



جامعة كربلاء  
كلية التربية للعلوم الصرفة  
قسم علوم الحياة

## دراسة حيوية كيميائية تشخيصية للفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين B1 والمرافقة لحبوب الحنطة المخزونة

اطروحة مقدمة

الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة – علم النبات

كتبت بواسطة

انتظار جبار محمد العيداني

بإشراف

ا. د. احمد نجم عبد الله

ا.م. د. بان موسى حسن

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالَ لَوْ نَادَيْتُمْ تَسْبَحًا بِسْمِ اللَّهِ لَحَمَلْنَا لَئِنَّا رَبَّ اللَّهِ

بِأَسْمَاءِ اللَّهِ الْكَلِيمَةِ الْعَلِيِّ الْعَلِيِّ الْعَلِيِّ

عِزِّ الْعَلِيِّ الْعَلِيِّ الْعَلِيِّ

## الاهداء

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

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

الى بهجة حياتي وقرّة عيني ..... اطفالي الأحبة

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

السلامة  
السلامة  
السلامة

بسم الله الرحمن الرحيم

شكر وتقدير

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

أتقدم بخالص الشكر والتقدير للأستاذة الدكتورة بان موسى حسن والأستاذ الدكتور احمد نجم عبد الله المشرفين على هذه الأطروحة، لما قدما من توجيهات قيمة وملاحظات بناءة طوال فترة إعداد هذا البحث اذ كانت نصائحهم بمثابة الوقود لي خلال هذه الرحلة فجزاهما الله عني خير الجزاء وقد رني على رد جزء من فضائلهما .

أتوجه بالشكر الى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ورئاسة قسم علوم الحياة لما قدموه من تسهيلات لطلبة الدراسات العليا جميعاً" .

كما اتقدم بجزيل الشكر لعمادة كلية العلوم الطبية التطبيقية لإتاحتهم الفرصة للعمل في مختبراتهم العلمية لإكمال مشروع البحث وتذليل الصعوبات

ومن دواعي الوفاء أن أوجه شكري وتقديري الى الدكتورة دعاء فايق علي والدكتور حيدر محمد علي لتقديمهما المساعدة والعون لإنجاز الأطروحة فجزاهم الله عني خير الجزاء.

واخيراً" الشكر والتقدير لكل من قدم لي المساعدة أو النصيحة أو أهداني جواباً" أطفئ به حيرة سؤالي وساهم في انجاز الدراسة.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ  
مِنْهُ نَسْتَعِينُ  
وَعَلَيْهِ نَرْجِعُ

## إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة الموقعين ادناه نشهد باننا قد اطلعنا على الاطروحة الموسومة " دراسة حيوية كيميائية تشخيصية للفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين B1 والمرافقة لحبوب الحنطة المخزونة " المقدمة من قبل الطالبة انتظار جبار محمد كجزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة / علم النبات ، وبعد اجراء المناقشة العلمية وجد انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبولها بتقدير امتياز .

عضو اللجنة  
التوقيع:

الاسم : ا.د. سعدية ياسر عوفي

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة القادسية – كلية التقانات الاحيائية

التاريخ : / / 2025

رئيس لجنة المناقشة  
التوقيع:

الاسم : ا.د. قيس حسين عباس

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : / / 2025

عضو اللجنة  
التوقيع:

الاسم : ا.م.د. هدى عبد الرضا عبد الله

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية العلوم الطبية التطبيقية

التاريخ : / / 2025

عضو اللجنة  
التوقيع:

الاسم : ا.د. عبد الزهرة جبار علي

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء – كلية الزراعة

التاريخ : / / 2025

عضو اللجنة (مشرفاً)  
التوقيع:

الاسم : ا.م. د. بان موسى حسن

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : / / 2025

عضو اللجنة  
التوقيع:

الاسم : ا.م.د. محسن عبد علي محسن

المرتبة العلمية : استاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية الزراعة

التاريخ : / / 2025

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة  
التوقيع:

الاسم : ا.د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2025

عضو اللجنة (مشرفاً)  
التوقيع:

الاسم : ا.د. احمد نجم عبد الله

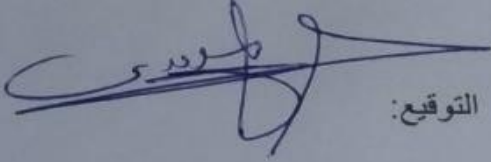
المرتبة العلمية : استاذ

العنوان : جامعة كربلاء – كلية الزراعة

التاريخ : / / 2025

## توصية المشرف

اشهد بان إعداد هذه الاطروحة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات درجة الدكتوراه في علوم الحياة / علم النبات .



التوقيع:

الاسم: د. احمد نجم عبد الله

المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان : جامعة كربلاء / كلية الزراعة

التاريخ : / / 2025



التوقيع:

الاسم: د. بان موسى حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : / / 2025

## توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى اقرار المشرف في اعلاه ، أحيل هذه الاطروحة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .



التوقيع:

الاسم: ا.م.د. علاء حسين مهدي الصافي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2025

## SUMMARY الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء للفترة من 2023/10/12 ولغاية 2025/1/22 . اذ تم عزل بعض الفطريات المرافقة لأنواع من الحبوب المحلية والمخزونة في بعض السائلوات في محافظة كربلاء والكشف عن قدرتها في إنتاج الافلاتوكسين B1 باستخدام كشف الامونيا وتقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (Thin Layer Chromatography (TLC) ، وقياس تركيز الافلاتوكسين B1 باستخدام تقنية (High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) تم تشخيص الفطريات المعزولة بالطريقة التقليدية كما شخصت جزئياً بتقنية Polymerase chain reaction (PCR) .

اختيرت عزلتان كانت احدهما اكثر انتاجاً للافلاتوكسين B1 والاخرى الاقل انتاج للافلاتوكسين B1 وذلك لغرض إيجاد المقارنة بينهما عبر اجراء تقنية تفاعل البوليمرايز المتسلسل الكمي في الوقت اللحظي ( الاستنساخ العكسي )

اختبرت فعالية عزلة البكتريا *Azotobacter chroococcum* في تثبيط عزلات الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 ، تم تصنيع مستحضر حيوي من لقاح بكتريا *A. chroococcum* ، واختبار فعالية المستحضر الحيوي في حماية حبوب الحنطة من الإصابة بالفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 .

اظهرت النتائج تلوث حبوب الحنطة المخزونة بالفطريات المنتجة للافلاتوكسين بأعداد مختلفة ، اذ بلغ العدد الكلي للعزلات الفطرية مقدار 349 عزلة تمثلت بتسعة انواع ، وهذه الانواع تعود لخمسة اجناس الفطريات من الخيطية تمثلت بالأجناس *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Alternaria* ، *Fusarium* و *Talaromyces* ، أما الأنواع هي *A. flavus* ، *A. niger* ، *A. terrus* ، *A. tubingensis* ، *A. caespitosus* ، *P. camemberti* ، *Alternaria* ، *F. equiseti* و *Talaromyces tiftonensi* ، حيث كانت عدد عزلات الفطر *Aspergillus* spp. هي الأكثر سيادة من بين الأنواع الفطرية المعزولة ، اذ بلغت 258 عزلة .

بينت نتائج التقدير الكمي بتقنية الكروماتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC ان عزلة الفطر *A. flavus1* كانت اكثر عزلة منتجة للافلاتوكسين B1 بتركيز 215.9 ppb تلاها الفطر *A. niger3* بتركيز 184.9 ppb ، جاء بالمرتبة الثالثة الفطر *A. flavus3* بتركيز 162.5 ppb ، ثم العزلات *A. flavus2* بتركيز 156.9 ppb ، *P. camembeti* بتركيز 155.8 ppb ، *Alternaria* بتركيز 145.9 ppb ، ثم *A. niger2* و *A. tubingensis* بتركيز 124.6 و 114.5 ppb في حين كانت نتائج التقدير الكمي للافلاتوكسين للعزلات *A. terrus* بتركيز 90.5 ppb ، *A. caespitosus* بتركيز 44.9 ppb ، *F. equiseti* بتركيز 41.3 ppb و *Talaromyces tiftonensis* بتركيز 35.61 ppb ، اما اقل عزلة منتجة للافلاتوكسين B1 كانت *A. niger1* بتركيز 30.5 ppb .

أكدت الدراسة تشخيص البكتريا *A. chroococcum* مظهرياً ومجهرياً واكد التشخيص بتقنية PCR ، عبر تحديد تتابع القواعد النايتروحينية العائدة لهذه البكتريا التي أودعت في قاعدة بيانات البنك الجيني التابعة للمركز الدولي لمعلومات التقانات الأحيائية (NCBI) National Center of Biotechnology Information ، اذ حدد للبكتريا رمز تسلسلياً خاصاً بها وهو PQ516743.1 .

أثبتت الدراسة أن البكتريا *A. chroococcum* ذات كفاءة عالية في تثبيط النمو الشعاعي للفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 المعزولة والنامية على وسط PDA وخاصة عند التركيز 3 مل من المعلق البكتيري اذ بلغ قطر المستعمرة الفطرية 0.00 سم ولجميع الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 ، وبلغت النسبة المئوية للتثبيط ولجميع الفطريات المدروسة 100 % . في حين اظهر التركيز 2 مل من المعلق البكتيري كفاءة عالية في تثبيط الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 اذ بلغ قطر المستعمرة 0.00 سم للأجناس *A.niger1* ، *Talaromyces* و *Alternaria Alternaria* ، *P.camemberti*، *A.caespitosis* ، *A.niger2* ، *tiftonensis* ، في حين بلغت اقطار المستعمرات للأجناس *A.flavus1* ، *A.flavus2* و *A.flavus3* 2.50 ، 0.50 ، 2.05 سم على التتابع، أما الأجناس *A.niger3*، *A.terrus*، *A.tubingensis* و *F. equiseti* بلغ اقطار مستعمراتها 3.70 ، 1.25 ، 2.45 و 1.12 سم على التتابع .

بينت النتائج أن التركيز 1 مل من المعلق البكتيري أعطى نتائج تثبيط أقل ضد معظم الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 .

بينت الدراسة ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم  $CaCo_3$  كمادة حاملة للقاح البكتريا *A. chroococcum* اذ التركيز العالي للخلايا البكتيرية في الغرام الواحد من هذه المادة  $10^{12} \times 110$  وحدة تكوين مستعمرة. غرام<sup>-1</sup> .

اثبتت الدراسة ان المستحضر الحيوي المصنع من لقاح بكتريا *A. chroococcum* يمتلك كفاءة عالية في حماية حبوب الحنطة من الإصابة بالفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 وذلك من خلال التجربة الخزنية التي أستمرت لمدة ستة أشهر وباستخدام تقنية HPLC ، اذ كشفت نتائج التقدير الكمي بتقنية HPLC وجود فروق معنوية بين حبوب الحنطة دون اي معاملة (Control) مع حبوب الحنطة الملوثة بلقاح العزلات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسين B1 وبين المعاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري والموثة باللقاح الفطري . فبلغ تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.flavus1* فقط يقدر بـ 168.1 PPb في حين بلغ تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.flavus1*

مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري يقدر بـ 41.6 PPb . في حين كان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطريات *A.tubigensis* ، *A.terrus* ، *A.niger2* ، *F. equiseti* و *A.niger 3* فقط تقدر بـ 173.9 ، 132.8 ، 142.9 ، 166.9 و 174.2 PPb بالتتابع ، وكان تركيز

الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطريات نفسها مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري يقدر بـ 33.6 ، 27.9 ، 41.0 ، 27.9 و 25.6 PPb بالتتابع .

بينت النتائج أن حبوب الحنطة الملوثة بلقاح العزلات الفطرية كانت منتجة للافلاتوكسين B1 وبتراكيز عالية مقارنة مع حبوب الحنطة المعاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري والملوثة باللقاح الفطري بعد مرور ستة أشهر من الخزن. اذ كان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب الحنطة دون أي معاملة (Control) يقدر بـ 4.1 PPb وكان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب الحنطة المعاملة بالمستحضر البكتيري فقط يقدر بـ 0.25 PPb

## قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
I	الخلاصة	
10	قائمة المحتويات	
10	قائمة الجداول	
X	قائمة الأشكال	
2-1	المقدمة Introduction	1
25-3	استعراض المراجع Literature Review	2
3	الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة	1-2
5	السموم الفطرية Mycotoxins	2-2
6	مخاطر تواجد السموم الفطرية في الحبوب	1-2-2
8	مستويات تواجد السموم الفطرية في الاغذية البشرية	2-2-2
8	الافلاتوكسين Aflatoxins	3-2
10	الفطر <i>Aspergillus spp.</i>	4-2
11	النوع <i>A. flavus</i>	1-4-2
12	النوع <i>A. niger</i>	2-4-2
13	النوع <i>A. terreus</i>	3-4-2
14	النوع <i>A. tubingensis</i>	4-4-2
15	النوع <i>A. caespitosus</i>	5-4-2
16	النوع <i>P. camemberti</i>	5-2
17	النوع <i>A.alternata</i>	6-2

18	<i>F. equiseti</i> النوع	7-2
19	<i>Talaromyces columbinus</i> النوع	8-2
20	Polymerase Chain Reaction تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل	9-2
21	AFLD الجين	10-2
22	Control Biological المكافحة الأحيائية	11-2
23	<i>Azotobacter</i> sp. البكتريا الاحيائية	1-11-2
26	Materials and Methods المواد وطرائق العمل	3
26	الاجهزة والادوات المستعملة	1-3
30	Method طرائق العمل	2-3
30	تحضير المحاليل والصبغات المستخدمة في الدراسة	1-2-3
30	Gram Stain محلول صبغة كرام	1-1-2-3
30	محلول الفصل لصفائح الكروماتوغرافي	2-1-2-3
30	Aflatoxin B1 السم القياسي	3-1-2-3
30	Preparing the media Culture تحضير الأوساط الزرعية	2-2-3
30	Potato Dextrose Agar(PDA) وسط بطاطا دكستروز اكار	1-2-2-3
31	Coconut agar medium(CA) وسط جوز الهند	2-2-2-3
31	Nutrient Agar (NA) وسط الاكار المغذي	3-2-2-3
31	Nutrient Broth (NB) وسط المرق المغذي	4-2-2-3
31	Collection of samples جمع العينات	3-2-3
31	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض انواع الحبوب المحلية	1-3-2-3

32	حفظ العزلات الفطرية	2-3-2-3
32	اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج سم الافلا	3-3-2-3
32	Ammonia Test اختبار الامونيا	1-3-3-2-3
33	الكشف عن سم الافلا B1 باستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقية Thin Layer Chromatography ( TLC)	2-3-3-2-3
33	قياس تركيز سم الافلا B1 باستخدام تقنية HPLC	3-3-3-2-3
34	Molecular Identification التشخيص الجزيئي	4-3-3-2-3
38	تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي العكسي في الوقت الحقيقي Real-Time Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction	4-3-2-3
42	عزل وتشخيص بكتريا <i>Azotobacter chroococcum</i>	4-2-4
42	Microscopic properties فحص الصفات المجهرية	1-4-2-4
42	التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية <i>A. chroococcum</i>	2-4-2-4
46	حفظ عزلة البكتريا <i>A. chroococcum</i>	3-4-2-4
46	حساب الكثافة العددية للبكتريا <i>A. chroococcum</i>	4-3-2-4
46	اختبار فعالية عزلة البكتريا <i>A. chroococcum</i> في تثبيط الفطريات المنتجة لسم الافلا	5-3-2-4
47	مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا <i>A. chroococcum</i>	5-2-3
47	تنمية عزله البكتريا <i>A. chroococcum</i>	1-5-2-3
47	اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم $CaCo_3$ كمادة حاملة للقاح البكتريا <i>A. chroococcum</i>	2-5-2-3
48	اختبار كفاءة المستحضر الحيوي المصنع من بكتريا <i>A. chroococcum</i> في حماية حبوب الحنطة المأخوذة خلال فترة الحصاد من الإصابة بالفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1	3-5-2-3

49	التحليل الإحصائي	6-2-3
51	النتائج والمناقشة	4
51	عزل الفطريات	1-4
53	تشخيص الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين والمعزولة من حبوب الحنطة	2-4
53	التشخيص المظهري والمجهري	1-2-4
63	الكشف عن قدرة العزلات الفطرية على إنتاج الأفلاتوكسين B1	2-2-4
90	فحص تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي العكسي في الوقت الحقيقي ( RT-qPCR)	3-2-4
93	عزل وتشخيص بكتريا <i>Azotobacter chroococcum</i>	3-4
93	فحص الصفات المظهرية والمجهرية	1-3-4
94	التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية <i>A. chroococcum</i>	2-3-4
96	حساب الكثافة العددية للبكتريا <i>A. chroococcum</i>	3-3-4
96	اختبار فعالية عزلة البكتريا <i>A. chroococcum</i> في تثبيط العزلات الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1	4-3-4
102	مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا <i>A. chroococcum</i>	4-4
102	اختبار نقاوة حبوب الحنطة	1-4-4
102	اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ كمادة حاملة للقاح البكتريا <i>A. chroococcum</i>	2-4-4
103	حساب الكثافة العددية للبكتريا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي	3-4-4
103	دراسة فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح بكتريا <i>A. chroococcum</i> في حماية حبوب الحنطة من الإصابة بالفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1	4-4-3
114	الاستنتاجات Conclusions	

