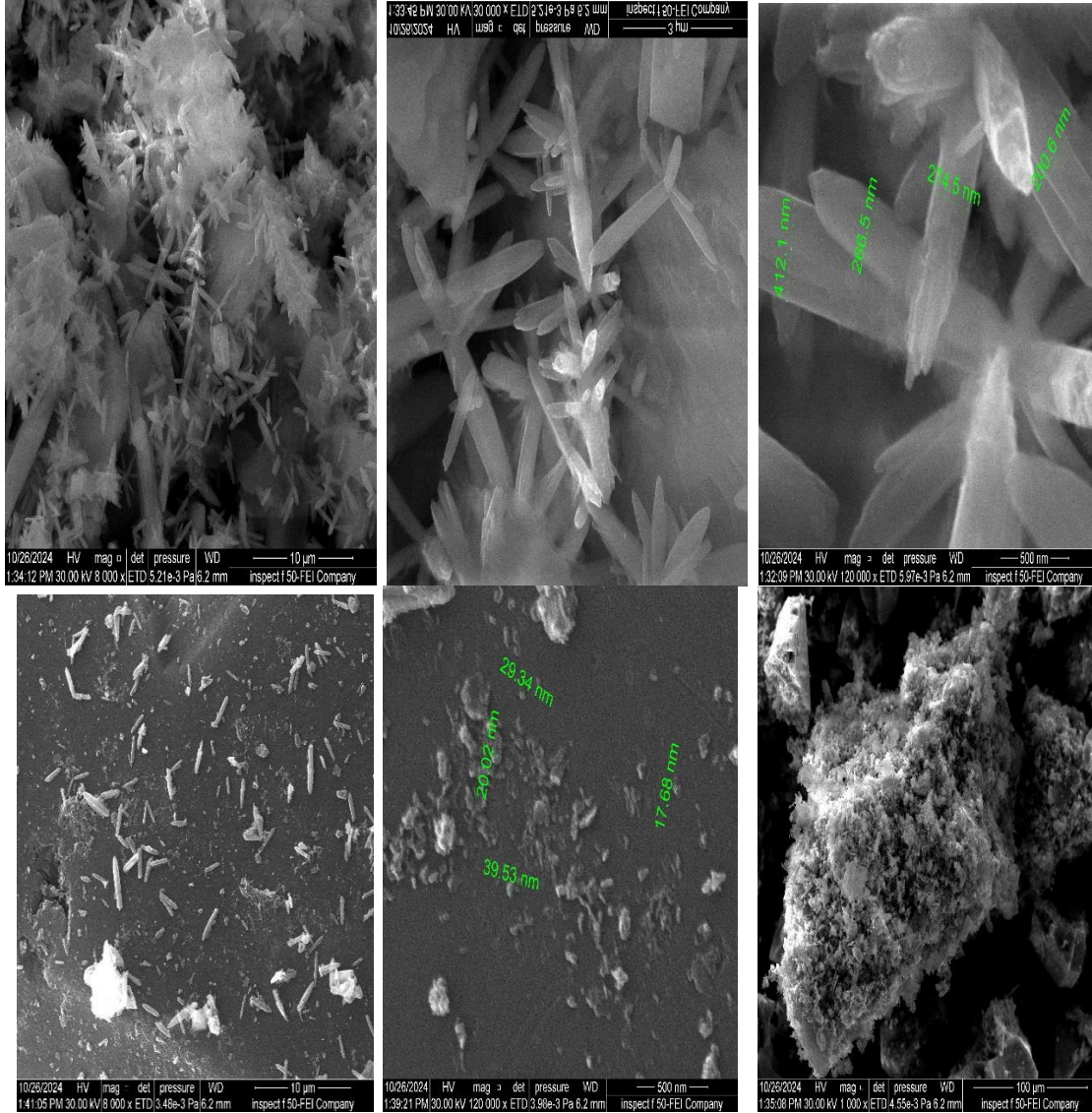
الشكل ( 4-22 ) يبين مجهر حيود الأشعة السينية ( XRD )

### 4 - المجهر الإلكتروني الماسح ( SEM )

تم الكشف بواسطة المجهر الإلكتروني الماسح SEM عن الشكل الظاهري السطحي لجسيمات أكسيد الزنك النانوي المخلفة حيويًا من المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Aparagus officintiol* الشكل ( 4-23) صور تظهر الهياكل البلورية بأشكال الموشورية أو قضبان Rod وهذه الأشكال تشير إلى أن ZnO قد تشكل بطريقة بلورية منظمة، والبنية المنتظمة تشير إلى أن ظروف التخليق ( درجة الحرارة، تركيز المستخلص ) كانت مناسبة لتكوين هياكل بلورية واضحة، والتجمعات قد تكون بسبب العمليات

## Results and discussion.....النتائج والمناقشة

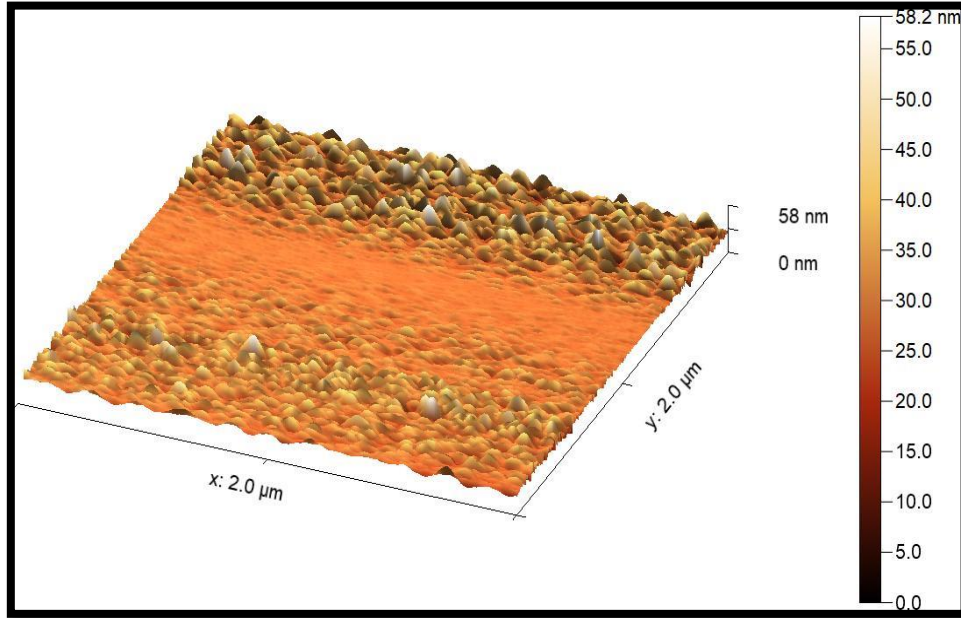
الحيوية ( المواد العضوية في المستخلص النباتي ) أو بسبب التجفيف السريع أثناء تحضير العينة ، والمسامية تعتبر ميزة إضافية لأنها تزيد من مساحة السطح الفعالة ، مما يعزز خصائص مثل الامتصاصية أو النشاط المحفز ، والصورة تؤكد نجاح التخليق الحيوي لجسيمات ZnO مع ظهور هياكل بلورية منتظمة



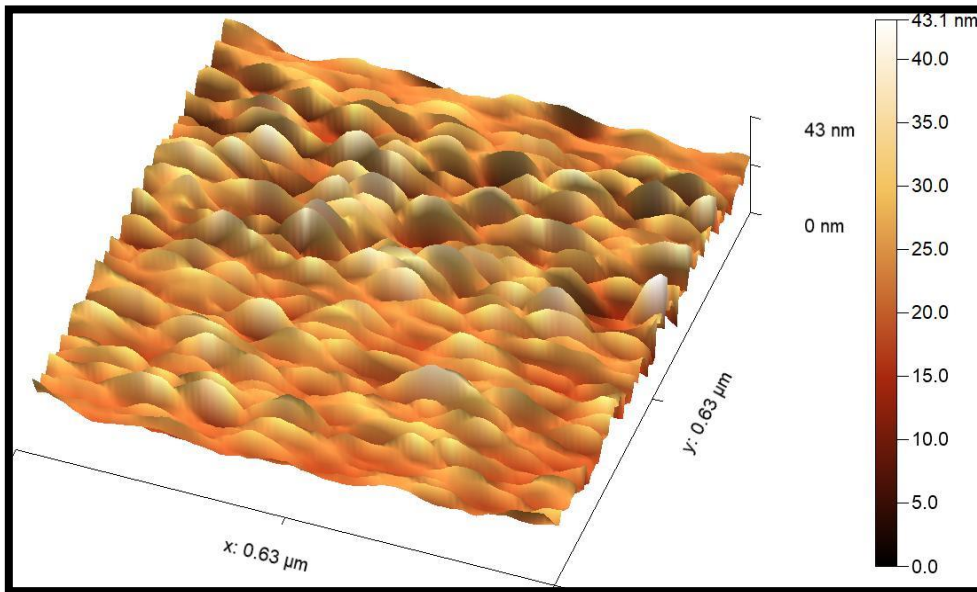
الشكل ( 4-23 ) يبين صورة المجهر الالكتروني الماسح ( SEM )

5 - مجهر القوى الذرية ( AFM )

يوضح الشكل ( 24-4 ) سطح العينة باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM) والذي يظهر توزيع الخشونة السطحية بشكل حفر مما يدل على تفاوت في خشونه السطح



الشكل ( 24-4 ) يبين صورة المجهر القوى الذرية (AFM)



الشكل ( 25-4 ) يبين صور المجهر القوى الذرية (AFM)



## **الفصل الخامس**

### **الاستنتاجات والتوصيات**

### **Conclusions and Recommendation**

### أولاً : الاستنتاجات

- 1- تم تأكيد التشخيص المظهري والجزئي على الأجناس *A. niger* و *A. oryzae* و *A. flavus* و *A. fumigatus* المرافقة لعينات اللحوم المحلية والمستوردة .
- 2- كفاءة مادة أكسيد الزنك النانوي ZnO NPs في تثبيط الفطريات وبتراكيز قليلة .
- 3- كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الهليون *Asparagus officinaile* في تثبيط الفطريات وبتراكيز قليلة .
- 4- احتواء نبات الهليون على مجموعة كبيرة من المركبات الفعالة التي لها دور في تثبيط نمو الفطريات المدروسة مثل الفينولات والكومارينات وغيرها .