115	التوصيات Recommendation	
116	المصادر العربية ARABIC REFERENCES	
121	المصادر الاجنبية FOREIGN REFERENCES	
i-iii	الخلاصة الانكليزي	

### قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
26	الأجهزة والمعدات المختبرية التي استعملت في الدراسة	1-3
28	المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة	2-3
29	الايوساط الزراعية المستعملة	3-3
29	العدد Kits المستعملة في الدراسة	4-3
36	البودئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)	5-3
36	مكونات خليط التفاعل لبرنامج PCR	6-3
37	خطوات تفاعل PCR	7-3
40	مكونات مزيج تفاعل RT - PCR لنظام أحادي الخطوة GoTaq®	8-3
41	الظروف الحرارية المثلى لمراحل RT – PCR	9-3
44	البودئ المستعملة في مضاعفة الجين 16s rRNA	10-3
44	مكونات خليط التفاعل لبرنامج PCR	11-3
45	شروط برنامج PCR	12-3

48	تنفيذ المعاملات للتجربة الخزنية	1-4
52	العدد الكلي لمستعمرات الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة المخزونة	2-4
53	النسب المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة المخزونة	3-4
65	نسبة تركيز سم الافلاتوكسين B1 بتقنية HPLC	4-4
74	الرموز التسلسلية المحددة في البنك الجيني للفطريات المنتجة للافلاتوكسين والمعزولة من حبوب لحنطة	5-4
76	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. flavus1</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	6-4
77	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. flavus2</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	7-4
78	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. flavus3</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	8-4
79	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. niger1</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	9-4
80	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. niger2</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	10-4
81	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. niger3</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	11-4

82	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. terrus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	12-4
83	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. tubingens</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	13-4
84	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>A. caespitosus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	14-4
85	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>P.camemberti</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	15-4
86	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>Alternaria alternate</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	16-4
87	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>F. equiseti</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	17-4
88	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر <i>Talaromyces tiftonensis</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI	18-4
89	الاختلافات بين السلالات المشخصة لـ <i>A. niger</i> و <i>A. flavus</i>	19-4
92	التعبير الجيني لجين الـ ITS وجين الـ AFLD باستخدام طريقة Livak method للعزلتين الفطريتين <i>A. niger1</i> و <i>A. flavus2</i>	20-4
95	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للبكتريا <i>A. chroococcum</i> مع العزلات العالمية التابعة لنفس النوع والمسجلة عالميا في NCBI	21-4

98	تأثير البكتريا <i>A. chroococcum</i> في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 بعد أسبوع من الحضان بدرجة حرارة $27 \pm 2$ م°	22-4
104	معاملات التجربة الخزنية ونسبة تركيز الافلاتوكسين AFB1 بتقنية HPLC بعد مرور ستة أشهر من الخزن	23-4

### قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	رقم الشكل
54	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>A. flavus</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	1-4
55	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>A. niger</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	2-4
56	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>A. terreus</i> على وسط PDA	3-4
57	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>A. tubingensis</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	4-4
58	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>A. caespitosus</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	5-4
59	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>P. camemberti</i> وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	6-4
60	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>Alternaria alternate</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	7-4
61	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>F. equiseti</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	8-4
62	الصفات المظهرية والمجهريية للفطر <i>Talaromyces tiftonensis</i> على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°	9-4

66	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. flavus1</i>	10-4
67	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. niger3</i>	11-4
67	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. flavus3</i>	12-4
68	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. flavus2</i>	13-4
68	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>p.camembeti</i>	14-4
69	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>Alternaria alternate</i>	15-4
69	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. niger2</i>	16-4
70	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A.tubingensis</i>	17-4
70	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر <i>A.terrus</i> HPLC بواسطة	18-4
71	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. caespitosus</i>	19-4
71	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>F. equiseti</i>	20-4
72	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>Talaromyces tiftonensis</i>	21-4
72	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر HPLC بواسطة <i>A. niger1</i>	22-4

73	المخطط الكروماتوغرافي للستاندر القياسي لسم الافلا B1 عند تركيز 5PPb بواسطة HPLC	23-4
76	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. flavus</i> AJM-6 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	24-4
77	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. flavus</i> AJM-8 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBan	25-4
78	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. flavus</i> AJM-11 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	26-4
79	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. niger</i> AJM-5 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	27-4
80	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. niger</i> AJM-12 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	28-4
81	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. niger</i> AJM-13 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	29-4
82	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. terreus</i> AJM-9 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	30-4

83	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. tubingensis</i> AJM-7 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة-ITS rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	31-4
84	الشجرة الوراثية للفطر <i>A. caespitosus</i> AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة-ITS rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	32-4
85	الشجرة الوراثية للفطر <i>P. camemberti</i> AJM-14 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة-ITS rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	33-4
86	الشجرة الوراثية للفطر <i>Alternaria alternate</i> AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	34-4
87	الشجرة الوراثية للفطر <i>F. equiseti</i> AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	35-4
88	الشجرة الوراثية للفطر <i>Talaromyces tiftonensis</i> AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank	36-4
92	الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين الـ ITS وجين الـ AFLD للعزلتين <i>A. niger1</i> و <i>A. flavus2</i>	37-4
93	منحنى تضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليمريز بالوقت الحقيقي PCR-time Real والخاص بجين الـ ITS4 وجين AFLD للعزلتين <i>A. niger1</i> و <i>A. flavus2</i>	38-4

94	الصفات المظهرية والمجهريّة للبكتريا <i>A. chroococcum</i>	39-4
95	الشجرة الوراثية للبكتريا المدروسة <i>A. chroococcum</i> والمؤشرة باللون الاصفر توضح العلاقة الوراثية بينها وبين العزلات الأخرى العائدة لنفس النوع و المسجلة سابقا في NCBI	40-4
102	تأثير البكتريا <i>A. chroococcum</i> على نمو الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 بعد أسبوع من الحضان بدرجة حرارة $27 \pm 2$ م <sup>0</sup>	41-4
105	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.flavus</i> 1 فقط	42-4
105	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.flavus</i> 1+المستحضر الحيوي البكتيري	43-4
106	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.tubigenis</i> فقط	44-4
106	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.terrus</i> فقط	45-4
107	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.tubigenis</i> +المستحضر الحيوي البكتيري	46-4
107	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.terrus</i> + المستحضر الحيوي البكتيري	47-4
108	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 2 فقط	48-4
108	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 2 + المستحضر الحيوي البكتيري	49-4
109	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>F. equiseti</i> فقط	50-4
109	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر <i>F. equiseti</i> + المستحضر الحيوي البكتيري	51-4

110	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج منحبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger3</i> فقط	52-4
110	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج منحبوب ملوثة بالفطر <i>niger3</i> + المستحضر الحيوي البكتيري	53-4
111	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الحبوب دون اي معاملة (Control)	54-4
111	المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	55-4

## المقدمة INTRODUCTION

تعد الفطريات من أهم المشاكل الكبيرة التي تواجه العالم في الوقت الحالي وذلك لانتشارها الواسع في الطبيعة ، كما تسبب التلف الجرثومي للمواد الغذائية اذ يمكنها النمو في مجموعه واسعه من أغذية الأنسان بما فيها المواد الخام (Gizachew وآخرون 2019) . اذ تؤثر في صحة الانسان عبر استهلاكه للسموم التي تنتج من بعض الفطريات بوساطة السلسلة الغذائية في البلدان المتقدمة والنامية (Hymery وآخرون 2014).

تعمل بعض الفطريات التي تنمو بصورة رمية Saprophytic على افراز نواتج ايسوية ثانوية تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxin ( Bennett و Klich ، 2003 )، ان أكثر السموم الفطرية فعالية وأكثرها انتشارا هي الافلاتوكسين وهي مركبات ايسوية ثانوية تنتجها مجموعة من الفطريات وتتميز بانخفاض وزنها الجزيئي مما يؤدي إلى عدم قدرة الجهاز المناعي على التعرف عليها لذلك، فإنها تتراكم في أعضاء وأنسجة مختلفة كالطحال والكلى و الكبد ، كما تعد من اخطر انواع السموم المعروفة بسبب قدرتها على تحمل درجات الحرارة المرتفعة جدا (الجميلي، 2014) .

الأفلاتوكسينات هي مواد مسرطنة وسامة تنتجها مجموعة واسعه من الفطريات الخيطية ، أهمها *Aspergillus spp* والتي تلوث مجموعة واسعه من الحبوب، مثل الحنطة ، الذرة والبقول السوداني اذ تجعلها غير صالحة للاستهلاك كما تضر بصحة الأنسان والحيوان (Guan وآخرون 2021) . يعد الفطر *A. flavus* من اكثر الانواع الفطرية وجودا" في الاغذية ( Bennett و Klich ، 2003 ) .

تعد بكتريا *Azotobacter* من العوامل الإحيائية المستخدمة لمكافحة مسببات المرضية و هي من انواع السلالات البكتيرية التي تعمل على تثبيت النتروجين في منطقة الرايزوسفير (العامري، 2021 Muslim وآخرون ، 2021) .

تعمل البكتريا أيضا" على تحفيز نمو النبات وزيادة المجموع الخضري والجذري وإنتاج بادرات قوية وإنتاج الكلوروفيل بكميات كبيرة وحماية النبات من الإصابة بالمسببات المرضية في التربة وذلك بتأثيرها في الأحياء الممرضة التي تنافسها على الغذاء (Saharan و Nehra ، 2011 ; Soleymanifard وآخرون، 2022) .

تعد بكتريا *Azotobacter* من اهم الاستراتيجيات المستخدمة ضد مسببات المرضية وذلك بقدرتها على افراز انزيمات خاصة مثل انزيم Aminocycloprpane carboxylic acide (ACC) deaminase الذي ينظم عمل منظمات النمو وكذلك الأنزيمات المحللة لجدران خلايا مسببات المرضية للنبات والحاوية على الكايتين مما يؤدي الى توفير حماية للنبات من مسببات المرضية (Aasfar وآخرون، 2021 Riaz ; وآخرون ، 2022) .

تتميز البكتريا بانها غير سامة للإنسان والحيوان ولا يوجد لها تأثيرات جانبية سلبية وذات تكلفة قليلة ( Quaglia واخرون، 2022) . استخدمت في مجالات متعددة مثل صناعة الادوية والمواد الغذائية (Intaparn واخرون ، 2020) .

من أجل حماية الانسان والحيوان من الأضرار الناتجة من هذه السموم أجريت العديد من الدراسات خلال السنوات الماضية لمنع التلوث بالأفلاتوكسينات وذلك من خلال استعمال طرائق المكافحة مثل المكافحة البيولوجية وتطوير اصناف مقاومة والمبيدات الفطرية .

أظهرت المكافحة البيولوجية للأفلاتوكسين نتائج أكثر فعالية في محاصيل ما قبل الحصاد وبعده بسبب قدرتها على التخلص من السموم، والحفاظ على جودة الأعلاف والأغذية، كما أنها صديقة للبيئة و أقل خطورة , يمكن تلافي تلوث الاغذية بطرائق حيوية لا تسبب خللاً للنظام البيئي وليس لها تأثيرات جانبية في صحة الإنسان أو الحيوان ولا تسبب أي تغييرات في نظام السلاسل الغذائية (الأسدي، 2013)

نظراً للأهمية الاقتصادية للحنطة، اذ تعد من المحاصيل المهمة في العراق والعالم، وتأتي أهميتها بوساطة تعدد استخدامها إذ تدخل في غذاء الانسان بصورة مباشرة أو غير مباشرة أو عبر استخدامها بشكل أساسي في العليقة الحيوانية . لذلك كان هدف هذه الدراسة الى عزل الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين من حبوب الحنطة وتشخيصها مظهرياً " وجزئياً" ، وايجاد بديل حيوي آمن للحد من مشكلة التلوث الغذائي بالسموم الفطرية وتمثلت ببكتريا *Azotobacter chroococcum* واختبار كفاءتها في تثبيط الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 ولحماية الحبوب من التلوث بالفطريات وقد تمحورت الدراسة حول الآتي :

- 1- عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لحبوب الحنطة في بعض مخازن حبوب محافظة كربلاء.
- 2- اختبار مقدرة العزلات على انتاج الافلاتوكسين .
- 3- تقدير كمية السم للعزلات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسين B1.
- 4- مقارنة التعبير الجيني بتقنية التعبير الجيني للعزلة الاكثر انتاجاً للأفلاتوكسين B1 والعزلة الاقل انتاجاً للأفلاتوكسين B1 .
- 5- اختبار الفعالية التثبيطية لبكتريا *Azotobacter chroococcum* ضد الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 .

## استعراض المراجع Literature Review

### 1-2- الفطريات المرافقة لحبوب الحنطة

تعد سلامة الأغذية من القضايا الرئيسية في العالم التي نالت اهتماماً كبيراً ، إذ ان الأمن الغذائي هو أساس صحة الإنسان ( Ayelign و De Saege، 2020 ) . لتحقيق الأمن الغذائي للإنسان يجب ان تتوفر فيه مجموعة من الخصائص الغذائية اهمها ان يكون الغذاء غير ضار وغير سام وان لا يسبب خطراً على صحة الإنسان ( Udomkun واخرون ، 2017 ) .

تمثل الحبوب، مصدرًا رئيسًا للطاقة والتغذية في النظام الغذائي للإنسان في جميع أنحاء العالم ويتم استهلاك الحبوب عمومًا كحبوب خام أو مطبوخة أو على شكل منتجات مصنعة مثل الدقيق والسميد والخبز والبسكويت في كثير من الأحيان، كما يتم استخدام محاصيل الحبوب ومنتجاتها الثانوية أيضًا كعلف للحيوانات للماشية والدواجن ، ووفقاً لمنظمة الأغذية والزراعة ( FAO) Food and Agriculture Organization فإن ربع إجمالي إنتاج محاصيل الحبوب في العالم ملوث بالسموم الفطرية (Pankaj واخرون ،2018; Mahato واخرون،2019) .

تعد الحنطة *Triticum astivum* L. التي تنتمي إلى عائلة Poaceae، مصدرًا غذائيًا حيويًا لحوالي 33% من سكان العالم . اذ تتم زراعة غالبية الحنطة في الصين والهند وروسيا والولايات المتحدة وكندا. ويُعتقد أن إنتاجية هذه الدول تمثل أكثر من 80% من إجمالي الكمية المنتجة في جميع أنحاء العالم (Senapati و Semenove،2019).

يحتل العراق المرتبة الحادية والثلاثين من بين الدول الأكثر إنتاجاً للحنطة ، حيث بلغت إنتاجيته

عام 2018 حوالي 7.2 مليون طن، وفقاً لأرقام منظمة الأغذية والزراعة ( FAO) Organization (2018) .

تحتوي الحنطة على نسبة عالية من البروتين تتراوح (9.2- 11.3) % ، كما تحتوي على فيتامينات

المجموعة ب ، و نسبة من الرطوبة تتراوح بين 8.4-9.8% .

تتميز الحنطة ايضاً باحتوائها على خليط من العناصر المغذية مثل Mg ، Zn ، Cu و P (Johanson واخرون، 2020).

تدخل الحنطة في العديد من الصناعات مثل المنتجات الغذائية كالخبز والبسكويت والمعكرونة وتستخدم في

مستحضرات التجميل وتحضير الايثانول ( Cappelli واخرون، 2020).

ان محتوى ولون بذور الحنطة يتأثر بعدة عوامل حيوية وعوامل لاحيوية في فترة الخزن مثل درجة الحرارة

و الرطوبة العالية ، هذه العوامل لها تأثير كبير في سرعة انتشار الفطريات مما يؤثر سلباً في جودة البذور ويؤدي إلى انخفاضها في معدل الإنبات (Fleurat-Lessard،2017) .

تشير الدراسات الى أن تخزين الحبوب لفترات طويلة في ظروف غير مناسبة يؤدي إلى زيادة نمو وتكاثر الفطريات وإنتاجها للسموم الفطرية (Chauhan وآخرون، 2016)، بالتالي تصبح غير صالحة للغذاء البشري أو كعلف للحيوانات (Chattha وآخرون 2016) .