### ثانياً : التوصيات

- 1- نوصي باستخدام النبات الهليون إن أمكن كمواد حافظة للمنتجات اللحوم المستوردة بدلا من المواد الحافظة الكيميائية المسرطنة لأن النباتات الطبيعية آمنة ومفيدة ومتوفرة بكثرة
- 2- فصل وتنقية المركبات الفعالة الموجودة في النبات المدروس ، ودراسة التأثير التثبيطي لها .
- 3- استخدام مذيبات أخرى في استخلاص النبات المدروس .
- 4- اجراء دراسات تطبيقية في كفاءة النباتات ومستخلصاتها في حفظ اللحوم
- 5- نوصي باستخدام أجهزة متطورة في عملية الاستخلاص للحصول على نتائج أفضل .

المصادر

**References**

## المصادر العربية

- ابو هيله. عبد الله ناصر(1987). علم الفطريات , مطبعة الرياض. 447 صفحة.
- إسماعيل ، عدي نجم ( 2014 ). السموم الفطرية النظرية والمفهوم العام . دار الكتب والوثائق العراق \_ بغداد : 248 ص .
- البنا ، عمرو عبد الرحمن . (2001). التسمم الغذائي البكتيري والفطري ، مكتبة المعارف الحديثة . جمهورية مصر العربية \_ الإسكندرية : 107 ص .
- الجميلي ، سامي عبد الرضا . ( 2014 ). السموم الفطرية . دار الكتب \_ العراق \_ كربلاء : 422 ص .
- حسين , فوزي طه قطب. (1981). النباتات الطبية , زارعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر . الرياض.
- حمزة , علي منصور. (2006) . النباتات الطبية العالمية , وصفها – مكوناتها-طرق استعمالها وزارعتها . منشأة المعارف , جلال حزي وشركاه . الاسكندرية.
- ستاري , فارتشيك و جي ارسيك , فلاكوف . (1986). الأعشاب الطبية . دار الشؤون والثقافة العامة , بغداد.
- سعد , شكري إبراهيم (1977). نباتات العقاقير والتوابل , مكوناتها وفوائدها . دار الفكر العربي . بيروت / لبنان.
- سعيد ، سيناء وليد محمد مشعل ( 2016 ) ، نشرة التوعية العلمية ، السموم الفطرية ومخاطرها ، وحدة الأبحاث البيولوجية للمناطق الحارة ، جامعة بغداد / العراق .
- سلام، فوزي (1994) . الف باء النباتات والاعشاب الطبية . بيروت . لبنان ، دار الفكر . ص 47.
- الشكري ,مهدي مجيد(1991) .اساسيات الفطريات وامراضها النباتية . مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر , جامعة بغداد-وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .ص 369.
- عبد الحميد , عبد الحميد محمد. (2000). الفطريات و السموم الفطرية . دار النشر لمجامعات مصر
- الكرطاني ، ياسر موفق . ( 2012 ). تأثير المستخلصات النباتية لبعض الأنواع النباتية في سم الافلا B1 المنتج من عزلة الفطر *Aspergillus flavus* . رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة ديالى . ص44.
- المنظمة العربية للتنمية الزراعية . (1988). النباتات الطبية والعطرية السامة في الوطن العربي . الخرطوم.
- نخيلان , عبد العزيز مجيد. (2011). السموم الفطرية Mycotoxins دار دجمة , عمان – الاردن , ط, ص 320.
- وهبة ، ناهد محمد ، والنسر ، نيفين عبد الغني ( 2010 ) ، السموم الفطرية في الالبان ومنتجاتها الخطر والوقاية ، مجلة أسيوط للدراسات البيئية – العدد الرابع والثلاثون .

## المصادر الأجنبية

- **Abedi, H. A., Jahromi, H. K., Sadeghi, N., Amjadi, S. P., & Jahromi, Z. K. (2016).** Evaluating the effect of aqueous extract of the roots of native edible asparagus in Iran (*Asparagus officinalis L*) on the concentration of liver factors in male rats treated with cadmium chloride. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 8(4), 2008-2022.
- **Ahmad, H., & Matsubara, Y. I. (2020).** Antifungal effect of Lamiaceae herb water extracts against *Fusarium* root rot in *Asparagus*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127, 229-236.
- **Ahmad ,Hilal ,Krishnan Venugopal ,Kalyanaraman Rajagopal , Savitha De Britto ,Boregowda Nandini ,Hosur Gnanaprakash Pushpalatha ,Narasimhamurthy Konappa ,Arakere C. Udayashankar ,Nagaraja Geetha ,and Sudisha Jogaiah. (2020).** “Green Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Eucalyptus* Globules and Their Fungicidal Ability Against Pathogenic Fungi of Apple Orchards.” *Biomolecules* 10(3)425.
- **Albrecht ,Matthew A. ,Cameron W. Evans ,and Colin L. Raston. (2006).** “Green Chemistry and the Health Implications of Nanoparticles.” *Green Chemistry* 8(5)417–432.
- **Alcaide-Molina, M., Ruiz-Jimenez, J., Mata-Granados, J. and Luque de Castro, M. (2009)** High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid phase extraction on-line coupled to laserinduced fluorescence screening and determination by liquid chromatography triple quadruple mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 (7), 1115–1125.

- **Alexopoulos, C.G.; Mims, C.W. and Blackwell, M. (1996)** . Introductory mycology . 4th . ed. John Wiley & Sons , New York.p:127.
- **Ali, Shahid, Ibrahim Khan, Safyan Akram Khan, Manzar Sohail, Riaz Ahmed, Ateeq ur Rehman, Muhammad Shahid Ansari, and Mohamed Ali Morsy. (2017)**. “Electrocatalytic Performance of Ni@ Pt Core–Shell Nanoparticles Supported on Carbon Nanotubes for Methanol Oxidation Reaction.” Journal of Electroanalytical Chemistry 79517–25.
- **Allahverdiyev, Adil M., Kateryna Volodymyrivna Kon, Emrah Sefik Abamor, Malahat Bagirova, and Miriam Rafailovich. (2011)**. “Coping with Antibiotic Resistance Combining Nanoparticles with Antibiotics and Other Antimicrobial Agents.” Expert Review of Anti-Infective Therapy 9(11)1035–1052 .
- **Al-Sanae, E. A.; Afaf, I.; Shehata, A. H.; Mohammed A. and Amal A.A.: References 551 (2016)**. Molecular detection and characterization of *Fusarium sporotrichioides* based on ITS2 rDNA. Polymorphism. Human Journals, 2(3): 365-376.
- **Ansari, S. A., & Damanhory, A. A. (2023)**. Biotechnological application of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase immobilized on glutaraldehyde modified zinc oxide nanoparticles. Heliyon, 9(2).
- **Atlas, R. and Bartha, R. (1981)**. Microbial ecology :Fundamentals and applications ,pp.216and 231 .Addison Wesley Publishing ,Company ,Inc., Phillipines.

- **Ayalign and De Saeger S.(2020)** .Mycotoxins in Ethiopia: Current status, implications to food safety and mitigation strategies. Food Control.;113:107163 .
- **Bajpai ,Vivek K. ,Jung In Yoon ,and Sun Chul Kang.( 2009).** “Antifungal Potential of Essential Oil and Various Organic Extracts of *Nandina Domestica* Thunb. against Skin Infectious Fungal Pathogens.” Applied Microbiology and Biotechnology 83(6)1127–1133.
- **Bharathi, M. J., Ramakrishnan, R., Vasu, S., Meenakshi, R., and Palaniappan, R. (2003).** Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. Indian J. Ophthalmol. 51, 315–321.
- **Bakkeren, G.; Krostad, J.W.; and Levesque, C.A. (2000).**Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in Ustilaginomycetes. My. So. of Ame.92:510-521.
- **Bashi, A. M., Zobir, M., Zainal, Z., & Tichit, D. (2013).** Journal of Solid State Chemistry Syn-thesis and controlled release properties of 2 , 4- dichlorophenoxy acetate – zinc layered hydroxide nanohybrid. Journal of Solid State Chemistry, 203, 19–24.
- **Basnet, P., Chanu, T. I., Samanta, D., & Chatterjee, S. (2018).** A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 183, 201-221.

- **Behiry, S. I., Hamad, N. A., Alotibi, F. O., Al-Askar, A. A., Arishi, A. A., Kenawy, A. M., ... & Heflish, A. A. (2022).** Antifungal and antiaflatoxigenic activities of different plant extracts against aspergillus flavus. Sustainability, 14(19), 12908.
- **Bekker, J. L., Hoffman, L. C., and Jooste, P. J. (2011).** Knowledge of stakeholders in the game meat industry and its effect on compliance with food safety standards. International Journal of Environmental Health Research, 2, 341–363.
- **Belfenache ‘Djamel Eddine.( 2012).** “ELABORATION ET ETUDE DE NANOPARTICULES Au/TiO<sub>2</sub> ET Ag/TiO<sub>2</sub>.
- **Bennett , J.E. and Kown-Chung , K.J. (1992) .** Medical Mycology . Lea and Febiqer . 745 .
- **Bharathi, M. J., Ramakrishnan, R., Vasu, S., Meenakshi, R., and Palaniappan, R. (2003).** Epidemiological characteristics and laboratory diagnosis of fungal keratitis. A three-year study. Indian J. Ophthalmol. 51, 315–321.
- **Bhat, R. V., S.Vasanthi.( 2003).** Food safety in food security and food trade: mycotoxin food safety risk in developing countries. Washington D.C. International Food Policy Research Institute
- **Bommakant , A.S. and Waliyar , F.(2002) .** Aspergillus and aflatoxin in groundnuts , Carcinogen. J., 124 pp.: 535-545 .
- **Bowes, B. G. (1996).** A colour atlas of plant structure. Manson Publishing Ltd.
- **Bowsher, C. ; Steer,M. and Tobin, A. (2008).** Plant Biochemistry. 1st. ed. Taylor & Francis Group . LLC. U.S.A.



- **Brayner ,Roberta ,Roselyne Ferrari-Iliou ,Nicolas Brivois , Shakib Djediat ,Marc F. Benedetti ,and Fernand Fiévet. (2006).** “Toxicological Impact Studies Based on 163 Escherichia Coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium.” Nano Letters 6(4)866–870.
- **Busby, W. F. and Wogan, G. N. (1984).** Aflatoxins Searle CE eds.. Chemical Carcinogens 2: 945-1136.
- **C Thomas ,Shindu ,Pawan Kumar Mishra ,and Sushama Talegaonkar. (2015).** “Ceramic Nanoparticles Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery.” Current Pharmaceutical Design 21(42)6165–6188.
- **Cadez, N.; Raspor, P.; de Cock, W.A.; Boekhout, T. and Smith,M. (2002).** Molecular Identification and Genetic Diversity within Species of the Genera Hanseniaspora and Kloeckera.FEMS Yeast Res. 1: 279-289.
- **Giuseppe De Rosa. (2018).** “Lipid-Based Core-Shell Nanoparticles Evolution and Potentialities in Drug Delivery.” OpenNano 35–17.
- **Cao ,YunWei Charles ,Rongchao Jin ,and Chad A. Mirkin. (2002).** “Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection.” Science 297(5586)1536–1540. Carlson,H. K., B. I. Fares, and J. O. Garder.(2002). Aflatoxins in mycotoxins. Let. Rev, London
- **Chakravarty H. L. .(1976).** Plant wealth of Iraq, Volume 1, Baghdad Botany Directorate. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Iraq.