زاد عدد حالات التسمم الفطري لدى البشر في العقود القليلة الماضية بسبب استهلاك الأغذية الملوثة بواحد أو أكثر من السموم الفطرية، مما أثر في النهاية أيضاً على استدامة الأعمال التجارية الزراعية (Kamle وآخرون، 2022) .

تشكل السمية الحادة والآثار المسببة للسرطان للسموم الفطرية وتلويثها للحبوب والمنتجات المعتمدة على الحبوب مصدر قلق خطير لسلامة الأغذية والأمن الغذائي للبشر، إلى جانب خسائر اقتصادية فادحة (Campagnollo وآخرون، 2016) .

تعد عمليات سوء الحصاد ، وظروف التجفيف ، والتعبئة ، والخزن والنقل ظروف أخرى مسببة لنقل ونمو الفطريات وزيادة احتمالية إنتاج السموم الفطرية (Matny ، 2020) . كما تعد الحنطة من المواد الغذائية الرئيسية لنمو الفطريات (Ali وآخرون، 2019 ؛ Chauhan وآخرون، 2016) .

تهاجم الفطريات حبوب الحنطة في الحقل وتستطيع البقاء على قيد الحياة لعدة سنوات (Ulziiggargal وآخرون، 2019) .

قسم Christensen (1965) الفطريات التي تصيب الحبوب الزراعية إلى ثلاثة مجاميع المجموعة الأولى تعرف بفطريات الحقل Field Fungi التي تصيب المحاصيل الزراعية قبل الحصاد وتضم أنواعاً من الأجناس *Helminthosporium*، *Fusarium*، *Alternaria* و *Cladosporium* ، أما المجموعة الثانية فتضم الفطريات التي تهاجم المحاصيل الزراعية أثناء خزنها ، وتعرف بفطريات الخزن Storage Fungi ، تشمل أنواعاً من الجنس *Aspergillus* و *Penicillium* ، تمتاز هذه الفطريات بأن أغلبها منتجة للسموم Mtcotoxins والتي تسبب إصابة الإنسان والحيوان بالأمراض عند استهلاك المحاصيل الملوثة بها ، أما بالنسبة للمجموعة الثالثة فتضم فطريات التعفن Rot fungi والتي تنمو على بقايا المواد النباتية مثل *Fusarium* و *Monilia* ، *Rhizopus* ، *Cladosporium* .

يعتمد مقدار التلف والضرر لهذه الأجناس الفطرية على طبيعة المحصول وظروف الخزن والاحتياجات البيئية الضرورية لهذه الفطريات (Almeida وآخرون، 2000) .

أوضحت دراسة Kosiak وآخرون (2004) ضخامة التلوث ما بعد حصاد الحبوب لمحصول الحنطة بفطريات جنس *Fusarium* و *Alternaria* . أوضح Riba وآخرون (2010) أن عدم التهوية و ارتفاع درجة الحرارة يشجع على نمو فطريات التخزين مثل *Aspergillus* و *Penicillium*

## 2-2- السموم الفطرية Mycotoxins

السموم الفطرية هي منتجات ابيضية ثانوية تنتج من بعض الفطريات الخيطية المنتجة للسموم بشرط توفر الظروف المناسبة من درجات الحرارة والرطوبة ، وجاءت تسمية السموم الفطرية Mycotoxin من اللغة اليونانية مشتقة من mykes تعني الفطر و toxicom تعني السم ، ولقد استعملت كلمة Mycotoxin لأول مرة في عام 1962 بعد كارثة الديك الرومي التي حدثت في بريطانيا(نخيلان، 2011) .

يمكن أن تسبب السموم الفطرية المرض واحيانا موت للإنسان والحيوان ، حيث تم اكتشاف حوالي اكثر من 400 نوعاً من السموم الفطرية في مناطق مختلفة في جميع أنحاء العالم (2020, Matny).

يحدث التسمم اما عن طريق الابتلاع او الاستنشاق أو عن طريق ملامسة الجلد ، بما أن الانسان يتناول الغذاء يوميا ، فقد تكون هذه الأغذية ملوثة بالسموم مثل تناول اللحوم أو الحليب أو البيض لحيوانات سبق وإن تغذت على أعلاف ملوثة بالسموم (Sun وآخرون 2017؛ Majeed وآخرون 2018). حيث وجد إن وجود السموم الفطرية في الأغذية سوف تكون له تأثيرات بعيدة المدى في صحة الانسان ، مثل تأثيراتها المسرطنة والعوز المناعي (2020, Matny).

تم إلى يومنا هذا اكتشاف مئات من أنواع السموم الفطرية لعل أهمها الأفلاتوكسينات Aflatoxins ، الترايكوثسين Trichothecen، الأوكرا توكسين Ochratoxins الزيرالينون Zearalenone، وجميعها سامة وتؤثر في الفعاليات الحيوية لجسم الكائن الحي بشتى الصور وقد تؤدي إلى الموت إذا تم تناولها بمستويات عالية تفوق الحدود التي اتفق دولياً على السماح بوجودها في المواد الأولية التي تستخدم في غذاء الإنسان أو التي تدخل في صناعة الأعلاف الخاصة بالحيوانات الزراعية (Creppy, 2002).

أخذ 12 سماً من السموم الفطرية لغرض الدراسة والاهتمام الواسع نظراً لما لها من تأثيرات خطيرة على صحة الإنسان ولسعة انتشارها في الأغذية (WHO، 2018) .

تعود الأنواع الفطرية المنتجة للسموم إلى ستة أجناس مهمة من الفطريات وهي الأكثر انتشاراً حيث تمتاز بالقدرة على إنتاج السموم الفطرية بتركيز عالية والعيش في بيئات مختلفة وبمتطلبات نمو بسيطة مثل درجة الحرارة والرطوبة ومن هذه الأجناس هي *Fusarium*، *Penicillium*، *Aspergillus* spp. في حين أن هناك أجناساً أخرى يمكن أن تنتج السموم بنسب متفاوتة مثل *Alternaria*، *Rhizopus*، *Trichoderma*، *Mucor*، *Trichothecium* و *Rhizoctonia* وغيرها (نخيلان، 2011) .

تعد الأجناس الثلاثة من الفطريات *Fusarium*، *Penicillium*، *Aspergillus* هي الأكثر وجوداً وإنتاجاً للسموم الفطرية في مخازن الحبوب إذ يهاجم *Fusarium* و *Aspergillus* الحبوب في الحقل وتستمر مع الحبوب أثناء الخزن (منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة، 2013) .

وجد الأسدي (2023) بدراسة أجراها في العراق سيادة النوع الفطري *Aspergillus spp.* وبنسبة 98% في جميع حبوب الذرة والحنطة والشعير. كما وجد الفيصل (2005) ان 0.11 ملغم من الافلاتوكسين يتواجد لكل كيلو من الحنطة المستخدمة في صنع البرغل والجريش . في دراسة قام بها Kumar و آخرون (2012) وجد أن الأجناس *Rhizopus* , *Aspergillus* , *Fusarium* , *Chaetomium* , و *Alternaria* من اهم الأجناس الفطرية التي لها القدرة على النمو على الحبوب وافراز السموم الفطرية . في حين بينت دراسة الحميري (2020) ان الأنواع التي أصابت حبوب الحنطة بشكل متكرر هي *Aspergillus* ، *Fusarium* ، *Alternaria* ، *Penicillium* و *Rhizopus* وان *A.flavus* و *A.niger* هي اكثر الانواع العائدة للجنس *Aspergillus* في اصابة الحبوب فقد شكلا 43% من الحبوب المصابة ، كما كشفت النتائج أن الفطر *Fusarium* جاء في المرتبة الثانية من حيث الاصابة فكانت نسبة الإصابة به 26% . اما في دراسة نعمة (2011) على بعض الحبوب وجد أن بذور عباد الشمس وفتق الحقل والذرة الصفراء والحنطة كانت جميعها مصابة بالفطر *Fusarium* .

## 2-2-1- مخاطر تواجد السموم الفطرية في الحبوب

يعد تلوث الحبوب بالسموم الفطرية من المشاكل التي تهدد العديد من الدول النامية التي تفتقر لظروف الخزن الصحية مما يوحى بمصدر قلق دائم لتلك الدول الأمر الذي جعلها تبحث عن مصادر غذائية صحية لتحقيق أمنها الغذائي (Makum وآخرون، 2010) ، كما أن تلوث المحاصيل بالسموم الفطرية يؤدي الى انخفاض كفاءة الإنتاج ويزيد من التعرض لكثير من الأمراض المعدية المرتبطة بالمناعة (Bhatnagar وآخرون، 2002 ، 2003) .

تصيب السموم الفطرية الأغذية المعدة للاستهلاك البشري بمستويات مختلفة ومتفاوتة في جميع أنحاء العالم (Shapira و Paster ، 2004). وفقاً لبيانات برنامج الأغذية العالمي الحالية، فإن ما يقرب من 25% من إنتاج الحبوب ملوث بالسموم الفطرية كل عام، في حين يعاني 815 مليون شخص أو أكثر من الجوع والفقر في جميع أنحاء العالم (Pal، 2017).

اكتشفت العديد من السموم الفطرية من قبل الباحثين وان اكثرها انتشاراً وضرراً وربما خطورة على صحة الكائنات الحية هي الأفلاتوكسين، الباتولين، الأوكراتوكسين، الفيومنزين، الزيرالينون والنيفينول، وتنتشر هذه السموم

عبر السلسلة الغذائية وتنشأ بسبب تلوث المحاصيل بالفطريات المكونة لها قبل الحصاد اوفي اثناء الإنبات او بعد جني المحاصيل وهي تنتقل خلال السلسلة الغذائية (World Health Organization، 2018).

تقدر الخسائر الاقتصادية السنوية الناتجة عن انخفاض الإنتاجية الناجمة عن السموم الفطرية بأكثر من مليار و500 مليون دولار أمريكي (Matny و Jackson ، 2017).

ان تناول الانسان والحيوان الاطعمة الملوثة بالسموم الفطرية يؤدي الى حدوث مشاكل صحية كثيرة مثل تأثيرها على الجهاز المناعي والفشل الكلوي وسرطانات الكبد وقد تمتد الى اضرار في الجهاز العصبي المركزي والاعوية الدموية والجهاز التنفسي والقناة الهضمية وقد يؤدي الى الموت ( Makun و اخرون 2010) . كما ينتج عن تناول الأطعمة الملوثة بالسموم الفطرية اضطرابات حادة أو مزمنة للإنسان والحيوان ، اذ وجدت سموم الافلا في كبد الأطفال المصابين بمرض سوء التغذية ونقص البروتين لدى الأطفال الأفارقة وسمي هذا المرض بـ Kwashiorkor ، وعلى نحو مماثل، تم تسجيل ما يقارب 20 ألف حالة وفاة سنويا بسرطان الكبد في إندونيسيا بسبب تناول الأطعمة الملوثة بالافلا ، اما في الاتحاد الأوروبي تحدث 3.2 مليون حالة تسمم في كل عام ، ومن المتوقع أن تبلغ الخسائر في الولايات المتحدة وكندا حوالي 5 مليارات دولار (Matny، 2020).

تقوم الفطريات بتغيير كل من الخواص الكيميائية والفيزيائية للمواد المتعفنة حيث تغيير الطعم (ترنخ ومرارة) والمظهر (الوان العفن السوداء وغيرها) وتغير التركيب و القيمة الغذائية مثل نقص فيتامين A، وتحلل الدهون واكسدها. ( Garnier و اخرون 2017) .

يسبب التأثير التآزري للسموم المعقدة تأثيراً أقوى مما لو كانت تعمل بمفردها، اذ تم استكشاف العديد من أمثلة التآزر ، مثل فيومونيسين مع الافلاتوكسين B1 والافلاتوكسين B1 مع الأفلاتوكسين B2، و(DON) Deoxynivalenol مع الفومونيسين ( Harvey و اخرون 1995). كما أنها تثير مخاوف جدية عندما يتعلق الأمر بالنظام الغذائي البشري، يتضح من التركيزات العالية الموجودة في وجبات الطعام والدم وعينات البول للأفراد الذين يعيشون في الدول النامية ، مما يشير إلى أن هذه السموم هي سبب رئيس للوفيات في أفريقيا وجنوب شرق آسيا. (Pitt ، 2000).

## 2-2-2- مستويات تواجد السموم الفطرية في الأغذية البشرية

قامت الدول بالتعاون مع منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة من أجل حماية الإنسان من التعرض لمخاطر السموم الفطرية بوضع التشريعات لتحديد مستويات السموم الفطرية المسموح تواجدتها في أغذية الإنسان أو الأعلاف المقدمة للماشية ، تجدر الإشارة هنا إلى أن بعض دول العالم التي لا تسمح فيها قوانين مراقبة جودة الأغذية بوجود أي مستوى، مهما كان منخفضاً"، لأي نوع من السموم الفطرية في أغذية الإنسان أو أعلاف الحيوانات (اسماعيل، 2007).

تم وضع وتحديد النسب المسموح بها للأفلاتوكسينات في غذاء الإنسان والحيوان من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (Food and Administration (FDA). ففي غذاء الإنسان يسمح بحد أقصى 20 ميكروغرام كغم<sup>-1</sup> ، تم السماح بحد أقصى 300 ميكروغرام كغم<sup>-1</sup> لتغذية الأبقار (Felicia، 2004). لا يُسمح ببيع المواد الغذائية التي تحتوي على نسبة تلوث بالأفلاتوكسين تزيد عن 20 جزءاً في البليون عبر الدول (Van Egmond و Jonker، 2005). وفقاً للائحة المفوضية الأوروبية، يجب ألا يزيد الحد الأقصى المسموح به لإجمالي سموم الافلا في جميع الحبوب ومنتجاتها المشتقة المخصصة للاستهلاك المباشر عن 4 ميكروجرام/كجم (European Commission، 2010). مع ذلك فإن 20 ميكروغرام كغم<sup>-1</sup> هو الحد الأقصى المقبول للأفلاتوكسين في الولايات المتحدة في حين كان الحد الأقصى لسم الباتولين في عصير التفاح هو 50 ميكروغرام كغم<sup>-1</sup> (WHO، 2018). أما المستوى المسموح به لسم (DON) Deoxynivalenol في حبوب الحنطة وفي بقية الحبوب الأخرى فقد بلغ (0,3 - 2) ملغرام كيلوغرام<sup>-1</sup> (Maresca وآخرون، 2002).

## 2-3- الأفلاتوكسين Aflatoxins

هي مواد غير بروتينية، عند فصلها على ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) وتعرضها للأشعة فوق البنفسجية، تنتج ألواناً مضيئة. فمنها ما يعطي تالفاً أزرقاً ويظهر عند فصل كل من الأفلاتوكسينات B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> ، وهناك مادتان أخريان يُشار إليهما باللون الأخضر وتنتجان باللون الأخضر أطلق عليهما بالأفلاتوكسين G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> ويتم تمثيل معدل تدفق عامل النقل (Rf) (Rate of flow) المشار إليه بالبقع الموجودة على ألواح TLC بالرقمين 1 و 2 (Cocker وآخرون، 1984).

تم اكتشاف فئة أخرى من الأفلاتوكسينات لاحقاً، إذ تم عزلها من الحليب تسمى سموم الحليب Milk toxins التي عزلت من حليب ابقار تناولت اعلاف ملوثة بالفطريات المنتجة لسموم الافلا أطلق عليهما بالأفلاتوكسين M1 و M2، وهي مستقلبات الأفلاتوكسين B1 و B2 (Forbish وآخرون، 1986) وتمتاز هذه السموم بذوبانها في الكلوروفورم والميثانول والداي مثيل سلفوكسيد (Meerdink، 2004).

يعد الافلاتوكسين B<sub>1</sub> أخطرها و أكثرها سميةً ( Chang واخرون 1963؛ Gold blatt, 1969 ) ،  
بينما الافلاتوكسين من نوع M<sub>1</sub> هو أقل سمية بعشرة أضعاف من B<sub>1</sub> (Sundhakar واخرون، 2009) .  
اكتشفت الأفلاتوكسينات في ستينيات القرن الماضي، و سميت بهذا الاسم بعد اكتشاف ان مصدر الإصابة  
لمرض turkey X في طيور الديك الرومي كانت بسبب السموم المنتجة من قبل فطر  
A. flavus ( Patel واخرون، 2015) .

يعد العالم Hartley واخرون (1963) اول من عزل واستخلص اربعة انواع من سموم الافلا التي انتجت  
من قبل A. parasiticus و A. flavus بشكل بقع متألقة اطلق عليها B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> ، بينما قام العالم Asaoa  
واخرون(1963) بتحديد الصيغة الجزيئية لمركبات سموم الافلا .

يعتقد ان النوعين A. flavus و A. parasiticus هما الوحيدان المنتجان لهذا السم حتى عام 1987 عندما  
بين العالم Kurtzman ان الجنس A. nomius والذي يمتلك خصائص مشابهة لـ A. flavus هو ايضا منتج  
لسموم الافلا ( Yu واخرون 2004) . كذلك وجد Kumar واخرون (2012) ان اكثر سموم الافلا سمية تنتجها  
أنواع عديدة من الرشاشيات مثل A. flavus و A. niger والتي تنتشر على نطاق واسع في التربة ومخلفات النباتات  
والحبوب وغيرها .

تتميز الافلاتوكسين بأنها عديمة الرائحة، صلبة، بيضاء شفافة مع ميل نحو اللون الأزرق او الاخضر عندما  
تتعرض الى الأشعة فوق البنفسجية ، تذوب في الماء بمعدل 10-20 مجم لتر<sup>-1</sup>، أيضا" تذوب في المذيبات العضوية  
مثل الميثانول والكلوروفورم والأسيتون والمذيبات العضوية القطبية  
الأخرى (Reddy و Waliyar، 2000) . كما تتميز السموم الفطرية بأنها مركبات كيميائية عديمة الطعم وغير  
مرئية ( Jallow ، 2015) . وذات أوزان جزيئية واطنة نسبياً حيث يتباين الوزن الجزيئي  
لها 97-710 دالتون وهنا تكمن خطورتها مناعيا وذلك من خلال عدم قدرة الجهاز المناعي للإنسان  
و الحيوان على إنتاج الأجسام المضادة لها (اسماعيل، 2014) .

تمتاز الأفلاتوكسينات من النوع B<sub>1</sub> بدرجة انصهار مرتفعة تصل إلى حوالي 268-269°م درجة مئوية،  
مما يدل على ثباتها النسبي في درجات الحرارة العالية. كما أنها تكون مستقرة في الأوساط المتعادلة إلى الضعيفة  
الحموضة أو القلوية (pH بين 3 و10). لكنها تفقد استقرارها عند قيم pH أقل من 3 (وسط شديد الحموضة) أو أعلى  
من 10 (وسط شديد القلوية) اذ تبدأ البنية الكيميائية للأفلاتوكسينات في التفكك، ما يؤدي إلى فقدان نشاطها السام )  
Megan و Olsen، 2004) .

تتفكك الافلاتوكسين عند معاملتها ببعض المواد القاعدية مثل الأمونيا ، اذ تؤدي الى تحلل حلقة اللاكتون مما  
يتسبب في تفكك السموم، هذا التحلل قابل للعكس، مما يعني أن الأفلاتوكسينات يمكن أن تشكل حلقة اللاكتون عند  
تعرضها لبيئات حمضية، مثل حمض الهيدروكلوريك (Vankayalpati، 2018) .

تتأثر بشكل عام معدلات إنتاج الأفلاتوكسين بعوامل عدة ، بما في ذلك نوع الفطر، نوع العزلة، نوع الوسط المغذي وتركيبه الكيميائي، المنافسة من الكائنات الحية الأخرى، درجة الحرارة والرطوبة ، مستويات الأوكسجين وثاني أكسيد الكربون، وعوامل أخرى ( Davis وآخرون، 1966؛ Bullerman، 1981) .

## 4-2- الفطر *Aspergillus* spp.

يعد فطر الـ *Aspergillus* من الفطريات واسعة الانتشار في الطبيعة حيث يوجد في التربة والهواء والمحاصيل الغذائية ( Hocking و Pitt، 2009)، يوجد أيضا على المواد العضوية المتفسخة وفضلات الحيوانات (العاني، 1998). ولقد تم وصف جنس *Aspergillus* لأول مرة من قبل عالم الفطريات Micheli في عام 1729.

يبلغ عدد أنواع الفطر *Aspergillus* ما يقارب 250 نوع ويكون اوسع انتشارا في المناطق الحارة منها في الباردة ( Arukwe وآخرون 2008). وتتكاثر معظم أنواعه لاجنسيا فقط إلا أن هناك بعض منها تتكاثر جنسيا" حيث تسلك سلوك الفطريات الكيسية وذلك من خلال تكوين سبورات كيسييه Ascospores مرتبة داخل أكياس (Asci) وتكون هذه الأكياس مغمورة داخل جسم ثمري كروي الشكل Cleistothecium (Weber و Weber، 2007) .

يعد الفطر *Aspergillus* من اهم الاجناس الفطرية المعروفة بتأثيرها في العديد من المحاصيل الزراعية وذلك لقدرته على أنتاج مواد أيضا ثانوية ذات تأثيرات سامة ومسرطنة للإنسان والحيوان تدعى السموم الفطرية Mycotoxins ، كما تشير معظم الدراسات إلى إن لهذا الجنس القدرة على إنتاج أكثر من نوع من هذه السموم اثناء نموها ( Abdel Hafez ، 1981) .

تحتل الأنواع التابعة الى الجنس *Aspergillus* مركز الصدارة في إصابة وتلوث الحبوب وخاصة الفطرين *A.flavus* و *A.niger* ، إذ أنهما يؤثران في حيوية الحبوب وذلك عبر تقليل نسب إنباتها وتلويثها بالأفلاتوكسين (النزال، 1996) .

## A. flavus النوع 1-4-2

الموقع التصنيفي Position in classification :

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota )

Phylum : Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *flavus*

أول من وصف الفطر *A. flavus* العالمان Raper و Fennell (1965) ، ثم قام كل من العالمين Pitt و Klich (1985) بوصف دقيق للمتيولات لتمييزه عن الفطر *A. parasiticus* وهو فطر ذو انتشار عالمي يشتهر باستعماره للحبوب ويسبب لها التعفن اثناء الحصاد وما بعد الحصاد واثناء النقل والتخزين ، كلمة *flavus* مشتقة من اللغة اللاتينية وتعني yellow اي الاصفر اشارة الى لون الكونيديا التي يكونها ( Agrios،2005) .

يعد الفطر *A. flavus* أحد الأنواع الرئيسية المنتجة لسموم الافلاتوكسين ، وهو من اكثر الملوثات للأعلاف والغذاء ( Savic و اخرون 2020) . ويوجد في بيئات مختلفة في مناطق العالم وخصوصا في المناطق الاستوائية والمدارية ذات المناخات الدافئة والرطوبة ( Miller و اخرون 2014) . كما يوجد في المناطق المعتدلة اذ تم عزله من التربة (Bhatnagar و اخرون 2014) وايضا تم عزله من الهواء (Mehl و cotty، 2010) .

ينمو الفطر *A.flavus* بمدى حراري واسع يتراوح بين 26-32 م ، في حين أن أقصى درجات حرارة تسمح بنموه هي 48 م<sup>0</sup> ( Marin و اخرون 1998) . إن الدرجات الحرارة المثلى لإنتاج سم AFB1 تكون عند 27م<sup>0</sup> (Gizachew و اخرون 2019) .

يصعب التمييز بين الصفات المظهرية للضروب التابعة لنوع *A.flavus* ، يعود ذلك إلى التداخل في الخصائص المظهرية والكيموحيوية ، بشكل عام فإن جميعها تمتلك مستعمرات خضراء اللون مع تضليل اصفر اما ظهر المستعمرة فيكون لونها ذهبي إلى بني محمر ، عند تقدم المستعمرة بالعمر فأنها تتحول إلى اللون البني ( Koh و Tseng ، 1975) .

يتحول الفطر عندما يتعرض إلى ظروف بيئية غير مناسبة إلى ما يعرف بالجسم الحجري Sclerotium ، وحسب معدل نمو وشكل الجسم الحجري فقد قسم *A.flavus* إلى سلالتين هما S و L ، حيث السلالة S تنتج عدداً "كبيراً" من الأجسام الحجرية صغيرة الحجم إذ يبلغ قطرها أقل من 400 مايكرو متر وتنتج حوالي 98% من الأفلاتوكسين ، إما السلالة L تنتج عدداً "قليلاً" من الأجسام الحجرية كبيرة الحجم (Nelson وآخرون 1998).

## 2-4-2- النوع *A. niger*

الموقع التصنيفي : Position in classifica

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota )

Phylum : Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *niger*

وصف الفطر *A. niger* لأول مرة Tiehem في عام 1767 ، يعد أحد أنواع الرشاشيات الأكثر انتشاراً ويسبب التعفن للفواكه والخضراوات ويدعى بالعفن الأسود ويتنشر بشكل واسع في مناطق التربة والهواء (Samson وآخرون، 2001) .

يمتلك الفطر *A.niger* القدرة على النمو في المحاليل المركزة من السكريات والأملاح التي لا تستطيع أغلب الفطريات الأخرى من النمو عليها وكذلك قدرة أنواع الفطر على إفراز إنزيمات مختلفة ومضادات حيوية تنافس الأحياء المجهرية في منطقة النمو (العروسي، 2001)

ينتج الفطر *A.niger* العديد من السموم التي تؤثر في صحة الإنسان والحيوان مثل سموم الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين وجليوتوكسين وحامض السايكلوبيزونك (عبد الحميد، 2000) . ينتج أيضاً مادة المالفورين (Ciegler وآخرون، 1981).

يسبب الفطر *A.niger* التعفن في كثير من المنتجات الغذائية مما يسبب خسائر اقتصادية كبيرة في الحقل والمخزن (Curtis وآخرون 2009). وينمو على الحبوب والفواكه مسبباً "فساد الطماسة والعنب والمانكو" (Parkash و Raaof، 1989).

### 2-4-3- النوع *A. terreus*

الموقع التصنيفي : Position in classification

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota)

Phylum : Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *terreus*

وصف الفطر *A. terreus* لأول مرة في عام 1965 من قبل العالمين Raper و Fennell (1965) يعد *A. terreus* من أهم الأنواع التي لها توزيع عالمي ، يوجد في مجموعة واسعة من الأماكن ، مثل التربة وأكوام السماد والغبار والمواد الغذائية ( Kozakiewicz ، 1989)، يمكن العثور عليه أيضاً" في الهواء وله آثار على أمراض الإنسان والتطبيقات الصناعية وإنتاج المحاصيل ( Moore وآخرون 1988) يصيب *A. terreus* المحاصيل النباتية المهمة وخاصة المنتجات النباتية مثل الذرة المخزنة والرز والبقول السوداني والشعير ( Lass-Flörl وآخرون 2000) ، ينتج الفطر *A. terreus* عدداً كبيراً من المستقلبات الثانوية والسموم الفطرية (Arakawa وآخرون، 2008) . وجد ان الفطر ينتج مجموعة متنوعة من السموم الفطرية، مثل سيتريوفيريدين، وباتولين، وسيتيرينين، وتيريتونين، وجليوتوكسين(Samson، 2011) . أظهرت عزلات *A. terreus* من حيث الحساسية المضادة للفطريات، مقاومة لبعض الأدوية المضادة للفطريات، بما في ذلك الأمفوتيري سين B . في حين أظهر المضاد الفطري لوليكونازول نشاطاً ممتازاً في المختبر ضد *A.terreus* (Segal و Elad، 2018) .

## 2-4-4- النوع *A. tubingensis*

الموقع التصنيفي : Position in classification

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota)

Phylum : Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus*

Species: *tubingensis*

يعد الفطر *A. tubingensis* احد انواع الفطريات التابعة الى جنس الرشاشيات ، تم اكتشاف النوع لأول مرة من قبل العالم Raoul Mosseray في عام 1934 (1934, Mosseray). غالبا ما يشارك في تلف الأغذية من الفواكه والحنطة والتخمير الصناعي (Oisewacz، 2002). يُعد هذا النوع عاملاً نادراً للعدوى الانتهازية (Perrone واخرون 2007).

هنالك تشابه بين الفطرين *A. niger* و *A. tubingensis* في الشكل والمعيشة اذ يصعب التمييز بينهما، ومن الاختبارات السريعة المستخدمة في التمييز بين الصنفين، هو تفاعل إيرليك Ehrlich reaction ، الذي يستفسر عن وجود الإندول. في هذا الاختبار يكون *A. tubingensis* إيجابياً" على عكس *A. niger* الذي يعطي نتيجة سلبية (Bennett، 2010).

يتميز الفطر *A. tubingensis* بإنتاج مادة asperazine الذي يميزه عن باقي أنواع الرشاشيات الأخرى المماثلة من الناحية الشكلية (Samson، 2007). ينتج الفطر *A. tubingensis* أيضا" مادة محللة للبكتين وانزيمات xylanolytic ، arabinoxylanolytic وpectinolytic (Graaff) واخرون 1994:Gielkens واخرون 1997) ، كما ينتج قلويدات تحتوي على ثنائي هيدروكاربازول (Dihydrocarbazole) Perrone) واخرون 2006).

يظهر الفطر مقاومة عالية للأشعة فوق البنفسجية ويمكن أن ينمو في درجات حرارة مرتفعة يتراوح بين 30-37 درجة مئوية ويتحمل درجة الحموضة المنخفضة ويفضل البيئات ذات النشاط المائي المنخفض نسبياً. World (Health Organization، 2008).

يوجد الفطر *A. tubingensis* في جميع أنحاء العالم في المناطق ذات المناخ الدافئ ، يتم عزل هذا النوع عادة من بقايا التربة والنباتات وكذلك المحاصيل الزراعية مثل العنب والكاكاو والقهوة والحبوب (Samson وآخرون، 2007) . يسبب الفطر أيضا تعفن على التفاح والعنب والحبوب (Anderson و Thrane، 2006) ، يكون هذا النوع قادرًا على إنتاج السموم الفطرية (Botana و Sainz، 2015) .

## 2-4-5- النوع *A. caespitosus*

الموقع التصنيفي : Position in classification :

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota)

Phylum : Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order : Eurotiales

Family : Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus*

Species : *caespitosus*

يعد الفطر *A. caespitosus* نوع من أنواع الفطريات التي تتبع جنس الرشاشيات ، أول من وصفه علميًا في عام 1944 من قبل العالمين Kenneth B. Raper و Charles Thom اللذين عزلاه من التربة ( Raper و Thom، 1944) . يعد من الفطريات المجهرية المهمة المسببة في تلوث الهواء و تلف الأغذية، وإنتاج السموم الفطرية والأمراض البشرية (Hubka و Nováková، 2016) . ويسبب مرض الرشاشيات aspergillosis (Vivek-Ananth، 2017) .

يعد الفطر *A. caespitosus* من الأنواع المهمة لما له أهمية خاصة بسبب موقعه الانتقالي الواضح بين مجموعة *A. nidulans* و *A. ustus* في طبيعة حوامل الأبواغ، وتصبغه الأرجواني المحمر، وفي اللون العام وعلامات أبواغه، فإنه يحتفظ بخصائص *A. nidulans* والأنواع ذات الصلة الوثيقة. وفي شكل الأوكياس الحاضنة الخصبية Cleistothecia والأبواغ الكيسية Ascospores، والشكل شبه الكروي السائد لرؤوس أبواغه Conidial head، وفي الشكل المتغير وغير المنتظم لخلايا hülle cells ، ويعتقد أنه الأقرب إلى مجموعة *A. nidulans* (Charles thom، 1945) .

يستخدم الفطر *A. caespitosus* في دراسة مجموعة واسعة من الموضوعات بما في ذلك إعادة التركيب recombination وإصلاح الحمض النووي DNA repair والطفرة mutation والتحكم في دورة الخلية والأنابيب، tubulin والكروماتين chromatin والتسبب في المرض والتمثيل الغذائي metabolism والتطور التجريبي experimental evolution ، وهو أحد الأنواع القليلة في جنسه القادرة على تكوين جراثيم جنسية من خلال الانقسام الاختزالي meiosis ، مما يسمح بتهجين السلالات في المختبر. هو فطر متمائل homothallic ، مما يعني أنه قادر على التلقيح الذاتي وتكوين أجسام ثمرية Fruiting bodies في غياب شريك التزاوج (Schoustra وآخرون، 2005).

## 2-5- الجنس *P. camemberti*

الموقع التصنيفي : Position in classification

Kingdom:Fungi

Phylum:Ascomycota

Class:Eurotiomycetes

Order:Eurotiales

Family:Eurotiaceae

Genus : *Penicillium*

Species : *camemberti*

يعد الفطر *Penicillium* من الفطريات الواسعة الانتشار في الطبيعة اذ يوجد في التربة والهواء ، يصيب النبات ويعمل على تلوث مختلف المنتجات الاغذية ، كما له تأثير كبير على الانسان من الناحية الصحية والاقتصادية ( Houbraken وآخرون، 2014) .

جاءت تسمية البنسيليوم من اللفظ اللاتيني " penicillus " التي تشير الى المظهر الخارجي الشبيه بالفرشاة ، اذ تترتب التراكيب الكونيدية conidiophores بشكل يشبه فرشاة الرسام ( Yin وآخرون، 2017) .