- **Cimmanga, K. ; Kambu, K. ; Tona, L. ; Aper, S. ; De-Bruyne, T. ; Hermans, N. ; Tottle, J. ; Pieters, L. and Vlienck, A. (2002).** Correlation between chemical composition & antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79(2) : 13-20.
- **Cowan, M. (1999).** Plant products an antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4) : 564-582.
- **Darvishi, E., Kahrizi, D., & Arkan, E. (2019).** Comparison of different properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by the green (using *Juglans regia* L. leaf extract) and chemical methods. *Journal of Molecular Liquids*, 286, 110831.
- **Darwish, W .S. (2014).** An overview on mycotoxin contamination of foods in Africa. *The Journal of Veterinary Medical Science.*;76(6):789- 797.
- **Desoukey, S. F., El-Nahas, S. E., Sabh, A. Z., Taha, Z. K., & El-Shabrawi, H. M. (2020).** Antimicrobial effect of *Asparagus officinalis* L. extracts. *Plant Archives*, 20(2), 9253-9264.
- **Dimkpa ,Christian O ,Joan E. McLean ,David W. Britt ,and Anne J. Anderson.( 2013).** “Antifungal Activity of ZnO Nanoparticles and Their Interactive Effect with a Biocontrol Bacterium on Growth Antagonism of the Plant Pathogen *Fusarium Graminearum*.” *Biometals* 26(6)913–924
- **Dwivedi, D., & Mishra, A. (2019).** A brief review on ethno-medicinal uses of plants of north east India with special reference to

- infertility and reproductive abnormalities. *Pharma Science Monitor*, 8, 215-221
- **Eaton D. L. and E. P. Gallagher. (1995).** Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 34:135-172
  - **Egmond HP., Schothorst RC., Jonker MA.,( 2007).** Regulations relating to mycotoxins in food. *Anal Bioanal Chem*, 1, 147-157.
  - **Evans, W . (1999).** *Pharmacognosy*. 14th . ed. Fourth printing. WB Saunders Co. Ltd. London.
  - **Faivre ،Damien ،and Mathieu Bennet. (2016).** “Materials Science Magnetic Nanoparticles Line Up.” *Nature* 535(7611)235–236.
  - **Filipponi ،Luisa ،and Duncan Sutherland.( 2013).** “Nanotechnologies Principles ،Applications ،Implications and Hands-on Activities.” Publications Office of the 168 European Union ،Luxembourg.24
  - **Gareis,D.M.;Samson,R.A.;Varga,J.;Rokas,A.and Witiak,S.M.(2008)** . Areview of molecular phylogenetics in *Aspergillus* ،and prospects for a Robust genus–wide phylogeny.In:*Aspergillus in the Genomic in Aspergillus* ، and Samson ،R,A.,eds.(Netherland:Wagening Academic Pubs),PP.17 - 32.
  - **Geisman, T. A. (1962).** *Chemistry of Favonoids Compounds*.
  - **Greulach, V.A. (1973).** *Plant function and structure* . The Macmillan Co. New York.
  - **Greuter, W., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Chaloner, W.G., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Jørgensen, P.M., Nicolson,**

- D.H., Silva, P.C., Trehane, P. and McNeill, J. (1994).** International Code of Botanical Nomenclature (Tokyo Code). Konigstein, Germany: Koeltz Scientific " Books.
- **Guo, Q., Wang, N., Liu, H., Li, Z., Lu, L., & Wang, C. (2020).** The bioactive compounds and biological functions of *Asparagus officinalis* L.-A review. *Journal of Functional Foods*, 65, 103727.
  - **Guo ,Dan ,Guoxin Xie ,and Jianbin Luo. (2013).** "Mechanical Properties of Nanoparticles Basics and Applications." *Journal of Physics D Applied Physics* 170 47(1)13001.
  - **Harborne,J.B. (1984).** *Phytochemical methods . A guide to modern techniques of plants analysis.* 2nd. ed. Chapman & Hall , London, New York
  - **He ,Lili ,Yang Liu ,Azlin Mustapha ,and Mengshi Lin.( 2011a).** "Antifungal Activity of Zinc Oxide Nanoparticles against *Botrytis Cinerea* and *Penicillium Expansum*." *Microbiological Research* 166(3)207–215.
  - **Hedayati, M. T. ; Pasqualotto, A. C. ; Warn, P. A. ; Bowyer, P. and Denning, D. W.( 2007).** *Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer.* *Microbiology*, 153(6): 1677-1692.
  - **Henglein ,Arnim.( 1988).** "Mechanism of Reactions on Colloidal Microelectrodes and Size Quantization Effects." Pp. 113–80 in *Electrochemistry II.* Springer.

- **Hochella ,Michael F. ,Michael G. Spencer ,and Kimberly L. Jones. (2015).** “Nanotechnology Nature’s Gift or Scientists’ Brainchild?” *Environmental Science* 172 Nano 2(2)114–119.
- **Husain, Q., Ansari, S. A., Alam, F., & Azam, A. (2011).** Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$  galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. *International journal of biological macromolecules*, 49(1), 37-43.
- **Hussein, H. Z. (2015).** Activity of pomegranate peels and clove powders in detoxification of aflatoxin B1 and ochratoxin A from contaminated poultry diet. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6(1):1-4.
- **Iqbal, M., Bibi, Y., Raja, N. I., Ejaz, M., Hussain, M., Yasmeen, F. & Imran, M. (2017).** Review on therapeutic and pharmaceutically important medicinal plant *Asparagus officinalis* L. *J Plant Biochem Physiol*, 5(180), 2.
- **Jalal ,Razieh ,Elaheh K. Goharshadi ,Maryam Abareshi ,Majid Moosavi ,Abbas Yousefi ,and Paul Nancarrow. (2010).** “ZnO Nanofluids Green Synthesis ,Characterization ,and Antibacterial Activity.” *Materials Chemistry and Physics* 121(1–2)198–201.
- **Jashni, H. K., Jahromi, H. K., Ranjbary, A. G., Jahromi, Z. K., & Kherameh, Z. K. (2016).** Effects of aqueous extract from *Asparagus officinalis* L. roots on hypothalamic-pituitary-gonadal axis hormone levels and the number of ovarian follicles in adult rats. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(2), 75.

- **Jasim ,Alaa A. ,Ban T. Mohammed ,and Adnan A. Lahuf.(2019).** “Molecular and Enzymatic Properties of Fungi Isolated From Historical Manuscripts Preserved At The AL-Hussein Holy Shrine.” *Biochem*19(2) 4295-4305
- **Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005)** "Modern Food Microbiology", 7th ed., pp.63–101. Springer Science and Business Media, NY.
- **Jens, C. F. ;Thomas, O. L. ; Ulf T. ; Martin M. ; Janos V. ; Robert A. S. and Kristian, F. N. (2011)** . Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains.
- **Jiang ,Wei ,Hamid Mashayekhi ,and Baoshan Xing. 2009.** “Bacterial Toxicity Comparison between Nano-and Micro-Scaled Oxide Particles.” *Environmental Pollution* 157(5)1619–1625.
- **Joffe, A. Z., and Yagen, B. 1978.** Intoxication produced by toxic fungi *Fusarium poae* and *F. sporotrichioides* on chicks. *Toxicon*, 16(3): 263-273.
- **Keller, N. P. ; Turner, G., and Bennett, J. W. 2005.** Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937-947.
- **Khan ,Ibrahim ,Akram Abdalla ,and Ahsanulhaq Qurashi. 2017.** “Synthesis of Hierarchical WO<sub>3</sub> and Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/WO<sub>3</sub> Nanocomposite for Solar-Driven Water Splitting Applications.” *International Journal of Hydrogen Energy* 42(5)3431– 3439.

- **Khlebtsov ,Nikolai ,and Lev Dykman. (2011).** “Biodistribution and Toxicity of Engineered Gold Nanoparticles A Review of in Vitro and in Vivo Studies.” *Chemical Society Reviews* 40(3)1647–1671.
- **Klich, M. A., and Pitt, J. I. .(1988) .** Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(1): 99-108.
- **Kołodziejczak-Radzimska ,Agnieszka ,and Teofil Jesionowski. (2014).** “Zinc Oxide— from Synthesis to Application A Review.” *Materials* 7(4)2833–81.
- **Korzeniowska - Kosela,M.; Domej,J.; Herman, R. ; Krause , M . and Maier,A. (1990).** Pulmonary Aspergillosis caused by *Aspergillus*. *Pneumonal . Pol.* 58 (1) : 328 - 333.
- **Kown –Chung ,K.J.. and Bennett ,J..E.(1992).** *Medical mycology .Lea and Febiqer.*pp866.
- **Krishnamachari, K. A. V. R. ; Nagarajan, V. ; Bhat, R.. and Tilak, T. B. G. (1975).** Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in western India. *The Lancet*, 305(7915): 1061-1063.
- **Kumar, P. ; Mahato, D. K. ; Kamle, M. ; Mohanta, T. K., and Kang, S. G.(2017).** Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7: 2170.
- **Kumar, S., Srivastava, P., Gupta, S., Dhanawat, M., Rani, S., Ajiboye, B. O., & Guatam, R. K. (2023).** Pharmacological Evaluation of Different Extracts of *Asparagus officinalis*

- (Asparagaceae) as an Analgesic, AntiInflammatory and Anti-arthritic Agent in Rats. *Pharmacognosy Research*, 15(1)
- **Kusters-van Sommeren, M.A., Samson, R.A. and Visser, J. (1991).** The use of RFLP analysis in classification of the black Aspergilli: reinterpretation of the *Aspergillus niger* aggregate. *Curr. Genet.* 19: 21–26.
  - **Lee ‘S. ‘SU-S. Choi ‘S. Li and ‘and J. A. Eastman. (1999).** “Measuring Thermal Conductivity of Fluids Containing Oxide Nanoparticles.” *J.Heat Transfer* 121(2) 280-289.
  - **Lewis, L., M. Onsongo, H. Njapau, H. Schurz-Rogers, G. Luber, S. Kieszak, J. Nyamongo, L. Backer, A. M. Dahiye, A. Misore.(2005).** Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environ. Health Perspect.* 113: 1763-1767.
  - **Li, T., & Zhang, M. (2015).** Effects of modified atmosphere package (MAP) with a silicon gum film window on the quality of stored green asparagus (*Asparagus officinalis* L) spears. *LWT-Food Science and Technology*, 60(2), 1046-1053.
  - **Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gedanken, A., & Lubart, R. (2011).** Antifungal activity of ZnO nanoparticles—the role of ROS mediated cell injury. *Nanotechnology*, 22(10), 105101.
  - **Liu, S.J.; Wu, Y.N. and Chan, L.(2020) .** Application of metabonomics approach in food safety research-a review. *Food Reviews International.*;36(6):547-558.