وصف النوع *P. camemberti* لأول مرة من قبل العالم تشارلز توم في عام 1906، واستخدم في صناعة الجبن، (Dox, 1910) . يتراوح نطاق درجة حرارة نموه الأمثل بين 20 و25 درجة مئوية ، له القدرة على تحمل الملح وهذا إلى جانب قدرته على النمو عند نشاط مائي Activity of water (aw) 0.93 (Abbas و Dobson، 2011) .

يتميز الفطر *P. camemberti* بإنتاج مواد أبيضية ثانوية سامة وتعتمد كمية السم المنتجة على السلالة وعلى درجة الحرارة التي تنمو بها المستعمرة . كما ينتج الفطر Cyclopiazonic acid في ظل ظروف معينة (Bars، 1979) . تم نشر التسلسل الكامل للجينوم لـ *P. camemberti* في عام 2014 (Cheeseman وآخرون، 2014) .

يستعمل بعض الباحثين مصطلح العفن الأزرق blue mold في وصف الانواع التابعة لفطر البنسليوم التي تصيب مجاميع مختلفة من محاصيل الفاكهة ، وذلك لأن النمو الفطري يظهر على سطح هذه النباتات باللون الأزرق ( Jurick وآخرون، 2009) .

## 2-6- الجنس *A.alternata*

الموقع التصنيفي : Position in classification

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Dothideomycetes

Order: Pleosporales

Family: Pleosporaceae

Genus: *Alternaria*

Species: *alternate*

أول تسمية للفطر *Alternaria alternata* اطلقت من قبل العالم Fries (1821- 1832) ، يعد الجنس *Alternaria* من الفطريات واسعة الانتشار في العالم إذ يتواجد في مختلف البيئات كالماء والهواء والترربة وفي كل أنحاء العالم وحين تسنح الفرصة له يتحول إلى ممرضات تصيب العديد من المحاصيل الحقلية مسببة خسائر اقتصادية كبيرة ( Thomma ، 2003) ، كما يسبب تلف العديد من الخضروات والفواكه الطازجة مثل الفلفل ،القرنبيط ، الموز ،التفاح ، الفول ، الخيار ، البطيخ ( Webb و 1978، Snowdon ؛ 1991) ، اضافة الى الحبوب وخاصة الحنطة (Clear وآخرون، 2005؛ Fakhrunnisa وآخرون، 2006) .

تُعزى قدرة هذه الفطريات على إصابة انواع واسعة من النباتات إلى إنتاجها العديد من السموم الفطرية المتخصصة لمضائف مختلفة (Stuart وآخرون، 2009) . كما يتميز الفطر *A.alternata* بإنتاجه لصبغة الميلانين السوداء في الغالب ، والميلانين هو الآخر ناتج ابيض ثنائي تفرزه هذه الفطريات (Tsuge و Kimura)

، (1993) ، يعتقد بان لها دورا " مهما" في امراضية الفطريات للمحاصيل النباتية وكذلك مقاومتها للظروف القاسية من جفاف وحرارة ( Jacobson ، 2000 ) .

يعتمد الفطر *Alternata* في إمرضيته على إنتاجه للإنزيمات الخارج خلويه enzyme Extracellular كالسيلوليز واللايبيز وغيرها فالنوع *A.alternata* له القدرة على إنتاج عدد من الأنزيمات التي تمكنه من اصابة العديد من العوائل النباتية (Aba alkhalil، 2005 ) .

## 7-2- الجنس *F. equiseti*

الموقع التصنيفي Position in classification:

Domin : Eukaryota

Kingdom : Fungi (Eumycota )

Phylum : Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order : Hypocreales

Family : Nectriaceae

Genus: *Fusarium*

Species: *equiseti*

أول تسجيل للطور الجنسي للفطر من قبل العالم Booth (1971) . يعد الفطر *Fusarium* أحد الأنواع الفطرية الشائعة في التربة عالميا" ، يوجد في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية (Goswami واخرون 2008) ، يسبب العديد من الأمراض النباتية على مجموعة متنوعة من المحاصيل وخصوصا" الحبوب، وقد سجل وجوده كمرض للعديد من الحبوب مثل الحنطة والشعير والذرة والرز ( Pitt و Hocking، 1997 ) .

يسبب الفطر *Fusarium equiseti* تعفن الجذور والذبول الوعائي في النباتات كما يسبب تلف الحبوب المخزونة، مما يؤدي إلى فقدان الجودة وزيادة الفقد الاقتصادي ( Hazzat واخرون ، 2023 ) .

وجد أن ما يقارب 50% من الحبوب الناتجة من النباتات المصابة تحمل الفطر *Fusarium* (Robledo, 1991) ، كما يسبب تلف العصائر بسبب قدرته على النمو في مستويات منخفضة من الأوكسجين (Hocking، 1990) .

يعد *F. equiseti* أحد أنواع *Fusarium* الرئيسية المسببة للذبول وتعفن جذور الحمص في المغرب (Hazzat وآخرون، 2023). كما يوجد الفطر في أنواع عديدة من المحاصيل وخاصة البطيخ، فول الصويا، الكمون، القرنبيط، نبات الطماطم، الفلفل واللهانة (Chen وآخرون، 2014).

## 8-2- الجنس *Talaromyces columbinus*

الموقع التصنيفي : Position in classification

Domain: Eukaryota

Kingdom: Fungi(Eumycota )

Division: Ascomycota

Class: Eurotiomycetes

Order: Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Talaromyces*

Species: *tiftonensis*

وصف الفطر لأول مرة من قبل عالم الفطريات الأمريكي Chester Ray Benjamin في عام (1955) بأنه شكل جنسي من الفطر *Penicillium* الذي ينتج جراثيم ذات جدران ناعمة مغطاة بخيوط متشابكة يرمز إلى الشكل النهائي Teleomorph لفطر *Penicillium* (Kirk وآخرون، 2008).

يوجد في مختلف البيئات اذ يوجد في الهواء والتربة والنباتات والبيئات الداخلية (Yilmaz وآخرون 2014). قد ينمو في الظروف القاسية مثل ارتفاع أو انخفاض درجات الحرارة، زيادة تركيزات الملح والحموضة المنخفضة أو مستويات الأوكسجين المنخفضة (Houbraken وآخرون، 2014).

يعد فطر *Talaromyces* من المُحلّلات التي تفسد الطعام وتتسبب في تدمير المحاصيل الغذائية قبل وبعد الحصاد. والعديد من هذه الأنواع التي تفسد الطعام هي أيضًا منتجة للسموم الفطرية (Pitt و Hockin, 2009). والأسوأ من ذلك، إن بعضها عوامل معدية وتسبب امراض للإنسان والحيوان، تمتاز الأبواغ الكيسية بأنها تكون مقاومة للحرارة ولهذا فأنها تسبب فساد العصائر المبسترة وغيرها من المنتجات المصنعة من الفواكه (Dijksterhuis ، 2007 ; Pitt و Hocking, 2009).

## 9-2- تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل ( PCR ) Polymerase Chain Reaction

هي إحدى أهم الابتكارات في علم الأحياء الجزيئي، حيث تسمح بتضخيم مقاطع محددة من الحمض النووي (DNA) بسرعة وفعالية، منذ تطويرها في ثمانينيات القرن العشرين، أصبحت حجر الزاوية في مجالات متنوعة مثل التشخيص الطبي، الطب الشرعي، والبحوث الجينية (Nobel Prize، 1993)

طوّر العالم كاري موليس ( Kary B. Mullis ) تقنية PCR عام 1983 أثناء عمله في شركة سيتوس كوربوريشن، وحصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993 تقديراً لهذا الإنجاز .

ساهمت هذه التقنية في تحويل المختبرات البيولوجية من خلال تمكين العلماء من دراسة كميات ضئيلة من الحمض النووي ( Saiki واخرون، 1985) .

تتكون تقنية PCR من مكونات أساسية وهي القالب (DNA) العينة المراد تضخيمها ، البادئات ( Primers ) وهي سلاسل قصيرة من النيوكليوتيدات ترتبط ببداية ونهاية المقطع المستهدف ، إنزيم البوليميراز ( Taq Polymerase ) وهو إنزيم مستخلص من بكتيريا *Thermus aquaticus* ، مقاوم للحرارة ، النيوكليوتيدات ( dNTPs ) لبناء شريط DNA جديد والمحلول المنظم ( Buffer ) يوفر الظروف الكيميائية المثلى للتفاعل ( Primrose وOld ، 1994) .

تمر تقنية PCR بعدة خطوات أساسية وهي خطوة التسخين ( Denaturation ) في هذه الخطوة يتم فصل شريطي DNA عند درجة حرارة عالية 95°م ، تليها خطوة التلدين ( Annealing ) اذ تنخفض درجة الحرارة الى 50-65°م لارتباط البادئات بالقالب ، ثم خطوة التمديد ( Extension ) وفيها يقوم أنزيم Taq Polymerase بأضافة النيوكليوتيدات عند 72°م ، تتكرر هذه الدورة 20-40 مرة، مما ينتج مليارات النسخ من المقطع المستهدف ( WHO , World Health Organization , 2020 ) .

استخدمت تقنية PCR في عدة تطبيقات منها مجال الطب اذ تم تشخيص الأمراض الوراثية والكشف عن الفيروسات مثل COVID-19 ، وفي مجال الطب الشرعي من خلال تحليل البصمة الوراثية وفي مجال البحوث العلمية من خلال استنساخ الجينات ودراسة التعبير الجيني ( Old و Primros ، 1994)

تنتج الأفلاتوكسينات عبر مسار كيميائي حيوي يتضمن أكثر من ٢٥ إنزيمًا مشفرًا بواسطة تجمع جيني gene cluster في جينوم الفطر يحتوي هذا العنقود على جينات هيكلية (تُنظم التفاعلات الكيميائية) وجينات تنظيمية (تُشغل أو توقف التعبير الجيني) ومن هذه الجينات الجين AFLD (Ehrlich و Cotty، 2004).

يعرف الجين AfID بأسم علمي nor-1 ، يشفر هذا الجين إنزيمًا من نوع أوكسيدوروكتاز (oxidoreductase)، مسؤول عن تحويل مركب نورسولورينيك أسيد (norsolorinic acid) إلى أفيرانتين (averantin)، وهي خطوة مبكرة في مسار تخليق الأفلاتوكسين ، إذ ان بدون نشاط AfID يتعطل تكوين الأفلاتوكسين، مما يجعله هدفًا محتملاً لتقنيات منع التلوث الفطر (Yu، 2004).

أظهرت الدراسات أن تعبير الجين AfID يرتبط ارتباطًا وثيقًا بقدرة سلالات *Aspergillus* على إنتاج الأفلاتوكسين. حيث يتم تفعيله بواسطة جينين تنظيميين هما afIR و afIS ، في السلالات غير المنتجة للأفلاتوكسين، لوحظ وجود طفرات أو حذف في جين AfID، مما يؤكد دوره المركزي في العملية (Gangurde وآخرون. 2024).

هنالك عدة تقنيات مستخدمة للكشف عن الجين AfID وهي تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) تُستخدم لتضخيم الجين AfID والتمييز بين السلالات المنتجة وغير المنتجة للأفلاتوكسين. تم تطبيق هذه الطريقة في عينات الأعلاف الحيوانية في سوريا وإيران، حيث أظهرت نتائج متطابقة مع تحاليل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، وتقنية التحليل النسخي (RT-PCR) يكشف عن نشاط التعبير الجيني لـ AfID، مما يساعد في تحديد السلالات السامة حتى قبل إنتاج الأفلاتوكسين (Arias وآخرون، 2015).

## 12-2- مكافحة الأحيائية Biological Control

المكافحة الأحيائية هي احدى الإجراءات الوقائية التي تعمل على اختزال شدة المرض عن طريق خفض كثافة لقاح المسبب المرضي عن طريق اضافة الكائنات الحية الدقيقة المضادة وتنشيطها في البيئة لمكافحة المسبب المرضي ( ابو عرقوب ، 2000 ; Abdel -Kader اخرون ، 2021) .  
تعد منتجات حاوية على خلايا من الميكروبات الحية المختلفة ، يمكن وصفها أيضا" بأنها مستحضرات مصنعة تجارية تحتوي على الكائنات الحية او خلايا نامية من الكائنات الحية الدقيقة ( Khanna واخرون 2019).

تعد مكافحة الأحيائية من الاتجاهات البحثية الحديثة التي حظيت باهتمام الباحثين في العقود الأخيرة وحلا" علميا" وأميناً" لمكافحة العديد من أمراض النبات والآفات التي تصيبها، مقارنة مع المبيدات الكيميائية المستعملة للغرض نفسه ( Manganiello ، 2018 )

تعد مكافحة الكيميائية من الوسائل الفعالة في مكافحة والسيطرة على امراض النبات الا ان لها تأثيرات جانبية للمبيدات الكيميائية مثل تأثيرها في الصحة العامة وتلويثها للبيئة وتأثيرها القاتل للأحياء غير المستهدفة وظهور صفة المقاومة في الآفات الممرضة الأمر الذي دفع الباحثين الى التقليل من استخدام المبيدات وايجاد وسائل بديلة ( Rania واخرون ، 2016 ) .

تعد الكائنات الدقيقة الموجودة في منطقة الجذور من الوسائل الأحيائية التي استعملت لمكافحة الامراض النباتية وذلك من طريق استغلال نشاطاتها ضد مسببات الأمراض المختلفة ، لذا فان زيادة كفاءة النبات في امتصاص العناصر المغذية يعتمد بدرجة كبيرة على تواجد احياء التربة المجهرية الحرة التكافلية المعيشة في هذه المنطقة (Ozdemir واخرون، 2020) .

تعيش كثير من الأحياء المجهرية في التربة منها البكتريا الجذرية المعززة لنمو النبات *Plant growth promoting rhizobacteria ( PGPR)* والتي تعد من العوامل الأكثر نجاحا في برامج مكافحة الأحيائية واحيانا تعد طريقة بديلة عن استعمال المبيدات الكيميائية (Vocciante وآخرون 2022 ; Massa وآخرون ، 2022). لهذه البكتريا انواع منها *Azospirillum spp.* و *Azotobacter spp.* وغيرها .

تمتاز هذه البكتريا على الاستيطان في جذور النباتات ومنطقة الجذور ، بالإضافة إلى أعداد قليلة منها لها القدرة على التغلغل في أنسجة الجذر. كما أنها تعمل على تعزيز نمو النباتات وحمايتها من الأمراض عبر آليات مختلفة، مثل قدرة هذه البكتيريا على التنافس مع الكائنات الاخرى على الوسائط الغنية

بالمواد الأولية (Silva Dias وآخرون ، 2021 ، ) وتحفيز مقاومة النبات ضد العديد من مسببات المرضية وإنتاج مضادات حيوية ( Egamberdieva وآخرون ، 2019 ؛ Ryu وآخرون ، 2004 )

## **Azotobacter sp. البكتريا الاحيائية 1-12-2**

الموقع التصنيفي Position in classification:

Domain: Eukaryota

Kingdom: Bacteria

Division: proteobacteria

Class: Gammaprotobacter

Order: Pseudomonadales

Family: Pseudomonodaceae

Genus: *Azotobacter*

Species: *chroococcum*

تعد بكتريا *Azotobacter* من الأجناس البكتيرية واسعة الانتشار، إذ تضم أنواعا" عدة تختلف فيما بينها في الصفات الكيميائية و الحيوية و من أهمها *A. nigricans*, *A. tropicalis* , *A. paspali* و *A. chroococcum* وغيرها ، وأكثر الأنواع انتشارا" هو نوع *chroococcu* الذي اكتشفه العالم الهولندي Beijerinck في عام 1901 ( Mali و Bodhanker، 2009؛ Garrity ، 2005 ) .

بكتريا *Azotobacter* سالبة لصبغة كرام، هوائية إجبارية ، حرة المعيشة ، متباينة التغذية ، تعمل على تحليل المواد العضوية كمصدر للكربون والطاقة وهذه تعد صفة مهمة ومميزة لها إذ لها قدرة على الاعتماد على مصادر كاربوهيدراتية عديدة ( Khosravi و Dolatabad ، 2020 ) .

تكون خلايا بكتريا *Azotobacter* كبيرة الحجم عصوية قصيرة او بيضوية او كروية ، قطرها 2  $\mu$ m وطولها 5 - 10  $\mu$ m ، توجد بشكل مفردة او بهيأة سلاسل أو تجمعات ولا تكون ابواغا" لكنها تكون حويصلات أو كبسولة أو غلاف خارجي سميك يدعى Slime وعند توفر الظروف المناسبة تنبت الكبسولة ، وتعطي خلايا خضرية ، الظروف المثلى لنموها وتطورها هي عند درجة حرارة 28- 31 م° و pH 6.5-7.5 ( Mahdi وآخرون ، 2018؛ Jensen ، 2021 ) .