- **Lord, R. (2021).** Clinical Herbalism-E-Book: Plant Wisdom from East and West. Elsevier Health Sciences.
- **MacLachlan, D. J. (2011).** Estimating the transfer of contaminants in animal feedstuffs to livestock tissues, milk and eggs: a review. *Animal Production Science*, 51(12) : 1067-1078.
- **Magan, N. and Aldred, D.( 2007 ).** Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*.;119(1-2):131-139.
- **Majeed, S. ; De Boevre, M. ; De Saeger, S. ; Rauf, W. ; Tawab, A. ; Rahman, M., and Iqbal, M. (2018).** Multiple mycotoxins in rice: Occurrence and health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan. *Toxins*, 10(2): 77.
- **Majumder , L.; Khalil , I.; Alam , K. and Munshi , M.K. (2010).** Citric Acid production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrates. *European Journal of Biological Sciences*. 2 (1): 01-08
- **Makun, H. A., S. T. Anjorin, B. Moronfoye, F. O. Adejo, O. A. Afolabi, G. Fagbayibo, B. O. Balogun and A. A. Surajudeen. (2010).** Fungal and aflatoxin contamination of some human food commodities in Nigeria . *African Journal of Food Science*,4: 127-135.
- **Matny, O. 2020.** Mycotoxin: Global Risk and Silent Killer in Our Food. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 8 (1): 26-32.

- **Medeiros, R., Gonçalez, E. and Felicio, R. (2011)** Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. Essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 35(1), 71–76.
- **Mehdi ,Husham A. ,Ban T. Mohammed ,and Abbas M. Bashi. (2018).** “Effect of Silver and Zinc Oxide Nanocompound Mixture on Growth and Some Physiological Properties of *Sclerotinia Sclerotiorum*.” *Indian Journal of Ecology* 45(2)358–366.
- **Moraru ,Carmen I. ,Chithra P. Panchapakesan ,Qingrong Huang ,Paul Takhistov ,Sean Liu ,and Jozef L. Kokini. (2003).** “Nanotechnology A New Frontier in Food Science Understanding the Special Properties of Materials of Nanometer Size Will Allow Food Scientists to Design New ,Healthier ,Tastier ,and Safer Foods.” *Nanotechnology* 57(12).
- **Morshdy, A.M., Hussien, M.A., El-Abbasy, M.T. and Elzwahery, R.R. ( 2015)** Aflatoxins residues in some meat products. 2nd Conference of Food Safety, Suez Canal University, Faculty of Veterinary Medicine. Volume I, pp. 90-95.
- **Mossa, J.S. ; Al-Yahya, M.A. and Al-Meshal, I.A. (1987).** Medicinal plants of Saudi Arabia. Vol.1 . King Saud University Libraries, Reyadh. Saudia Arabia . p. 244
- **Motoki, S., Tang, T., Taguchi, T., Kato, A., Ikeura, H., & Maeda, T. (2019).** Distribution of rutin and protodioscin in different tissue parts of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *HortScience*, 54(11), 1921-1924.

- **Nagarajan, S.; and Kuppusamy, K.A. (2013).** Extracellular synthesis of zinc oxide nanoparticle using seaweeds of Gulf of Mannar, India. *Journal nanoparticles by Aspergillus species* ,5(1):27-36.
- **Naseer, R. ; Sultana, B. ; Khan, M. Z. ; Naseer, D., and Nigam, P. (2014).** Utilization of waste fruit-peels to inhibit aflatoxins synthesis by *Aspergillus flavus*: a biotreatment of rice for safer storage. *Bioresource technology*. 172: 423-428.
- **Navale ,Govinda R. ,Dattatray J. Late ,and Sandip S. Shinde. (2015).** “JSM Nanotechnology & Nanomedicine Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi.” *JSM Nanotechnol Nanomed* 3(1).
- **Ngô ,Christian ,and Marcel H. Van de Voorde.(2014).** “Nanomaterials Doing More with Less.” In *Nanotechnology in a Nutshell*. 55–70.
- **Padmavathy ,Nagarajan ,and Rajagopalan Vijayaraghavan. (2008).** “Enhanced Bioactivity of ZnO Nanoparticles—an Antimicrobial Study.” *Science and Technology of Advanced Materials* 9(3)35004.
- **Pal , M.( 2017).** Are Mycotoxins Silent Killers of Humans and Animals. *Journal of Experimental Food Chemistry*. 3(4) :2472-2474.
- **Pandey, M.K.(2019).** Mitigating aflatoxin contamination in groundnut through a combination of genetic resistance and post-harvest management practices. *Toxins.*;11(6):1-21.

- **Park, D. L., C. E. Ayla, S. E. Guzman-Perez, R. Lopez-Garcia, and S. Trujillo. (2001).** Microbial toxins in foods; algal, fungal and bacterial. Food T
- **Park, D. L., H. Njapau, E. Boutrif. (2009).** Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept [Internet]. Nov 17 [cited 2009 Nov 17]; Available from: <http://www.fao.org/docrep/x2100t/x2100t08.htm>
- **Pegiou, E., Mumm, R., Acharya, P., de Vos, R. C., & Hall, R. D. (2019).** Green and white asparagus (*Asparagus officinalis*): A source of developmental, chemical and urinary intrigue. *Metabolites*, 10(1), 17.
- **Peterson, S.W. (2000).** Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*, eds R.A. Samson and J.I. Pitt. London: Harwood Academic Publishers. pp. 323–355.
- **Pillai, A. M., Sivasankarapillai, V. S., Rahdar, A., Joseph, J., Sadeghfar, F., Rajesh, K., & Kyzas, G. Z. (2020).** Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles with antibacterial and antifungal activity. *Journal of Molecular Structure*, 1211, 128107.
- **Pit, J.I , Hocking, A.D. Fungi and food spoilage, 3rd ed; springer science & Business Media: New York, NY , USA, (2009); ISBN 987-0-387-92207-2.**

- **Pitt, J. I. 2000.** Toxigenic fungi: which are important?. *Sabouraudia*, 38 (1): 17-22.
- **Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997).** *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edn. London: Blackie Academic and Professional.
- **Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1985)** . *Fungi and Food Spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia.
- **Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1997).** *Fungi and food spoilage* (Second ed.). Shampman and Hill .U.K. PP:989.
- **Pizzolato Montanha, F. (2018.)** Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology*;111:494-502.
- **Plaza, G. A.; Chojniak, J. and Banat, I. M. (2014)** . Biosurfactants Medited Biosynthesis of Selected Metallic Nanoparticles . *Int. J. Mol. Sci.* , 15 : 13720-13737.
- **Prasad, K., Moulekhi, K. & Bisht, G. (2014).** Preliminarily investigation on antioxidant phytochemical in some medicinal plants of kumaon region. *Research Journal of Phytochemistry*, 8, 199-204.
- **Priyadarshana, Gayan, Nilwala Kottegoda, Atula Senaratne, Ajith De Alwis, and Veranja Karunaratne. (2015).** “Synthesis of Magnetite Nanoparticles by Top-down Approach from a High Purity Ore.” *Journal of Nanomaterials* .8.
- **Rachaputi, N. R., G. C. Wrighth, and S. Kroschi. (2002).** Management practices minimize preharvest aflatoxin contamination in Australian ground nuts. *Aust. J. Exp. Agric*, 42: 595-605.

- **Rafiei-Sarmazdeh ,Zahra ,Seyed Morteza Zahedi-Dizaji ,and Aniseh Kafi Kang. (2019).** “Two-Dimensional Nanomaterials.” in Nanostructures. IntechOpen.
- **Raper, K. B. and Fennell, D. I. (1965) .** The genus *Aspergillus* . Williams & Wikins Company , Baltimore . 686 pp
- **Rashid, M., S. Khalil, N. Ayub, W. Ahmed, and A. Khan. (2008).** Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains into aflatoxinogenics and non-aflatoxinogenics. 40: 2177-2192
- **Ravishankar Rai ,V. (2011).** “Nanoparticles and Their Potential Application as Antimicrobials.” Science against microbial pathogens .197-209.
- **Reddy, K. R. N. ; Reddy, C. S. ; Abbas, H. K. ; Abel, C. A., and Muralidharan, K.( 2008).** Mycotoxigenic fungi, mycotoxins, and management of rice grains. Toxin reviews, 27(3-4): 287-317.
- **Reddy ,Kongara M. ,Kevin Feris ,Jason Bell ,Denise G. Wingett ,Cory Hanley ,and Alex Punnoose.( 2007).** “Selective Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Prokaryotic and Eukaryotic Systems.” Applied Physics Letters 90(21)213902.
- **Reed, J.D. (1995).** Nutritional toxicology of tannins & related Polyphenols for age legumes . J. Animal Soc. 73 : 1516-1528.
- **Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R. S., & Rahiman, A. K. (2017).** In vitro antioxidant and antidiabetic activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using different plant extracts. Bioprocess and biosystems engineering, 40(6), 943-957.

- **Rodricks, J. V. ; Hesseltine, C. W., and Mehlman, M. A. (1977).** Mycotoxins in human and animal health. Park Forest South, Illinois, Pathotox Publishers, Incorporated :870 .
- **Rodrigues, P. ;Soares, C. ;Kozakiewicz, Z. ;Paterson, R. R. M. ; Lima, N. and Venacio ,A.(2007).**Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and Aflatoxins .Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology,A.M'endez-Vilas(Ed), pp.528-529.
- **Romani, A., Casciano, F., Stevanin, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Secchiero, P., ... & Voltan, R. (2021).** Anticancer activity of aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. byproduct on breast cancer cells. *Molecules*, 26(21), 6369.
- **Salvaggio , J. I. (2006).**Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity – pneumonitis): Past , Present and future . *Clin . EXP . Allergy* 27 :18 – 25.
- **Sanae, M., & Yasuo, A. (2013).** Green asparagus (*Asparagus officinalis*) prevented hypertension by an inhibitory effect on angiotensin-converting enzyme activity in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(23), 5520-5525.
- **Sangeetha, G., Rajeshwari, S., & Venckatesh, R. (2011).** Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe *barbadensis* miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560-2566.