توجد بكتريا *A. chroococcum* بشكل شائع في منطقة الجذر وقسم منها يدخل في النظام الجذري للنباتات مكون علاقة تعايشيه معها وقسم آخر يعيش بصورة حرة في منطقة الرايزوسفير ، بذلك تعمل على توفير حماية للنبات من الإصابة بالعديد من مسببات المرضية الموجودة في

التربة Soil pathogens وذلك عن طريق تأثيراتها المباشرة وغير المباشرة في مجاميع الإحياء الممرضة وذلك عبر منافستها على المكان والمواد الغذائية وحماية النبات بواسطة منع وصول المسبب المرضي لمناطق الإصابة (Aydi-Ben-Abdallah وآخرون، 2020، Jensen ; Hillel; 2020, 2021، 2005) .

تعمل بكتريا *A. chroococcum* على افراز انزيمات خاصة مضادة للمسببات المرضية مثل الفطريات والبكتريا مثل انزيم ACC deaminase الذي ينظم عمل منظمات النمو وايضا الأنزيمات المحللة لجدران خلايا المسببات الممرضة للنبات والحاوية على الكايتين مثل Chitobiosidase و Endochitinase مما يوفر حماية للنبات من المسببات المرضية (Pandey وآخرون، 2019، Aasfar ; 2019 وآخرون، 2021، Riaz ; 2021 وآخرون، 2022) .

تنتج بكتريا *Azotobacter* الفيتامينات، الاوكسينات، الجبرلينات والسيتوكينينات التي تعزز نمو الجذور وتساعد في امتصاص العناصر المغذية (Verma وآخرون، 2001) ، اضافة الى انتاجها العديد من المركبات مثل مركب سيانيد الهيدروجين و Azotobacterin و Conactine و Phenazine و Pyoiuteorin و Pyrrolnitiin التي لها دور في تثبيط نمو العديد من الفطريات الممرضة (Aydi-Ben-Abdallah وآخرون، 2020) .

تلعب البكتريا *Azotobacter* دورا "مهما" في زيادة جاهزية عدد من العناصر المغذية كالفسفور والحديد و النحاس والكبريت (Jnawali وآخرون، 2015) .

هناك العديد من التقارير حول التأثيرات المفيدة للبكتريا *A. chroococcum* في نمو وإنتاجية المحاصيل ذات الأهمية الزراعية منها تحسين تغذية النبات وزيادة تحمله للإجهادات الحيوية وغير الحيوية وتحسين خصوبة التربة من خلال القدرة على إنتاج الأمونيا والفيتامينات والنمو والمواد التي تعزز إنبات البذور (Verma وآخرون 2001)، تنتج البكتريا أيضاً هرمونات النمو thiamine, riboflavin, nicotine و indoleacetic acid (Shende وآخرون 1984) .

استخدمت بكتريا *A.chroococcum* بشكل واسع في برامج مكافحة الامراض النباتية مثل مكافحة امراض تعفن الجذور وموت البادرات (وحيد وآخرون ، 2014) .

وجد دخيل (2021) أن البكتريا *A.chroococcum* تمتلك فاعلية كبيرة في تثبيط نمو مسببات تعفن الجذور لعدد من نباتات الزينة على الوسط الزراعي PDA ، اذ بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطريات *Trichocladium griseum* ، *Fusarium oxysporum* ، *Curvularia lunata* والمسببة لتعفن جذور نبات اصابع العروس 87.45 % ، 76.08 % ، 08.96 % على التتابع ، في حين بلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطريات *Fusarium oxysporum* ، *Fusarium equiseti* والمسببة لتعفن نبات تراجي العروس 75.62 % ، 84.87 % على التتابع ، وبلغت النسبة المئوية لتثبيط

الفطريات المسببة لتعفن جذور الكزانيا , *Trichocladium griseum* *Marcelleina personai* , *Fusarium oxysporum* ( 55.72 % ، 72. 55 % ، 96.08 % ) على التتابع ، وبلغت النسبة المئوية لتثبيط الفطريات *Fusarium oxysporum* , *Lasiodiplodia theobromae* المسببة لتعفن جذور نبات دم العاشق % 79.61 ، % 75.29 على التتابع ، كما وجد Hillel ( 2005 ) ان هذه البكتريا لها القدرة على التحلل المائي لبعض السموم المنتجة من قبل بعض الفطريات الممرضة بحيث يصبح اقل سمية على النبات .

أثبتت دراسة Zarrin واخرون ( 2009 ) الى ان بعض سلالات *Azotobacter* أعطت نسبة تثبيط للفطر الممرض *Fusarium solani* المسبب لمرض تعفن جذور الحنطة حيث تراوحت النسبة بين 55-99 % وبنفس الوقت انتجت حامض الاندول IAA بتراكيز مختلفة مؤديا زيادة معنوية في معدل انبات البذور وصلت الى 100 % .

أثبتت أيضا" دراسة Alwan و Hussain (2019) ان بكتريا *A. chroococcum* التي عزلت من منطقة الرايزوسفير *Rhizosphere* من التربة لها قدرة عالية للتضاد مع الفطريات الممرضة , *Fusarium* , *Rhizoctonia* و *Aspergillus* .

### 3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

#### 3-1- الأجهزة والأدوات المستعملة

الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في الدراسة مع أسم الشركة وبلد المنشأ الجدول (3-1):

الجدول (3-1): الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في الدراسة

ت	أسم الجهاز	الشركة المصنعة
1	فرن كهربائي Electric Oven	Blinder-Germany
2	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Sartorius-Germany
3	حاضنة Incubator	Blinder-Germany
4	مجهر مركب Compound Microscope	NOVEX-HOLLANND
5	حجرة تلقيح Hood	Tiauja Taisite-China
6	جهاز التعقيم البخاري Autoclave	Lab Tech-Korea
7	جهاز تقطير الماء Distilled water apparatus	Arston-Turkey
8	ثلاجة Refrigerator	Arston-Turkey
9	مازج كهربائي Vortex	Bionerr-Korea
10	محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer	China
11	مصباح غاز Benzene Burner	Iraq
12	مفرغ هوائي Vacuum Pump	Yangyi

Germany	Laboratory أدوات زجاجية مختلفة الأشكال glassware	13
India	Cork Borer ثاقب فليني	14
India	Stander Wirel Loop الناقل الزراعي القياسي	15
China	Disposable Petri dishes أطباق بتري بلاستيكية	16
China	شرائح زجاجية مع غطاء الشريحة Slides and cover slide	17
Local market	شاش طبي	18
Korea	Shaking Incubator حاضنة هزازة	19
Hitech	Centerfuge جهاز الطرد المركزي	20
Turkey	تيوبات+كبات	21
India	Parafilm شريط بارافيلم	23
China	سلفون+قطن	24
China	كفوف+كمامات Latex gloves+Face mask	25
Japan	مقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية Spectro photo meter	26
Citotest-China	Filter Paper أوراق ترشيح	27
Sartorius Stedim Biotech-Germany	0.2 (Filter Type AC,SC) Milipore مرشح	28
Jlassco-India	Blender خلاط كهربائي	29
Canon-Japan	Digital Camera كاميرا رقمية	30

Hlalab-China	قمع ترشيح	31
Nusafe-India	محاقن طبية ml3	32
Korea	جهاز تسخين Hot Plate&Stirrer	33
China	أواني تجفيف خزفية	34
Sterellin Ltd-UK	مسحات قطنية معقمة Sterilized cotton Swabs	35
Brand-W –Germany	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة Micropipettes	36
	انابيب اختبار test tube	37

الجدول (2-3) المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة

الشركة المصنعة	أسم المواد	ت
Hoechst	أزرق الميثيلين Methylene blue	1
–	صوف زجاجي	2
Fluka	سليكا جل	3
Promega	السم القياسي Standard AFB <sub>1</sub>	4
Fluka	صفائح الترحيل الكروماتوغرافي TLC	5
BDH	كبريتات الصوديوم الامائية	6
BDH	شمع البارافين Paraffin wax	7
BDH	كبريتات الصوديوم الامائية	8
BDH	شمع البارافين Paraffin wax	9

Bioneer	CL Buffer	10
Bioneer	TE buffer	11
Bioneer	Purification buffer	12
Bioneer	Ethidium bromide صبغة بروميد الأثيديوم stain	13
Oxoid	Gram 's stains صبغة كرام	14
BDH	Ethanol alcohol كحول الايثانول	15
BDH	Methanol alcohol كحول الميثانول	16
BDH	بنزين	17
Fluka	Cholorophorm كلوروفورم	18
BDH	Sdium chloride كلوريد الصوديوم	19
BDH	Glycerol كليسرول	20
Mercy	Balsam Candia كندا بلسم	21
Samarra	كاربونات الكالسيوم	22
تجاري	هايپو كلورات الصوديوم	23
BDH	هكسان	24
Mercy	صبغة السفرانين	25
Mercy	بلورات البنفسجية	26

الجدول (3-3) الاوساط الزرعية المستخدمة

الشركة المصنعة	أسم المواد	ت
Himedia	اكار-اكار	1
Himedia	وسط اكار البطاطا والدكستروز PDA	2
Himedia	وسط الاكار المغذي Nutrient agar	3
Himedia	وسط المرق المغذي Nutrient broth	4
تصنيع مختبري	وسط جوز الهند	5

## 2-3- طرائق العمل Method

### 1-2-3- تحضير المحاليل والصبغات المستخدمة في الدراسة

#### 1-1-2-3- 1- محلول صبغة كرام Gram Stain

حضرت صبغة كرام بإذابة 1 غم من البلورات البنفسجية Crystal Violet والسفرانين Safranin كلا على حدة في 100 مل من الماء المقطر ، تركت لمدة 24 ساعة من دون استعمال لضمان تخمر الصبغة وتجانس المحلول ، ثم وضعت في قناني زجاجية معتمة وذلك لمنع التأكسد ، ثم تركت في أماكن مظلمة لحين الاستعمال ، الغرض من استخدام الصبغة هو تصبيغ الخلايا البكتيرية ( Collee واخرون ، 1996 ) .

#### 2-1-2-3- 2- محلول الفصل لصفائح الكروماتوغرافي

حضر المحلول باستخدام كلوروفورم: ميثانول ( 98 : 2 ) ، الغرض من استخدام المحلول هو لفصل بقع السموم على صفائح الكروماتوغرافي ( أجميلي ، 1996 ) .

#### 3-1-2-3- 3- السم القياسي Aflatoxin B<sub>1</sub>

تم الحصول على سم الافلاتوكسين القياسي B<sub>1</sub> بشكل متبلور في عبوة بلاستيكية معتمة من شركة Hi-media بوزن 1 ملغم لكل عبوة وأذيب في 5 مل من محلول الكلوروفورم ليصبح التركيز 200 مايكرو غرام/مليتر<sup>-1</sup> ، واعتبر محلول الأساس ( Stock Solution ) ، ثم وضع في قنينة زجاجية معتمة وأغلقت بإحكام وتم تغليفها بورق الألمنيوم ( Aluminium foil ) وذلك لغرض بقائها بعيدا عن الضوء ، بعدها حفظت بدرجة حرارة 18 °م لحين الاستعمال .

## 2-2-3- تحضير الأوساط الزرعية Preparing the media Culture

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

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة ( HIMEDIA ) وذلك بإذابة 39 غم من المسحوق الجاهز في 1000 مل من الماء المقطر والمعقم ، ثم أضيف اليه المضاد البكتيري Chloramphenicol تركيز 250 ملغم/لتر ثم رج الدورق جيدا لضمان تجانس الوسط وعقم في المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقة، ترك الوسط ليبرد وأستعمل لتنمية وحفظ العزلات الفطرية.

### 2-2-2-3 - وسط جوز الهند (CA) Coconut agar mediuml

حضر الوسط حسب التعليمات التي وضعها الباحثان ( Lin و Dianese ، 19976) وذلك بأخذ كمية 100غم من مبروش جوز الهند والمتوفر في الاسواق المحلية واضيف اليها 300 مل من الماء المقطر ، سخن المزيج لمدة 30 دقيقة بعدها فصل الراشح بواسطة قطعة من الشاش الطبي. واضيف للراشح 15% أكار واكمل الحجم الى 300 مل من الماء المقطر ، ثم عقم في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقة. استخدم هذا الوسط لاختبار قابلية الفطريات على انتاج السم .

### 3-2-2-3 - وسط الاكار المغذي (NA) Nutrient Agar

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المجهزة الأمريكية BD Difco وذلك بإذابة 28غم من الوسط في 1000مل ماء مقطر، ثم عقم في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقة ، أستعمل الوسط لتنمية واكثر البكتريا .

### 4-2-2-3 - وسط المرق المغذي (NB) Nutrient Broth

حضر الوسط وفق تعليمات الشركة المجهزة BD Difco الأمريكية وذلك بإذابة 13غم من الوسط في 1000مل ماء مقطر ثم عقم في المؤصدة بدرجة حرارة 121 °م وضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقة ، أستعمل الوسط لتنمية البكتريا.

### 3-2-3 - جمع العينات Collection of samples

جمعت العينات من حبوب الحنطة الجافة والمخزونة من ساليوات مختلفة في محافظة كربلاء بتاريخ 2023/10/12 بمعدل 250غم من كل نوع وبصورة عشوائية ، وضعت العينات في أكياس نايلون ونقلت إلى مختبر الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء.

### 3-2-3-1 - عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض انواع الحبوب المحلية

عقمت كمية من كل عينة من الحبوب سطحيا كلا على حدة بمادة هايبيوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقتين ، ثم غسلت بماء مقطر معقم ، نقلت الحبوب إلى إطباق حاوية على ورق نشاف لتجفيفها ثم زرعت في إطباق قطرها 9 سم حاوية على وسط (PDA) معقم بواقع أربع حبات عند محيط الطبق والبذرة الخامسة في مركز الطبق، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25-37 °م لمدة 7 أيام (الاسدي، 2013)، بعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية العزلات الفطرية بأخذ لقاح بسيط من طرف المستعمرة وزرع في طبق اخر يحتوي على نفس الوسط الزراعي ، كررت العملية مرات عديدة وذلك للحصول على

عزلات نقية للفطريات وشخصت الفطريات مظهرياً" تبعا للصفات المظهرية والمجهريّة بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المعتمدة علمياً" (Parmeter و Whiten، 1970، Moni و اخرون، 2016) .  
حسبت النسبة المئوية لظهور الانواع الفطرية حسب معادلة (Booth و اخرون، 1988) ، والنسبة المئوية لتردد كل نوع من الانواع الفطرية المعزولة حسب معادلة (Booth و اخرون، 1988) :

$$\text{نسبة الظهور \%} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

$$\text{نسبة التردد \%} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر}}{\text{العدد الكلي للعزلات}} \times 100$$

### 3-2-3-2 - حفظ العزلات الفطرية

حفظت العزلات الفطرية المنقاة في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة حاوية على وسط (PDA) وبصورة مائلة اذ زرعت أقراص منها على الوسط الزراعي في كل أنبوبة وحضنت لمدة أسبوع بدرجة حرارة 25-27 م° ، بعدها حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال (Evans و Richardson، 1989).

### 3-2-3-3 - اختبار قدرة العزلات الفطرية على إنتاج سم الافلا

#### 3-2-3-3-1 - اختبار الامونيا Ammonia Test

تم الكشف عن الفطريات المنتجة لسموم الافلا وذلك من خلال تنميتها على وسط جوز الهند المحضر مسبقا حسب الفقرة (3-2-2-2) ) لثق بأقراص من العزلات الفطرية النقية بقطر 5 ملم من طرف العزلة النقية وبعمر سبعة ايام ، ثم حضنت الاطباق لمدة عشرة ايام في الحاضنة بدرجة حرارة 25-27 م° ، الى ظهور الغزل الفطري تم وضعت أوراق ترشيش مبللة بقطرات من الامونيا بتركيز 20% على غطاء الاطباق ، حضنت الاطباق مرة اخرى لمدة أربعة ايام بصورة مقلوبة وتم تمييز الفطريات المنتجة للسموم من غيرها بتلون قواعد المستعمرات باللون الأحمر أو البرتقالي بدلا من اللون الشفاف(Saito و Machida، 1999) .

### 3-2-3-3-2 - الكشف عن سم الافلا B1 باستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة

#### Thin Layer Chromatography (TLC)

تم تنمية عزلات الفطريات المدروسة على وسط (PDA) وذلك بوضع أقراص من الفطريات وبقطر 5 ملم بعمر أسبوع في مركز كل طبق بواقع ثلاث مكررات لكل عزلة فطرية ، ثم حضنت الاطباق

عند درجة حرارة 25-27 م° ولمدة أسبوع ، واختيرت ثلاث اطباق من كل عذلة وقطع الوسط الزراعي المنمى عليه الفطر بوساطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة ، بعدها نقلت القطع إلى خلاط كهربائي حاوي على 20 مل من الكلوروفورم ، مزج الخليط لمدة 10 دقائق ، بعدها رشح المزيج بوساطة اوارق الترشيح نوع Whatman No.1 . أخذ الراشح ووضع في دورق معقم ثم جفف في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م° حتى وصول الكمية إلى ما يقارب 1مل فقط ، تم الكشف عن وجود سم الافلا B<sub>1</sub> باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة (TLC) ذات إبعاد (20×20) سم اذ نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة (120) م° لمدة ساعة قبل الاستعمال واستخدم نظام الفصل كلوروفورم: ميثانول (98 : 2) ( الجميلي ، 1996 ) .