- **Savluchinske, S. ; Carios, J. ; Gigante, B. and Marcelo, J. (1997).** Antimicrobial activity of dehydroabietic acid derivatives. Vital Real, Portugal.
- **Sawai ,J. ,and T. Yoshikawa. (2004).** “Quantitative Evaluation of Antifungal Activity of Metallic Oxide Powders (MgO ,CaO and ZnO) by an Indirect Conductimetric Assay.” Journal of Applied Microbiology 96(4)803–809.
- **Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque,: References 511 C.A.; Chen, W. and Fungal Barcoding Consortium, (2012).** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,109(16): 6241- 6246.
- **Shahrajabian, M. H., & SUN, W. (2022).** Asparagus (*Asparagus officinalis L.*) and pennyroyal (*Mentha pulegium L.*), impressive advantages with wondrous health-beneficial phytochemicals. Notulae Scientia Biologicae, 14(2)
- **Shapira, R., and Paster, N. (2004) .** Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In Mycotoxins in food : 190-223. Woodhead Publishing.
- **Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012).** Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). Apoptosis, 17, 852-870.



- **Sharma ,Monica. (2019).** “Transdermal and Intravenous Nano Drug Delivery Systems Present and Future.” In Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems. 499–550
- **Sharma ,Virender K. ,Jan Filip ,Radek Zboril ,and Rajender S. Varma.( 2015).** 190 “Natural Inorganic Nanoparticles–Formation , Fate ,and Toxicity in the Environment.” Chemical Society Reviews 44(23)8410–8423.
- **Shaya, E. ; Ravid, V. and Paster, N. (1991).** Fumigant toxicity of essential oils against four majour stored- product Insect. J. Chem. Ecol. 17(3) : 499-504.
- **Smith, J. E. (1997).** Aflatoxins. In Handbook of plant and fungal Ttoxicants Felix D’Mello, J.P., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 269-285.
- **Smith, P. (2018).** The book of seeds: a lifesize guide to six hundred species from around the world. Ivy Press. 11(2), 416.
- **Stanisic ,Danijela ,Amanda F. Costa ,Guilherme Cruz ,Nelson Durán ,and Ljubica Tasic.( 2018).** “Applications of Flavonoids , With an Emphasis on Hesperidin ,as Anticancer Prodrugs Phytotherapy as an Alternative to Chemotherapy.” In Studies in Natural Products Chemistry 58. 161–212Elsevier.
- **Stoev SD., (2017).** Balkan endemic nephropathy– still continuing enigma, risk assessment and under estimated hazard of joint mycotoxin exposure of animals or humans. Chem Biol Interact, 261, 63-79. 9.

- **Sui, Z., Qi, C., Huang, Y., Ma, S., Wang, X., Le, G., & Sun, J. (2017).** Aqueous extracts from asparagus stems prevent memory impairments in scopolamine-treated mice. *Food & function*, 8(4), 1460-1467
- **Sun, Q., Li, J., & Le, T. (2018).** Zinc oxide nanoparticle as a novel class of antifungal agents: current advances and future perspectives. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(43), 11209-11220.
- **Sun, X. D. ; Su, P., and Shan, H.( 2017).** Mycotoxin contamination of rice in China. *Journal of food science*, 82(3) : 573-584.
- **Sun ,Shouheng ,Christopher B. Murray ,Dieter Weller ,Liesl Folks ,and Andreas Moser.(2000).** “Monodisperse FePt Nanoparticles and Ferromagnetic FePt Nanocrystal Superlattices.” *Science* 287(5460)1989–1992.
- **Swain ,Partha S. ,Somu B. N. Rao ,Duraisamy Rajendran , George Dominic ,and Sellappan Selvaraju.( 2016).** “Nano Zinc , an Alternative to Conventional Zinc as Animal Feed Supplement A Review.” *Animal Nutrition* 2(3)134–141.
- **Talebi, E., Khademi, M. and Rastad, A. (2011)** An over review on effect of aflatoxin in animal husbandry; *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 2(3), 754-757.
- **Tan, L. F., Yap, V. L., Rajagopal, M., Wiart, C., Selvaraja, M., Leong, M. Y., & Tan, P. L. (2022).** Plant as an alternative source of antifungals against *Aspergillus* infections: A review. *Plants*, 11(22), 3009.
- **Trease,G.E. and Evans ,W. (2002) .** *Pharmacognocý. 15th .ed.*

- **Tyler, V.E. ; Brady, L.R. and Robbers, J.E. (1988).** Pharmacognosy. 9th . ed. Lea & Febbiger. Philadelphia. U.S.A.
- **Vadlapudi ,Varahalarao ,and DSVGK Kaladhar. (2014).** “Review Green Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles.” Middle-East Journal of Scientific Research 19(6)834–842.
- **van Egmond, H. P., and Jonker, M. A. (2004).** Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture organization of the United Nations .vapor. Mycoscience. 40 : 205-298
- **Van Schalkwyk, D.L.(2011).**Investigation into selected parameters required to develop a sustainable Namibian game meat Industry.Dissertation presented for the degree of Doctor of Philosophy in Food Science at Stellenbosch University, Maitland, South Africa.
- **Varga, J., Frisvad, J. C., and Samson, R. A. (2011).** Two new aflatoxin producing species, and an overview of Aspergillus section Flavi. Stud. Mycol. 69, 57–80..
- **Visakh ,P. M. ,and María José Martínez Morlanes.( 2016).** Nanomaterials and Nanocomposites Zero-to Three-Dimensional Materials and Their Composites. John Wiley & Sons.433.
- **Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W. (2008).** Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. International Journal of Food Microbiology.;124(1):1-12.

- **Wang, J., Liu, Y., Zhao, J., Zhang, W., & Pang, X. (2013).** Saponins extracted from by product of *Asparagus officinalis L.* suppress tumour cell migration and invasion through targeting Rho GTPase signalling pathway. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(6), 1492- 1498.
- **Wang, L.(2018).** Occurrence and quantitative risk assessment of twelve mycotoxins in eggs and chicken tissues in China. *Toxins*. 10:477.
- **Wang ,Zhengdi ,Tingting Hu ,Ruizheng Liang ,and Min Wei.(2020).** “Application of Zero-Dimensional Nanomaterials in Biosensing.” *Frontiers in Chemistry* 8320.
- **WHO Department of Food Safety and Zoonoses, February .(2018).** REF. No.: /NHM Aflatoxins /FOS/RAM/18.1 .
- **Williams, J. H., T. D. Phillips, P. E. Jolly, J. K. Stiles, C. M. Jolly, D. (2004).** Aggarwal. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J.Clin. Nutr.*,80:1106-1122.oxicology.pp.106-108. CRC Press, Boca Roton, Floridam, USA.
- **Woudenberg , J. H. C., Seidl, M. F., Groenewald, J. Z., Vries, M. D., Stielow, J. B., Thomma, B. P. H. J. (2015).** *Alternaria* section: species, form speciales, or pathotypes? *Stud. Mycol.* 82, 1–21.
- **Yu, K. N., Yoon, T. J., Minai-Tehrani, A., Kim, J. E., Park, S. J., Jeong, M. S., ... & Cho, M. H. (2013).** Zinc oxide nanoparticle induced autophagic cell death and mitochondrial damage via

- reactive oxygen species generation. *Toxicology in Vitro*, 27(4), 1187-1195.
- **Zhang Y, Schoch CL, Fournier J, et al.** Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. *Studies Mycol* (2009); 64: 85–102.
  - **Zhang, F., Zhang, Y. Y., Sun, Y. S., Ma, R. H., Thakur, K., Zhang, J. G., & Wei, Z. J. (2019a).** Asparanin A from *Asparagus officinalis* L. induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial carcinoma ishikawa cells via mitochondrial and PI3K/AKT signaling pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 213-224.
  - **Zhang, H., Birch, J., Xie, C., Yang, H., Dias, G., Kong, L., & Bekhit, A. E. D. (2018).** Optimization of extraction parameters of antioxidant activity of extracts from New Zealand and Chinese *Asparagus officinalis* L root cultivars. *Industrial Crops and Products*, 119, 191-200.
  - **Zhang ‘Lingling ‘Yunhong Jiang ‘Yulong Ding ‘Malcolm Povey ‘and David York. (2007).** “Investigation into the Antibacterial Behaviour of Suspensions of ZnO Nanoparticles (ZnO Nanofluids).” *Journal of Nanoparticle Research* 9(3)479–489.
  - **Zhang ‘Tao ‘Caroline Hartl ‘Kilian Frank ‘Amelie Heuer-Jungemann ‘Stefan Fischer ‘Philipp C. Nickels ‘Bert Nickel ‘and Tim Liedl.( 2018).** “3D DNA Origami Crystals.” *Advanced Materials* 30(28)20.

- **Zhu, X., Zhang, W., Zhao, J., Wang, J., & Qu, W. (2010).** Hypolipidaemic and hepatoprotective effects of ethanolic and aqueous extracts from *Asparagus officinalis* L. by products in mice fed a high-fat diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1129-1135.
- **Zohri, A.A., Abdel-Sater, M.A. and Ismail, M.A. (1995)** Incidence of aflatoxins and mold flora in corn snacks. *Journal of Food Science & Technology*, 32(4), 289–294.

الملاحق

**Appendices**

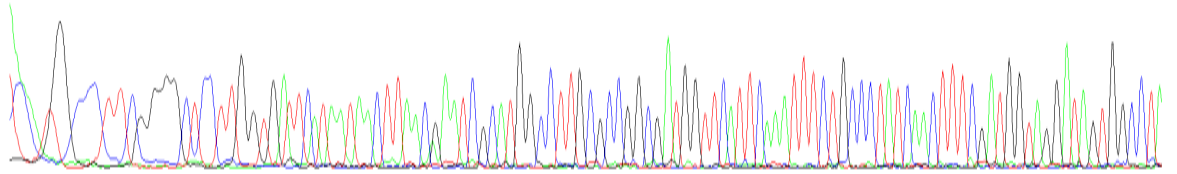
ملحق (1)



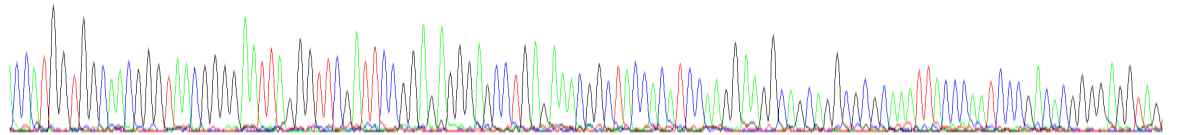
File: K2\_18S.ab1 Run Ended: 2024/10/9 12:39:56 Signal G:169 A:211 C:270 T:206

Sample: K2\_18S Lane: 59 Base spacing: 13.139977 536 bases in 6513 scans Page 1 of 1

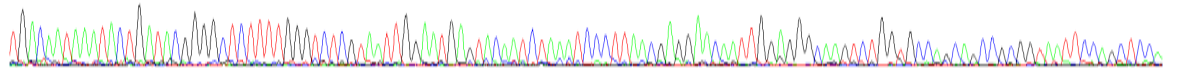
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
 T CA TTG C C C T T T CG G GG C T C C T T G G T G A T T C A T A A T A A C T T A A C G A A T C G C A T G G C C T T G C G C C G C G A T G G T T C A T T C A A A T T T C T G C C C T A T C A A C T T T C G A T G G T A G G A T A G T G G C C T A



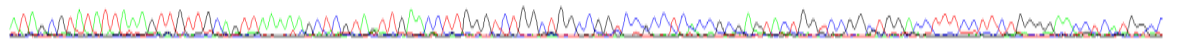
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 C C A T G G T G G C A A C G G G T A A C G G G G A A T T A G G G T T C G A T T C C G A G A G G G A G C T G A G A A C G G C T A C C A C A T C C A A G G A A G G C A G C A G G C C C G C A A A T T A C C C A A T C C C G A C A C G G G G A G T A G



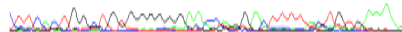
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
 T G A C A T A A A T A C T G A T A C G G G G C T C T T T T G G G T C T C G T A A T T G G A A T G A G T A C A A T C T A A A T C C C T T A A C G A G G A A C A A T T G G A G G C A A G T C T G G T G C A G C A G C C G C G G T A A T T C C A G C T C C A



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
 A T A G C G T A T A T A A A G T T G T T G C A G T T A A A A G C T C G T A A T T G A A C C T T G G G T C T G G C T G C C G G T C C C C T C A C C G C G A G T A C T G G T C C G G C T G G A C C T T T C T T C T G G G G A A C C T C A T G C C



500 510 520 530  
 T T C A C T G G C T G T G G G G G A A C C A G G A C T T T T A C T G T G A A A





ملحق (2)

An official website of the United States government [Here's how you know](#) Log in

NIH National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide   Help

GenBank Send to:

**Aspergillus oryzae isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: PQ654185.1 [FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS PQ654185 483 bp DNA linear PLN 02-DEC-2024  
 DEFINITION Aspergillus oryzae isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION PQ654185  
 VERSION PQ654185.1  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Aspergillus oryzae  
 ORGANISM [Aspergillus oryzae](#)  
 Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
 Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae;  
 Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 483)  
 AUTHORS Hadeel,N.A. and Ban,M.H.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (27-NOV-2024) veterinary pathology, veterinary medicine college, Al-gahir, Kerbala, kerbala 1111, Iraq  
 COMMENT ##Assembly-Data-START##  
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
 ##Assembly-Data-END##  
 FEATURES Location/Qualifiers  
 source 1..483  
 /organism="Aspergillus oryzae"  
 /mol\_type="genomic DNA"  
 /isolate="meat"  
 /db\_xref="taxon:5062"  
 /geo\_loc\_name="Iraq: Karbala, Market"  
 /collection\_date="22-Jan-2023"  
 rRNA  
 <1..>483  
 /product="small subunit ribosomal RNA"  
 ORIGIN  
 1 ctggtgccag cagccgcggt aattccagct ccaatagcgt atattaaagt tgttcagtt  
 61 aaaaagctcg tagttgaacc ttgggtctgg ctggccggtc cgcctcaccg cgagtactgg  
 121 tccggctgga ctttcccttc tggggaacc catggccttc actggctgtg gggggaacca  
 181 ggacttttac tgtgaaaaa ttagagtgtt caaagcaggc ctttgcctga atacattagc  
 241 atggaataat agaataggac gtgcggttct attttgtgg ttctaggac cgcgtaatg  
 301 attaataagg atagtcgggg gcgtcagtat tcagctgtca gagtgaaat ctttgattt  
 361 gctgaagact aactactcgc aaagcattcg ccaaggatgt ttccattaat cagggaacga  
 421 aagttagggg atcgaagacg atcagatacc gtctagttct taaccataaa ctatgccgc  
 481 tag  
 //

**Analyze this sequence**

Run BLAST  
 Pick Primers  
 Highlight Sequence Features  
 Find in this Sequence

**Related information**

Taxonomy

**Recent activity** [Turn Off](#) [Clear](#)

- Aspergillus oryzae isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid
- Aspergillus fumigatus isolate Chicken small subunit ribosomal RNA, Nucleotid
- Aspergillus flavus isolate chicken small subunit ribosomal RNA, Nucleotid
- Aspergillus niger isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid
- Aspergillus flavus isolate XP1Tf small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid

[See more..](#)

**FOLLOW NCBI**

Connect with NLM National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike  
Bethesda, MD 20894

Web Policies  
FOIA  
HHS Vulnerability Disclosure

NLM | NIH | HHS | USA.gov

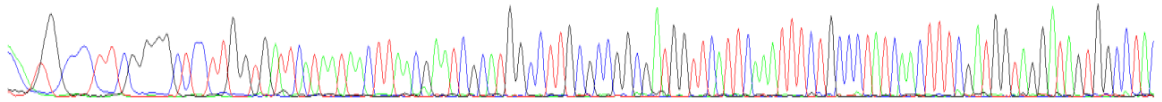
Help  
Accessibility  
Careers

ملحق (3)

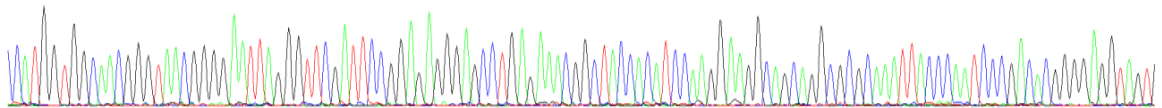


File: K3\_18S.ab1 Run Ended: 2024/10/9 12:39:56 Signal G:377 A:535 C:782 T:532  
 Sample: K3\_18S Lane: 57 Base spacing: 13.1101465 533 bases in 6494 scans Page 1 of 1

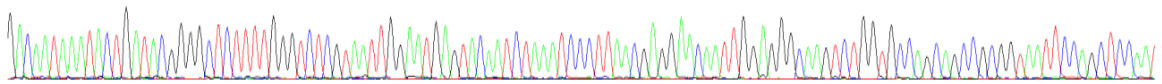
AA TG C C T T CG G GG CT C T T G GT G T T C A T A T A A C T T A A C G A A T C G C A T G G C C T T G C G C C G G C G A T G G T T C A T T C A A A T T T C T G C C C T A T C A A C T T T C G A T G G T A G G A T A G T G G C C T A



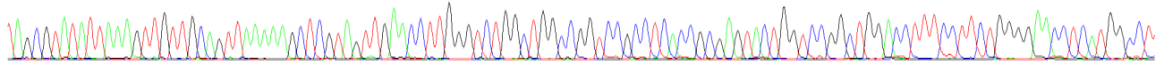
120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 C C A T G G T G G C A A C G G G T A A C G G G G A A T T A G G G T T C G A T T C C G G A G A G G G A G C T G A G A A C G G T A C C A C A T C C A A G G A A G G C A G C A G G C G C G C A A A T T A C C C A A T C C C G A C A C G G G G A G G T A G T



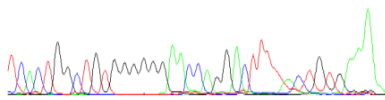
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
 G A C A A T A A A T A C T G A T A C G G G G C T T T T T G G G T C T C G T A A T T G G A A T G A G T A C A A T C T A A A T C C C T T A A C G A G G A A C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G C G G T A A T T C C A G C T C C A A



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
 T A G C G T A T A T T A A A G T T G T T G C A G T T A A A A A G C T C G T A G T T G A A C C T T G G G T C T G G C T G G C C G G T C C G C T C A C C G C G A G T A C T G G T C C G G C T G G A C C T T T C C T T C T G G G G A A C C T C A T G G C C T



500 510 520 530  
 T C A C T G G C T G T G G G G G A A C A G G A C T T T T A C T G T G A A A



ملحق (4)

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

**National Library of Medicine**  
National Center for Biotechnology Information

Log in

Nucleotide Nucleotide Search

Advanced Help

GenBank ▼

Send to: ▼

Change region shown ▼

Customize view ▼

Analyze this sequence ▲

Run BLAST

Pick Primers

Highlight Sequence Features

Find in this Sequence

---

Related information ▲

Taxonomy

---

Recent activity ▲

Turn Off Clear

- Aspergillus fumigatus isolate Chicken small subunit ribosomal RNA ( Nucleotide)
- Aspergillus niger isolate meat small subunit ribosomal RNA gene ( Nucleotide)
- Aspergillus oryzae isolate meat small subunit ribosomal RNA gene ( Nucleotide)
- Aspergillus flavus isolate chicken small subunit ribosomal RNA ( Nucleotide)
- Aspergillus flavus isolate XP1TF small subunit ribosomal RNA gene ( Nucleotide)

See more..