تم عمل خط مستقيم خفيف على صفيحة TLC يبعد بمسافة (1.5) سم من قاعدة الصفيحة وأخذ 15 مايكروليتر بواسطة أنبوبة شعرية من السم القياسي AFB<sub>1</sub> ووضع على الخط بمسافة 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة وعلى مسافة 2 سم من البقعة الخاصة بالسم القياسي الأول كما تم وضع نفس الكمية من كل عينة من عينات الفطريات المدروسة وعلى نفس الخط اعلاه اي 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة، ثم تركت البقع لتجف ووضع في حوض الفصل الحاوي على مزيج الكلوروفورم والميثانول وبنسبة(98 : 2) حجم/حجم وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول لمسافة تقارب 2 سم من النهاية العليا للصفيحة ، بعدها أخرجت الصفائح وجففت تحت ظروف المختبر لمدة 5دقائق ، وفحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول الموجي 360 نانوميتر وتم الكشف عن وجود الافلاتوكسين B<sub>1</sub> بمطابقة معامل الترحيل Rf ولون التآلق للسم القياسي (Sobolev) و (Dorner،2002) .

### 3-2-3-3-3- قياس تركيز سم الافلا B1 باستخدام تقنية HPLC

#### High-Performance Liquid Chromatography

اتبعت طريقة Lina وآخرون (2012) لكشف وقياس تركيز سم الافلا B1 حيث اتبعت الخطوات

التالية:

- 1- اخذ وزن 25 غم من العينة بعد التجفيف والطحن ووضع في دورق سعة 250 مل.
- 2- اضيف اليه 25 مل ميثانول و25 مل كلوروفورم.
- 3- وضعت على جهاز الهزاز (Sheaker) لمدة 60 دقيقة لغرض التجانس.
- 4- رشحت العينات بورق ترشيح Whatman No 1 و25 مل ميثانول 90% وفصل بواسطة قمع الفصل.
- 5- نقل الراشح الى قمع الفصل واطافة 25 مل هكسان و25 مل ميثانول 90% وفصل بقمع الفصل.
- 6- تؤخذ الطبقة السفلى الحاوية على الميثانول التي يتم تجفيفها بالحمام المائي.

- 7- اخذ النموذج واضيف إليه الكلوروفورم وماء مقطر بنسبة 25: 25 مل في قمع الفصل وغسل مرتين بالماء المقطر بعد رج القمع وتركه لحين انفصال الطبقتين (تهمل الطبقة العليا).
- 8- مررت الطبقة السفلى الكلوروفورم خلال ورق ترشيح حاوية على 10 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية وذلك لامتصاص الرطوبة .
- 9- اخذ الراشح وتم تبخيره لحد الجفاف على الحمام المائي.
- تم اجراء الفحص في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا – دائرة البيئية والمياه باستخدام جهاز كرموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي موديل ( سيكام - SYKAM ) الماني المنشأ ، اذ تم استخدام الطور الناقل : اسيتونترايل وماء مقطر بنسبة (70: 30) ، استخدم عمود الفصل ( ODS ) C18 – Octadecyl Silane بحجم (25 سم - 4.6 ملليمتر ) لفصل السموم الفطرية ، واستخدم كاشف الفلورة وضبط طاقة الامتصاص عند (em= 445nm ) للكشف عن السموم الفطرية ، وكانت سرعة جريان الطور الناقل هي 0.7 مل/دقيقة .

### 3-2-3-4- التشخيص الجزيئي Molecular Identification

اجري فحص Polymerase chain reaction (PCR) لغرض تأكيد التشخيص المظهري للفطريات المعزولة والمنتجة لسلم الافلا B1 وتشخيصها على مستوى النوع حسب طريقة (Narayananasamy، 2011) وكما يأتي :

#### أولاً :استخلاص و تنقية ال DNA DNA extraction and purification

أجريت عملية تنقية واستخلاص لل DNA من المستعمرات للفطريات النقية باستخدام العدة التجارية DNeasy Plant Kit المجهزة من الشركة الالمانية QIAGEN ومن خلال اتباع الخطوات التالية:

1- جمعت العزلات الفطرية المنتجة لسلم الافلا ويعمر 10 ايام ونقلت كلا على حده الى انبوبة اختبار (Eppendorf tube) معقمة بسعة 1.5 مل واضيف اليها 400 مايكروليتر من المحلول الدارئ AP1 ، ثم سحقنا العينة باستخدام المدقة البلاستيكية الصغيرة المعقمة (Micropestle) لتحطيم جدران الخلايا الفطرية مع رج العينة عدة مرات باستخدام جهاز الهزاز (vortex) والغرض من هذه الخطوة هو تحطيم الخلايا الفطرية.

2- حضنت الانبوبة الحاوية على الخليط لمدة 10 دقائق في حمام مائي بدرجة حرارة 65 م مع الحرص على رج الانبوبة يدويا 2-3 مرات اثناء فترة الحضان والغرض من هذه الخطوة هو تحليل الخلايا الفطرية.

3- اضيفت 130 مايكروليتر من المحلول الدارئ (P3) Proteins and buffer الى Carbohydrate rempval الى الانبوبة الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات بشكل جيد

- باستخدام جهاز الهزاز وحضنت على الثلج لمدة 5 دقائق . في هذه الخطوة تترسب المنظفات الخاصة بالمحلول الدائري وكذلك البروتينات والسكريات المتعددة الخاصة بالفطر.
- 4- أجريت عملية الطرد المركزي للأنبوبة لمدة 5 دقائق بسرعة 1400 دورة/ دقيقة ، ثم نقل المحلول الطافي الى الانبوبة ذات اللون الارجواني نوع QIAshredder Mini spin column التي تحتوي على مرشح خاص وأيضاً أجريت لها عملية الطرد المركزي لمدة دقيقتين وبنفس السرعة اعلاه . يعمل مرشح هذه الانابيب على إزالة حطام الخلايا الفطرية ومعظم الرواسب.
- 5- نقل الراشح الى انبوبة اختبار جديدة معقمة سعة 2 مل و اضيف اليه 700 مايكرو لتر من المحلول الدائري (AW1) Purification buffer ومزجت المحتويات بواسطة ماصة صغيرة معقمة .
- 6- نقل 650 ميكرو لتر من الخليط باستخدام ماصة صغيرة الى انبوبة ذات اللون الابيض نوع DNeasy Mini spin column والتي أيضاً تحتوي على مرشح خاص لغرض تنقية الـ DNA ، اجرت عملية الطرد المركزي للأنابيب لمدة دقيقة واحدة بسرعة 8000 دورة دقيقة<sup>-1</sup> ، بعدها تم التخلص من الراشح ونقل المتبقي من الخليط الى نفس الانبوبة وأجريت عملية الطرد المركزي بنفس السرعة والفترة الزمنية لغرض التخلص من الراشح أيضاً .
- 7- أضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدائري AW2 الى نفس الانبوبة اعلاه مع اجراء عملية الطرد المركزي لها لمدة دقيقة واحدة بسرعة 8000 دورة دقيقة<sup>-1</sup>، بعدها تم التخلص من الراشح ثم أضيف مرة اخرى لنفس الانبوبة 500 ميكرو لتر من المحلول الدائري AW2 وأجريت لها عملية الطرد المركزي لمدة دقيقتين بسرعة 1400 دورة دقيقة<sup>-1</sup> ، و تم التخلص من الراشح . ان الغرض من اجراء هذه الخطوة هو لتنقية الـ DNA العالق بالمرشح.
- 8- وضعت الانبوبة DNeasy Mini spin column بداخل انبوبة اختبار معقمة سعة 2 مل و اضيف الى غشاء مرشح الانبوبة 100 ميكرو لتر من المحلول الدائري ( TE ) Elution buffer مباشرة ، بعدها حضنت الانبوبة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ، ثم أجريت عملية الطرد المركزي وبسرعة 8000 دورة دقيقة<sup>-1</sup> لمدة دقيقة واحدة للحصول على الراشح الذي يحوي على الـ DNA الكلي. ان الغرض من اجراء هذه الخطوة هو إزالة الـ DNA العالق بغشاء مرشح الأنبوبة .
- 9- حفظت الأنبوبة الحاوية على الـ DNA تحت درجة حرارة 20- م ° لحين الاستخدام .

## ثانياً: تحديد تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA

تم حساب تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer عند الطولين الموجيين (260/280 نانوميتر) من خلال قياس الكثافة الضوئية

## ثالثاً: تفاعل ( PCR ) Polymerase Chain Reaction

ا- اختيار البادئات المستخدمة في التفاعل

جهزت البودئ المتخصصة لتشخيص الفطريات المنتجة لسموم الافلا من شركة Bioneer الكورية  
الجدول (3-4):

### جدول (3-4) البودئ المستخدمة في تقنية ( PCR ) Polymerase chain reaction

Primer	Sequence		PCR product size
		5 → 3	
ITS4	F	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC/	590-530 bp
ITS5	R	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	

### ب- تحضير محلول البادئ الخزين

حضر محلول العمل لكل بادئ حسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأخذ 10 ميكرو ليتر من محلول المخزون في 90 ميكرو ليتر من الماء الخالي من nuclease أو الماء المقطر ليصبح التركيز النهائي 100 بيكومول ميكرو ليتر<sup>1</sup>.

### ج - شروط جهاز التدوير الحراري حالة ال-PCR

تم إدراج مكونات خليط التفاعل وبرنامج PCR الجدول (3-5) :

### جدول (3-5) مكونات خليط التفاعل لبرنامج PCR

الحجم $\mu$ L	المكونات
12.5	Green master mix
9	Nuclease free water
1	forward primer
1	Reverse primer
1.5	Template DNA
25	Total volume

ج- ظروف تفاعل البلمرة  
تمت مضاعفة الحامض النووي DNA حسب برنامج التضاعف الخاص بالـ PCR الذي  
يتكون من عدة خطوات الجدول (6-3) .

### جدول (6-3) خطوات تفاعل PCR

عدد الدورات	درجة الحرارة (م)°	الوقت	الخطوات
1	95	5 دقائق	Initial Denaturation مسخ اولي
35	95	40 ثانية	Denaturation Final مسخ نهائي
	55	40 ثانية	Annealing الالتصاق
	72	1 دقيقة	Extention Initial استطالة اولية
1	72	5 دقائق	Final Extension استطالة نهائية

رفعت الانابيب من جهاز الـ PCR وتم ترحيلها على هلام الاكاروز 1% المحضر بإضافة 1 غم من الأكاروز في 100 مل (TBE-buffer) محلول الترحيل و تم وضعه في حمام مائي في درجة حرارة 100 م لمدة ربع ساعة لغرض ذوبان الاكاروز. بعدها تم إضافة 5 مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم ، واستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية وذلك من خلال وصول محلول التحميل الازرق اللون الى ما قبل نهاية الهلام بـ 2 سم تقريباً وتم تصويره بواسطة كاميرة جهاز تصوير الهلام .

### رابعا : تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية

بعد اجراء عملية التضاعف الـ PCR أرسلت العينات الفطرية المنتجة لسم الافلا إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكل عينة فطرية، وسجلت الفطريات المشخصة في البنك الجيني العالمي وذلك لغرض معرفة التشابه بين الفطريات المدروسة

والفطريات المسجلة عالميا ، ولقد تم الاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center for Biotechnology Information في رسم الشجرة الوراثية .

### 3-2-3-4- تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي العكسي في الوقت الحقيقي ( RT-qPCR )

#### Real-Time Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

تم اختيار عزلتين هما عزلة الفطر *A. flavus1* التي كانت اكثر انتاجا لسم الافلا B1 وبكمية 215.9 ppb وعزلة الفطر *A. niger1* التي كانت اقل انتاجا لسم الافلا وبكمية 30.5 ppb لإيجاد المقارنة بينهما من خلال اجراء تقنية تفاعل البوليمرايز المتسلسل الكمي في الوقت اللحظي ( الاستنساخ العكسي ) وذلك لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المرسل ( mRNA ) للدلالة على مقدار التعبير الجيني لجين ( *AFLD gene* ) الذي يعبر عن انتاج الافلاتوكسين وتطبيعها بواسطة الجين المحافظ ( *ITS4* ) بوصفه جينا منظما قياسيا لحساب التعبير الجيني وبواقع ثلاث مكررات. تم اجراء هذا الفحص حسب طريقة Nailis واخرون (2010) كما في الخطوات الاتية :-

#### اولا" : استخلاص الحامض النووي RNA

تم استخلاص الحامض النووي RNA وذلك باستخدام عدة الـ Trinzol kit المجهزة من لدن شركة Transgen الصينية وحسب تعليمات الشركة المصنعة كما في الخطوات الاتية:-

- 1- تنمية العزلات الفطرية على وسط PDA
- 2- تجميد العينة الفطرية في النيتروجين السائل للحفاظ على الحامض النووي RNA من التحلل .
- 3- نقل العينة المجمدة بسرعة إلى اناء وطحنها جيّداً باستخدام هاون حتى تتحول إلى مسحوق. واحيانا يتم استخدام المزيد من النيتروجين السائل إذا لزم الأمر. اذ أن الطحن غير الكامل يؤثر على إنتاج الحامض النووي الريبي RNA وجودته.
- 4- نقل مسحوق العينة إلى أنبوب الطرد المركزي الدقيق . ثم إضافة 1 مل من TransZol لكل 100-50 مليغرام من العينة. وتم تجانس العينات باستخدام جهاز التجانس ، ثم تمريرها بشكل متكرر للأعلى والأسفل، وحصنها في درجة حرارة الغرفة لمدة 5 دقائق.
- 5- إضافة الكلوروفورم بمقدار 200 ميكرو لتر لكل 1 مل من TransZol مع الرج بقوة، وحصنة لمدة 2-3 دقائق.

6- وضع العينة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة دقيقة<sup>1</sup> لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة تتراوح بين 2-8 م° . اذ ينفصل الخليط إلى طور عضوي وردي سفلي يحتوي على الكلوروفورم والدهون والبروتينات والاجزاء غير قابلة للذوبان ، وطور بيني الذي يمكن ان يحتوي على مكونات اخرى مثل البروتينات وهو اقل وضوحا ، وطور مائي علوي عديم اللون يحتوي على

الحمض النووي الريبي RNA. يبلغ حجم الطور العلوي المائي حوالي 60% من حجم كاشف TransZol.

7- نقل الطور العلوي عديم اللون الذي يحتوي على الحمض النووي الريبي RNA إلى أنبوب RNase-free. بعدها يتم إضافة 0.5 مل من Isopropanol لكل 1 مل من TransZol المستخدم مع الخلط الجيد. ويتم حضنه في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق.

8- وضع العينة في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10000 دورة دقيقة-1 لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة تتراوح بين 2-8 م<sup>0</sup>، تم التخلص من السائل العلوي. إذ يمكن رؤية الرواسب الغروية على جدار وأسفل الأنبوب.

9- إضافة 1 مل من الإيثانول بنسبة 75% (المحضر بماء خالٍ من RNase)، مع التقليب بقوة. 10- وضع العينة في جهاز الطرد المركزي عند 7500 دورة دقيقة-1 لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة تتراوح بين 2-8 م<sup>0</sup>.

11- التخلص من السائل العلوي وتجفيف حبيبات الحمض النووي الريبي RNA في الهواء (حوالي 5 دقائق).

12- إذابة حبيبات الحمض النووي الريبي RNA في 50-100 ميكرو لتر من المحلول المذيب.

13- حضنها عند درجة حرارة تتراوح بين 55-60 م<sup>0</sup> لمدة 10 دقائق. للتخزين طويل الأمد، خزن الحمض النووي المنقى RNA عند درجة حرارة -70 م<sup>0</sup>.

## ثانياً: - نظام احادي الخطوة GoTaq® 1-Step RT-PCR System

تم إجراء RT-qPCR باستخدام GoTaq 1-Step حسب تعليمات شركة بروميكا

(Promega Corporation، 2021) ويتضمن الخطوات الآتية:

1- حضرت مكونات مزيج تفاعل الجدول (7-3).