### Aspergillus fumigatus isolate Chicken small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ654184.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

---

Go to: ▼

LOCUS	PQ654184	544 bp	DNA	linear	PLN 02-DEC-2024
DEFINITION	Aspergillus fumigatus isolate Chicken small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	PQ654184				
VERSION	PQ654184.1				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Aspergillus fumigatus				
ORGANISM	<a href="#">Aspergillus fumigatus</a> Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; Aspergillus; Aspergillus subgen. Fumigati.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 544)				
AUTHORS	Hadeel,N.A. and Ban,M.H.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (27-NOV-2024) veterinary pathology, veterinary medicine college, Al-gahir, Kerbala, kerbala 1111, Iraq				
COMMENT	##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..544 /organism="Aspergillus fumigatus" /mol_type="genomic DNA" /isolate="Chicken" /db_xref="taxon:746128" /geo_loc_name="Iraq: Karbala, Market" /collection_date="22-Jan-2023" <1..>544 /product="small subunit ribosomal RNA"				
rRNA	<1..>544				
ORIGIN	1 agcagccgcg gtaattccag ctccaatagc gtatattaaa gttgttcag ttaaaaagct 61 cgtagttaa ccttgggtct ggctggcgg tccgcctcac cgcgagtact ggctcggctg 121 gacctttcct tctggggaac cccatggcct tcactggctg tggggggaac caggactttt 181 actgtgaaaa aattagagtg ttcaaagcag gcctttgctc gaatacatta gcatggaata 241 atagaatagg acgtcgggtt ctattttggt ggtttctagg acccgcgtaa tgattaatag 301 ggatagtcgg gggcgtcagt attcagctgt cagaggtgaa attcctggat ttgctgaaga 361 ctaactactg cgaagcatt cgccaaggat gttttcatta atcagggaac gaaagttag 421 ggatgaaga cgatcagata ccgtcgtagt ctaaccata aactatgccg actagggatc 481 gggcgggtgt tctatgatga cccgctcggc acctaacgag aaatcaaaagt ttttgggtt 541 tggg				

//

**FOLLOW NCBI**

Connect with NLM

National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike  
Bethesda, MD 20894

Web Policies  
FOIA  
HHS Vulnerability Disclosure

Help  
Accessibility  
Careers

NLM | NIH | HHS | USA.gov

ملحق (5)



File: K4\_18S.ab1 Run Ended: 2024/10/9 12:39:56 Signal G:1345 A:1686 C:2420 T:1749  
 Sample: K4\_18S Lane: 55 Base spacing: 13.05031 538 bases in 6521 scans Page 1 of 1



ملحق (6)

An official website of the United States government [Here's how you know](#) Log in

**NIH** National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide   Help

GenBank Send to:

**Aspergillus flavus isolate chicken small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: PQ654182.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS PQ654182 525 bp DNA linear PLN 02-DEC-2024  
DEFINITION Aspergillus flavus isolate chicken small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.  
ACCESSION PQ654182  
VERSION PQ654182.1  
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 525)  
AUTHORS Hadeel,N.A. and Ban,M.H.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (27-NOV-2024) veterinary pathology, veterinary medicine college, Al-gahir, Kerbala, kerbala 1111, Iraq  
COMMENT ##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..525  
/organism="Aspergillus flavus"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/isolate="chicken"  
/db\_xref="taxon:5059"  
/geo\_loc\_name="Iraq: Karbala, Market"  
/collection\_date="22-Jan-2023"  
rRNA <1..>525  
/product="small subunit ribosomal RNA"  
ORIGIN  
1 cagcagccgc ggaattcca gctccaatag cgtatattaa agttgttgca gtaaaaaagc  
61 tcgtagttga accttgggtc tggctggcgc gtcgcctca ccgcgagtac tggctcggct  
121 ggacctttcc ttctggggaa ccccatggcc ttcactggct gtggggggaa ccaggacttt  
181 tactgtgaaa aaattagagt gttcaaaagca ggcctttgct cgaatacatt agcatggaat  
241 aatagaatag gacgtcgggt tctattttgt tggtttctag gaccgccgta atgattaata  
301 gggatagtcg ggggcgtcag tattcagctg tcagagggtg aattcttggg tttgctgaag  
361 actaactact gcgaaagcat tcgccaagga tgttttcatt aatcagggaa cgaaagttag  
421 gggatcgaag acgatcagat accgtcgtag tcttaacctt aaactatgcc gactagggat  
481 cgggcggtgt ttctatgat accgcctcgg caccttacga gaaat  
//

**FOLLOW NCBI**

X
f
in
🔄
📡

Connect with NLM National Library of Medicine

X
f
📺
8600 Rockville Pike
Web Policies
Help

Bethesda, MD 20894
FOIA
Accessibility

HHS Vulnerability Disclosure
Careers

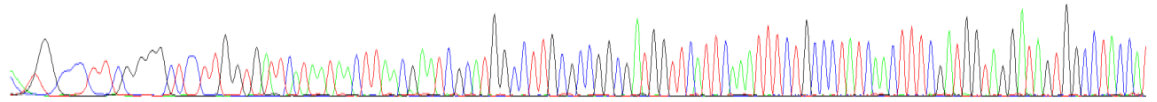
NLM | NIH | HHS | USA.gov

ملحق (7)

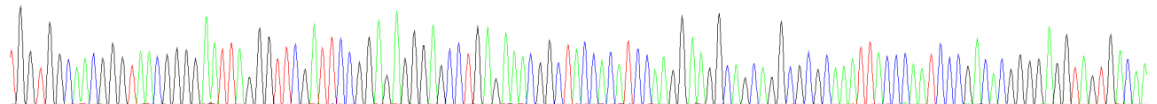


File: K7\_18S.ab1 Run Ended: 2024/10/9 12:39:56 Signal G:3755 A:4441 C:6326 T:4775  
 Sample: K7\_18S Lane: 49 Base spacing: 13.124918 537 bases in 6457 scans Page 1 of 1

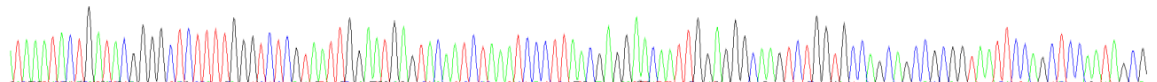
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
 CA TG C C C T T C G G G G C T C T T G G T G A T T C A T A A T A A C T T A A C G A A T C G C A T G G C C T T G C G C C G G C A T G G T T C A T T C A A A T T T C T G C C C T A T C A A C T T T C G A T G G T A G G A T A G T G G C C T A C C A



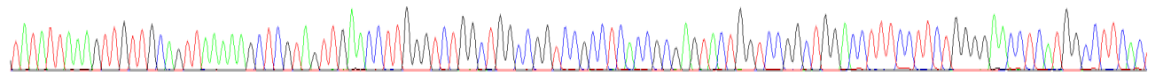
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 T G G T G G C A C G G G T A A C G G G G A A T T A G G G T T C G A T T C C G G A G A G G G A G C C T G A G A A C G G C T A C C A C A T C C A A G G A A G G C A G C A G G C G C G C A A A T T A C C C A A T C C C G A C A C G G G G A G G T A G T G A C A A



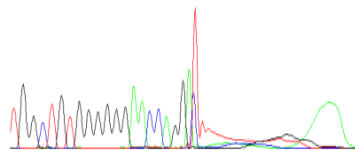
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
 T A A A T A C T G A T A C G G G G C T C T T T T G G G T C T C G T A A T T G G A A T G A G T A C A A T C T A A A T C C C T T A A C G A G G A A C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G C G G T A A T T C C A G C T C C A A T A G C G C



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
 T A T A T T A A A G T T G T T G C A G T T A A A A A G C T C G T A G T T G A A C C T T G G G T C T G G C T G G C C G G T C C G C C T C A C C G C G A G T A C T G G T C C G G C T G G A C C T T T C C T T C T G G G G A A C C T C A T G G C C T T C A C



500 510 520 530  
 T G G C T G T G G G G G A A C C A G G T T T T A T G T C G T G G A A A A A



ملحق (8)

An official website of the United States government [Here's how you know](#) Log in

**NIH** National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide Search

Advanced Help

GenBank Send to: Change region shown

### Aspergillus flavus isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ654183.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to: Customize view](#)

<p><b>LOCUS</b> PQ654183 515 bp DNA linear PLN 02-DEC-2024</p> <p><b>DEFINITION</b> Aspergillus flavus isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.</p> <p><b>ACCESSION</b> PQ654183</p> <p><b>VERSION</b> PQ654183.1</p> <p><b>KEYWORDS</b> .</p> <p><b>SOURCE</b> Aspergillus flavus</p> <p><b>ORGANISM</b> <a href="#">Aspergillus flavus</a> Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.</p> <p><b>REFERENCE</b> 1 (bases 1 to 515)</p> <p><b>AUTHORS</b> Hadeel, N.A. and Ban, M.H.</p> <p><b>TITLE</b> Direct Submission</p> <p><b>JOURNAL</b> Submitted (27-NOV-2024) veterinary pathology, veterinary medicine college, Al-gahir, Kerbala, kerbala 1111, Iraq</p> <p><b>COMMENT</b> ##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##</p> <p><b>FEATURES</b> Location/Qualifiers</p> <p>source 1..515 /organism="Aspergillus flavus" /mol_type="genomic DNA" /isolate="meat" /db_xref="taxon:5059" /geo_loc_name="Iraq: Karbala, Market" /collection_date="22-Jan-2023"</p> <p>rRNA &lt;1..&gt;515 /product="small subunit ribosomal RNA"</p> <p><b>ORIGIN</b></p> <pre> 1 attaaagtgt ttgcagttaa aaagctcgtg gttgaacctt gggctctggct ggcgggtcgc 61 cctcaccgcg agtactggct cggctggacc ttctctctg ggaacccca tggccttcac 121 tggctgtggg ggaaccagg acttttactg tgaaaaaatt agagtgttca aagcaggcct 181 ttgctcgaat acattagcat ggaataatag aataggacgt gcggttctat ttgttggtt 241 tctaggaccg cgtaatgat taatagggat agtcgggggc gtcagtattc agctgtcaga 301 ggtgaaattc ttggatttgc tgaagactaa ctactgcgaa agcattgcc aaggatggtt 361 tcattaatca ggaacgaaa gttaggggat cgaagacgat cagataccgt cgtagtctta 421 accataaact atgccgacta gggatcgggc ggtgtttcta tgaatgaccg ctggcacct 481 tacgagaat caaagttttt ggttctggg gggag //                 </pre>	<p><b>Analyze this sequence</b></p> <p>Run BLAST</p> <p>Pick Primers</p> <p>Highlight Sequence Features</p> <p>Find in this Sequence</p> <hr/> <p><b>Related information</b></p> <p>Taxonomy</p> <hr/> <p><b>Recent activity</b> <span style="float: right;"><a href="#">Turn Off</a> <a href="#">Clear</a></span></p> <ul style="list-style-type: none"> <li> Aspergillus flavus isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid</li> <li> Aspergillus flavus isolate chicken small subunit ribosomal RNA, Nucleotid</li> <li> Aspergillus fumigatus isolate Chicken small subunit ribosomal RNA, Nucleotid</li> <li> Aspergillus niger isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid</li> <li> Aspergillus oryzae isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, Nucleotid</li> </ul> <p style="text-align: right;"><a href="#">See more..</a></p>
--	--

**FOLLOW NCBI**

X
f
in
@
RSS

<p>Connect with NLM</p> <p> </p>	<p>National Library of Medicine 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894</p>	<p>Web Policies FOIA HHS Vulnerability Disclosure</p>	<p>Help Accessibility Careers</p>
----------------------------------	--	---	---

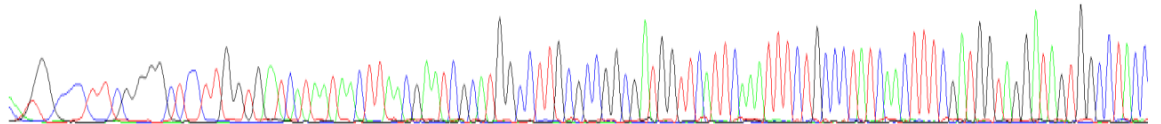
NLM | NIH | HHS | USA.gov

ملحق (9)

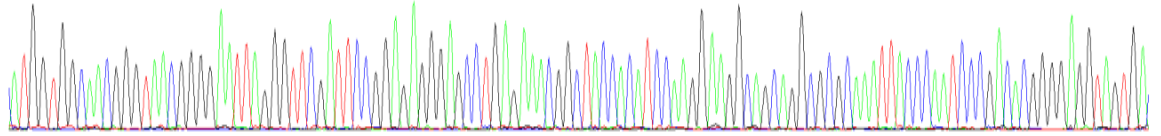


File: K9\_18S.ab1 Run Ended: 2024/10/9 12:39:56 Signal G:1907 A:2722 C:3634 T:2679  
 Sample: K9\_18S Lane: 64 Base spacing: 13.284403 539 bases in 6498 scans Page 1 of 1

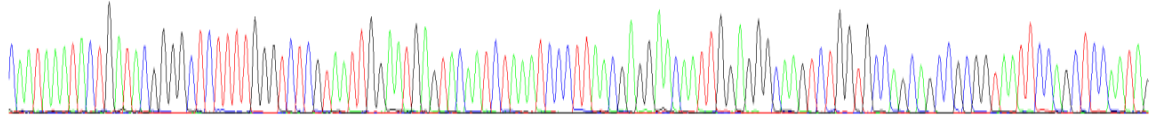
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120  
 CA TG C C T T CG GGGCT C T T GGT G AT C A T A A T A A C T T A A C G A A T C G C A T G G C C T T G C G C C G G C G A T G G T T C A T T C A A A T T T C T G C C C T A T C A A C T T T C G A T G G T A G G A T A G T G G C C T A C C



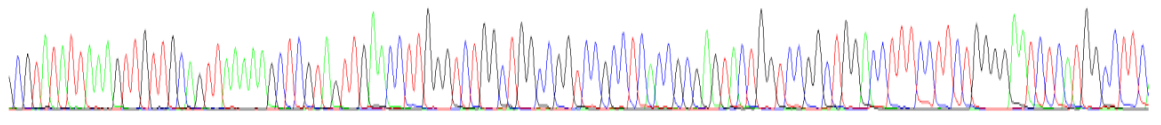
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240  
 A T G G T G G C A A C G G G T A A C G G G G A A T T A G G G T T C G A T T C C G G A G A G G G A G C C T G A G A A C G G C T A C C A C A T C C A A G G A A G G C A G C A G G C G C G C A A A T T A C C C A A T C C C G A C A C G G G A G G T A G T G A



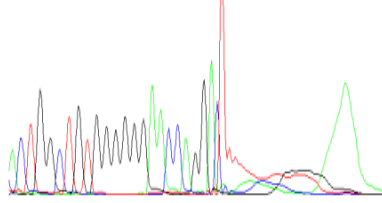
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370  
 C A A T A A A T A C T G A T A C G G G G C T C T T T T G G G T C T C G T A A T T G G A A T G A G T A C A A T C T A A A T C C C T T A A C G A G G A A C A A T T G G A G G G C A A G T C T G G T G C C A G C A G C C G C G G T A A T T C C A G C T C C A A T A G



380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490  
 C G T A T A T T A A A G T T G T G C A G T T A A A A A G C T C G T A G T T G A A C C T T G G G T C T G G C T G G C C G G T C C G C C T C A C C G C G A G T A C T G G T C C G G T G G A C C T T T C C T T C T G G G G A A T C T C A T G G C C T T C



500 510 520 530  
 A C T G G C T G T G G G G G A A C C A G G A T T A T A T C T G T G G A A A A A A





An official website of the United States government [Here's how you know](#)

**National Library of Medicine**  
National Center for Biotechnology Information

Log in

Nucleotide Advanced Help

GenBank Send to: Change region shown

### Aspergillus niger isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ654181.1  
[FASTA](#) [Graphics](#)

---

[Go to](#) (v)

LOCUS	PQ654181	583 bp	DNA	linear	PLN 02-DEC-2024
DEFINITION	Aspergillus niger isolate meat small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.				
ACCESSION	PQ654181				
VERSION	PQ654181.1				
KEYWORDS	.				
SOURCE	Aspergillus niger				
ORGANISM	<a href="#">Aspergillus niger</a> Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina; Eurotiomycetes; Eurotiomycetidae; Eurotiales; Aspergillaceae; Aspergillus; Aspergillus subgen. Circumdati.				
REFERENCE	1 (bases 1 to 583)				
AUTHORS	Hadeel,N.A. and Ban,M.H.				
TITLE	Direct Submission				
JOURNAL	Submitted (27-NOV-2024) veterinary pathology, veterinary medicine college, Al-gahir, Kerbala, kerbala 1111, Iraq				
COMMENT	##Assembly-Data-START## Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing ##Assembly-Data-END##				
FEATURES	Location/Qualifiers				
source	1..583 /organism="Aspergillus niger" /mol_type="genomic DNA" /isolate="meat" /db_xref="taxon:5061" /geo_loc_name="Iraq: Karbala, Market" /collection_date="22-Jan-2023"				
rRNA	<1..583 /product="small subunit ribosomal RNA"				
ORIGIN	1 ttggagggca agtctgggtc cagcagccgc ggtaattcca gctccaatag cgtatattaa 61 agttgttgca gttaaaaagc tcgtagttga acctggggtc tggctggccg gtcgcctca 121 ccgcgagtac tggccggct ggacctttcc ttctggggaa cccatggcc ttcactggct 181 gtggggggaa ccaggacttt tactgtgaaa aaattagat gttcaaaaca ggcctttgct 241 cgaatacatt agcatggaat aatagaatag gacgtgctgt tctattttgt tggtttctag 301 gaccgccgta atgattaata gggatagtcg gggcgctcag tattcagctg tcagaggtga 361 aattcttgga ttgctgaag actaactact gcgaaagcat tcgccaagga tgttttcatt 421 aatcagggaa cgaaagttag gggatcgaag acgatcagat accgtcgtag tcttaaccat 481 aaactatgcc gactagggat cggcggtgt ttctatgat acccgctcg cactctcaga 541 gaaatcaag tttttgggtt ctggggggag tatggtcgca agg				

//

FOLLOW NCBI

Connect with NLM

National Library of Medicine  
8600 Rockville Pike  
Bethesda, MD 20894

Web Policies  
FOIA  
HHS Vulnerability Disclosure

Help  
Accessibility  
Careers

NLM | NIH | HHS | USA.gov

## Summary

The study was conducted in the laboratories of the College of Education for Pure Sciences for the academic year 2023-2024, the laboratories of the Husseinia Shrine for food and the laboratories of Al-Zahra University, and the aim of this study is to evaluate the effectiveness of the alcoholic extract of *asparagus officinalis* and green zinc oxide on the growth of some fungi producing Afla toxin, which were isolated from meat products traded in the local markets and diagnosed with a preliminary diagnosis and then molecular diagnosis using Polymerase Chain Reaction (PCR) technology, which succeeded in doubling the 18S rRNA area and was successfully diagnosed Using the same prefixes in determining the sequence of the nitrogenous bases of the GenBank Information Center that were deposited in the National Center Of Biotechnology Information (NCBI) database for all fungi, and the results of isolation from local and canned meat products collected showed that they were contaminated with fungi and that all fungi that were isolated were producers of Afla toxin and this was inferred using coconut medium with ammonia and using TLC panels. The most important fungi that have been isolated are *Aspergillus flavus*, *A.niger*, *A.oryzae*, *A.fumigatus* and all isolates were recorded in the global gene bank database at the National center of Biotechnology information (NCBI) under the accession numbers PQ654181,PQ654182,PQ654183,PQ654184,PQ654185. TLC& Blast analysis revealed that the inhibition rates of the tested samples were 100% , 90% and 99%.The results of determining the similarity of BLAST analysis of our isolates with the global isolates showed that therThe asparagus extract was prepared by soaking the dry plant parts (roots, stems and leaves) with ethyl alcohol at a concentration of 96% and attended the following concentrations (5, 10, 15, 20 and 25) and mixing the alcoholic plant extract with the cultural media to evaluate the effectiveness of the alcoholic extract in inhibiting the fungi included in the study and calculating the percentage of the alcoholic extract against the tested

fungi MIC inhibition and determining the value of the minimum inhibitory concentration , as the studied fungi showed a variation in their sensitivity towards plant extracts, and after the alcoholic extract of *Asparagus* showed inhibitory effectiveness against the tested fungi, the content of this plant of active compounds showed , that the main reason of showing that effectiveness, were detected by using chemical reagents and using GC-MS technology, Where the results showed that the alcoholic and of the *Asparagus* plant contains carbohydrates, resins, coumarins, tannins, alkaloids, saponnins, glycosides and volatile oils, but using GC-MS technology, the results showed that the alcoholic extract contains the compounds phthalic acid, butyl hex-3-yl ester, Dibutyl phthalate, Phthalic acid, butyl 8-chlorooctyl ester, Xanthotoxol, trimethylacetase, and after they showed Zinc oxide nanooxide inhibitory effectiveness against the studied fungi, the nanomaterial was diagnosed using XRD. UV, SEM, FT-IR, AFM.

The study proved that there are significant differences between all extracts used in the experiments at the level of the function 0.05 and the results showed that the alcoholic extract of *Asparagus* plant is more efficient than zinc nano oxide in inhibiting fungi because the alcoholic extract of asparagus plant contains effective compounds to inhibit fungi.

Republic of Iraq  
Ministry of Higher Education  
and Scientific Research  
University of Karbala  
College of Education for Pure Sciences  
Department of Biology



**Evaluation Of the efficiency of *Asparagus officinal*  
Alcoholic extracts and nano zinc oxide on the growth of  
Some toxin- Producing *Aspergillus* species isolated from  
Meat & Chiken Products in local Market**

**A Thesis submitted to the College of Education for Pure Sciences /  
University of Karbala, as a partial fulfillment of the requirements  
for a degree of the master in Biology**

**By**

**Hadeel Nabeel Ajeel**

**Bachelor of Life Sciences / College of Education for Pure Sciences  
/ University of Karbala – 2016**

**Supervised by**

**Assist. Prof. Dr. Ban Mousa Hassan**

**2025 A.D**

**1446 A.H**