### جدول (7-3): مكونات مزيج تفاعل RT - PCR لنظام أحادي الخطوة GoTaq®

Final Concentration	Volume per 20µl Reaction	المكونات
X1	10µl	GoTaq® RT-PCR Master Mix, 2X
300- 50 nM	2µl	Forward Primer, 10X
300-50 nM	2µl	Reverse Primer, 10X
X1	0.4 µl	GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-PCR, 50X or Nuclease-Free Water for Minus-RT Control
Variable	4 µl	RNA Template (500fg–100ng)or Nuclease-Free Water for No Template Control
≥2 nM	___µl	Optional: MgCl <sub>2</sub> , 25mM
≥33	___µl	Optional: CXR Reference Dye. 30µM
—	20µl	Nuclease-Free Water
≥2	1.6 µl	Mgcl <sub>2</sub>
500 nM	0.33 µl	صبغة CXR

2- تم خلط المكونات برفق عن طريق السحب للأعلى والأسفل. استخدم جهاز الطرد المركزي

لفترة وجيزة للتخلص من فقاعات الهواء المحتملة التي تعيق التفاعل بين الكواشف و RNA ،

وجمع أحجام التفاعل في قاع الأنبوب.

3- وزع الخليط الرئيسي في آبار صفيحة أو أنابيب PCR، مع التأكد من أن كل بئر يتلقى نفس الحجم.

4- إضافة عينة الحمض النووي RNA إلى الآبار المناسبة مع توخي الحذر لتجنب التلوث وايضا حماية جميع الكواشف التي تحتوي على GoTaq qPCR Master Mix من الضوء المباشر الشديد.

5- أغلقت الأنابيب لمنع التبخر مع الخلط برفق مرة أخرى.

6- تم برمجة أداة في الوقت الحظي لـ RT-PCR في الوضع القياسي أو السريع بخطوة واحدة الجدول (8-3) .

### جدول ( 8-3 ) الظروف الحرارية المثلى لمراحل RT – PCR

المرحلة	عدد الدورات	درجة الحرارة	الوقت
1- RT inactivation/Hot-start activation	1	95 م°	10 دقائق
2- Reverse transcription	1	37 م°	15 دقيقة
3- مرحلة RT-PCR	40	95 م°	10 ثواني
Denature-a		60 م°	30 ثانية
Anneal/Collect data -b		72 م°	30 ثانية
Extend -c			
4- Dissociation	1	60-95 م°	

7- وضع لوحة التفاعل في الجهاز المسخن مسبقاً والمبرمج والبدا بتشغيل الجهاز على الفور.

8- عند اكتمال التشغيل، جمعت البيانات وتم تحليل النتائج .

تم تحليل البيانات حسب طريقة Livak Method التي وضعت من قبل العالمان Livak و Schmittgen (2001) ، هذه الطريقة تعتمد على وجود جين هدف الذي تمثل بهذه الدراسة الجين ( AFLD ) الخاص بإنتاج الافلاتوكسين وايضاً إلى جين محافظ او معياري Housekeeping gene ( HKG ) وتمثل في الجين ( ITS4 ) وكما موضح في المعادلات الاتية:

1- معادلة CT للجين الهدف بالنسبة إلى الجين المعياري

$$\Delta CT = CT_{\text{target test}} - CT_{\text{reference}}$$

CT target : يشير إلى عتبة الدورة للجين الهدف AFLD

CT reference : يشير إلى عتبة الدورة للجين المحافظ ITS4



2- معادلة CT  $\Delta$  باستخدام القانون الاتي :-

$$\Delta \Delta_{CT} = \Delta_{CT} - \Delta_{CT} \text{ Average .}$$

3- ايجاد نسبة التعبير الجيني ( Fold change ) ، باستخدام القانون :

$$\text{Gene expression Ratio} = 2^{-\Delta \Delta_{CT}}$$

#### 3-2-4 - عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter chroococcum*

تم الحصول على عزلة البكتريا *A. chroococcum* من مختبرات دائرة وقاية المزروعات التابعة الى وزارة الزراعة، وجرى تنميتها واكثارها على الوسط الزرعي Nutrient agar ثم على الوسط السائل Nutrient broth .

#### 3-4-2-3 - فحص الصفات المجهرية Microscopic properties

تم إجراء الفحص المجهرى للبكتيريا بعد صبغها بصبغة كرام، وتم فحص شكلها وحجمها وتقنية تجمعها وقدرتها على الصبغ وكما وصفها Black (1965).

#### 3-4-2-3 -2- التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية *A. chroococcum*

##### اولاً/استخلاص وتنقية الحامض النووي DNA

تم استخلاص الـ DNA البكتيري حسب عدة الاستخلاص G-spin™ Total DNA Extraction Kit المجهزة من شركة Intron–Korea وفق الخطوات الآتية:

1-حضرت عينة البكتريا *A. chroococcum* بتخطيط اطباق بتري حاوية على وسط Nutrient agar ، بعدها حضنت بدرجة حرارة 28 °م ولمدة 24 ساعة ، ثم اخذت مستعمرة مفردة وتم تلقحها في وسط Nutrient Broth بحجم 5 مل ، وحضنت بدرجة حرارة 28 °م لمدة 24 ساعة.

2-نقل 1.5 مل من الوسط Nutrient Broth السائل الملقح بالبكتريا المدروسة الى انبوبة سعة 2 مل .

3- نبذت الانابيب الحاوية على العالق البكتيري بجهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة عند 13000 دورة دقيقة<sup>1</sup> ، و أهملت المادة الطافية. بعدها تم تعليق pellet الخلية بالكامل مع بقايا المادة الطافية من خلال استخدام جهاز vortex .

4- أضيف 200 مايكروليتر من CL Buffer وايضا 5 ميكروليتر من محلول RNase A في أنبوب العينة ، ومن ثم خلطت عن طريق الدوران بقوة .

5-حضنت الانابيب عند درجة حرارة 56 °م لمدة 10-30 دقيقة اما باستخدام الفرن أو الحمام المائي.

6-أضيف 200 ميكروليتر من البفر BL إلى أنبوبة العينة ثم مزجت جيداً وحضنت عند درجة حرارة 70 °م لمدة 5 دقائق.

7-وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي عند 13000 دورة في الدقيقة لمدة 5 دقائق ، ثم نقلت 350 - 400 ميكروليتر من المادة الطافية بعناية إلى انبوبة سعة 1.5 مل جديدة .

8-نبتت انبوبة سعة 1.5 مل بالطرد المركزي لعدة ثواني وذلك لإزالة القطرات من داخل الغطاء وجوانب الأنبوب.

9-اضيف 200 مايكروليتر من الايثانول المطلق الى الانابيب وخلطت جيداً بجهاز Vortex. بعد الخلط طردت مركزياً لعدة ثواني في أنبوب 1.5 مل وذلك لإزالة القطرات من الغطاء وجوانب الانبوب.

10-نقل المحلول بعناية من الخطوة 9 إلى اعمدة الفصل المجهزة مع العدة في انابيب سعة 2 مل جديدة وأغلق الغطاء، وخضعت لعملية الطرد المركزي عند 13000 دورة دقيقة<sup>1</sup> لمدة دقيقة واحدة ، للتخلص من الراشح ، ثم وضع عمود الدوران في انابيب تجميع جديدة سعة 2 مل.

11-اضيف 700 مايكروليتر من Buffer WA الى اعمدة الفصل مع تجنب ترطيب الحافة ، خضعت الانابيب الى عملية الطرد المركزي عند 13000 دورة دقيقة<sup>1</sup> لمدة دقيقة واحدة ، اهمل الراشح وإعادة استخدام الانابيب مرة اخرى .

12-اضيف 700 مايكروليتر من محلول WB الى اعمدة الفصل مع تجنب ترطيب الحافة ، خضعت الانابيب الى عملية طرد مركزي عند 13000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة، اهمل الراشح واستخدمت انابيب سعة 2 مل جديدة، وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة اضافية لغرض تجفيف الغشاء.

13-نقلت اعمدة الفصل الى انابيب جديدة سعة 1.5 مل، أُضيف اليها 30 مايكروليتر من Buffer CE مباشرة على الغشاء، حضنت لمدة دقيقة واحدة عند درجة حرارة الغرفة ، ثم طردت مركزياً عند 13000 دورة دقيقة<sup>1</sup> لمدة دقيقة واحدة وذلك لأزالة الشوائب ، بهذا نحصل على الناتج النهائي للمستخلص الحاوي على الـ DNA.

### ثانياً/ حساب تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA

حسب تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA باستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer عند الطولين الموجيين (260 و 280 نانوميتر) من خلال قياس الكثافة الضوئية .

## ثالثاً/ تفاعل ( PCR ) Polymerase Chain Reaction

ا- اختيار البوادئ المستخدمة في مضاعفة الجين 16s rRNA

تم تجهيز البوادئ المتخصصة لتشخيص البكتريا المدروسة من خلال مضاعفة الجين 16s rRNA من شركة Bioneer الكورية الجدول ( 3-9):

جدول (3-9) البوادئ المستخدمة في مضاعفة الجين 16s rRNA

الحجم	التسلسل	اسم البادئ
1500Pb	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	F Primer
	5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'	R Primer

### ب- تحضير البوادئ

أذيب البادئ المجفف في 250 مايكرو ليتر من الماء الخالي من nuclease للحصول على تركيز نهائي قدره (100 بيكومول / ميكرو ليتر) . حضر محلول العمل لكل بادئ وذلك بأخذ 10 ميكرو ليتر من محلول المخزون في 90 ميكرو ليتر من الماء الخالي من nuclease أو الماء المقطر ليصبح التركيز النهائي 10 بيكومول / ميكرو ليتر .

### ج/ شروط جهاز التدوير الحراري حالة الـPCR

تم إدراج مكونات خليط التفاعل وبرنامج PCR الجدول (3-10) :

جدول (3-10) مكونات خليط التفاعل لبرنامج PCR

الحجم $\mu\text{L}$	المكونات
12.5	Green master mix
5.5	Nuclease free water
1	forward primer
1	Reverse primer
5	Template DNA
25	Total volume

اما شروط برنامج التدوير الحراري الجدول (3-11) .

### جدول (11-3) شروط برنامج PCR

ت	الخطوات	عدد الدورات	درجة الحرارة	الوقت
1	Initial Denaturation	1	95 م °	5 دقيقة
2	Denaturation	35	95 م °	10 ثانية
3	Annealing		55 م °	45 ثانية
4	Extension		72 م °	55 ثانية
5	Final extension	1	72 م °	7 دقائق

### رابعاً/ الترحيل الكهربائي لهلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis

حضر هلام الأكاروز عن طريق اضافة 1.5 جم من مسحوق الاكاروز Agarose في 100 مل من محلول TBE المنظم الرقم الهيدروجيني (8) ، سخن المزيج مع التحريك في حمام ماء مغلي لحين اكتمال الإذابة ، ترك الهلام ليبرد حتى درجة حرارة 50 درجة مئوية، ثم اضيف بروميد الإيثيديوم بتركيز 0.5 ملغم مل<sup>-1</sup> . بعدها وضع شريط على نهاية علبة الجل . تم تثبيت المشط في أحد طرفي الحوض لصنع آبار تستخدم لتحميل عينات نتائج تفاعل الخليط . ثم سكب الاكاروز في خزان الترحيل، ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 30 دقيقة ، ثم تمت إزالة المشط بلطف من الحفر بعد ذلك تم تثبيت الأكاروز في غرفة الرحلان الكهربائي التي كانت مملوءة بمادة TBE التي غطت سطح الجل . تم إضافة 5 ميكروليتر من الـ PCR product ، تم تحميل الخليط في الحفر الموجودة في هلام الأكاروز . بعدها تم السماح للتيار الكهربائي عند 70 فولت لمدة ساعة . تم استخدام الأشعة فوق البنفسجية عند 320-336 نانومتر لرؤية حزم الحمض النووي DNA ، تم تصوير الجل باستخدام الكاميرا الرقمية (Sambrook، 2001) .

### خامساً/ تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية

بعد اجراء عملية التضاعف الـ PCR أرسلت عينة البكتريا *A. chroococcum* إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكل عينة فطرية، وسجلت في البنك الجيني العالمي ، ولقد تم الاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Center for Biotechnology Information في رسم الشجرة الوراثية .

### 4-2-3-4 حفظ عزلة البكتريا *A. chroococcum*

حفظت العزلة على وسط Nutrient agar بشكل مائل Slant ، أيضا بشكل سائل في وسط Nutrient broth ، لغرض استخدامها في الاختبارات الأخرى ، حفظت العزلة في الثلاجة تحت درجة حرارة 4 م° .

### 4-2-3-5 حساب الكثافة العددية للبكتريا *A. chroococcum*

اتبعت طريقة عد المستعمرات المباشر في الأطباق لحساب العدد الكلي للبكتريا ، اذ تم تحضير سلسلة من التخفيف لعالق البكتريا *A. chroococcum* وذلك بأخذ 1 مل من الوسط السائل Broth Nutrient النامية فيه البكتريا بواسطة محقنه طبية واضيف الى الأنبوبة الأولى الحاوية على 9 مل ماء مقطر معقم للحصول على التخفيف  $10^{-1}$  ، ثم نقل 1 مل من الأنبوبة الأولى الى الأنبوبة الثانية الحاوية على 9 مل ماء مقطر معقم للحصول على التخفيف  $10^{-2}$  ، وكررت العملية على باقي أنابيب الاختبار للحصول على سلسلة من التخفيف ( $10^{-1}$ ---- $10^{-8}$ ) . بعدها تم اخذ 1 مل /طبق من تخفيف  $10^{-6}$  من العالق البكتيري بواسطة ماصة معقمة ووضع في الطبق وتم تحريك الطبق حركة دائرية لكي يتم توزيع العالق البكتيري بشكل جيد ثم اضافة الوسط PDA المعقم فوق العالق البكتيري ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 27 م° لمدة 48 ساعة ، بعدها حسبت عدد المستعمرات في كلطبق وضرب معدل المستعمرات البكتيرية في مقلوب التخفيف الفعال (Clark ، 1965) .

### 4-2-3-6 اختبار فعالية عزلة البكتريا *A. chroococcum* في تثبيط الفطريات المنتجة للافلأتوكسين B1

تم تنمية عزله البكتريا *A. chroococcum* في وسط المرق المغذي NB وبواقع 100 مل ، ثم حضنت بدرجة حرارة 27 م° لمدة 24 ساعة ، بعدها تم تهيئة وسط PDA في اربعة دوارق زجاجية حجم 250 مل وبعد تعقيمه وتبريده لدرجة حرارة 40 م° ، تمت اضافة ( 3,2,1 ) مل من عالق البكتيريا *A. chroococcum* وبواقع تركيز واحد لكل دورق ثم رجت الدوارق جيدا لغرض مزج الخميرة مع الوسط الزرعى مع تحريك الوسط حركة رحوية لتوزيع اللقاح بصورة متجانسة في الوسط ، اما الدورق الرابع استعمل للمقارنة اذ لم يضاف فيه عالق بكتيري . بعدها صبت مكونات الدوارق في اطباق بتري وتركت حتى يتصلب الوسط بعدها لقت ثلاثة إطباق بأقراص من PDA المنمى عليها العزلات الفطرية قيد الدراسة وبقطر 5 ملم من مزرعة الفطر الممرض في مركزه و بواقع ثلاثة مكررات لكل نوع مع ترك ثلاث مكررات مقارنة من دون عالق بكتيري ، عوملت جميع العينات قيد الدراسة بنفس الطريقة . بعدها حضنت جميع الإطباق بدرجة حرارة 25-27 م° لمدة أسبوع ثم حسبت أقطار مستعمرات الفطريات في

جميع الإطباق باستخدام مسطرة مدرجه ومقارنتها مع أقطار نفس الفطريات في معاملة السيطرة (الاسدي،2013). حسب معدل نمو الفطريات الممرضة والنسبة المئوية للتنشيط حسب المعادلة الآتية:-

نمو الفطر في معاملة المقارنة - النمو في المعاملة

$$\% \text{ للتنشيط} = \frac{\text{نمو الفطر في معاملة المقارنة}}{100} \times 100$$

نمو الفطر في معاملة المقارنة

### 3-2-5- مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا *A. chroococcum*

#### 3-2-5-1- تنمية عزله البكتريا *A. chroococcum*

تم تنمية عزله البكتريا *A. chroococcum* في وسط المرق المغذي NB و بواقع 100مل في دورق زجاجي سعة 250 مل، ثم حضنت بدرجة حرارة 27 م° لمدة 24 ساعة لغرض استخدامها في تصنيع لمستحضر الحيوي .

#### 3-2-5-2- اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم CaCo3 كمادة حاملة للقاح البكتريا

تم اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح وذلك بوضع 100غم من مادة كاربونات الكالسيوم في إناء زجاجي نظيف ومعقم ووضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 40م° ولمدة 24 ساعة وتركت لتبرد . ثم أضيف إليها 100 مل من الوسط ألتخيري المحضر مسبقا والمنى عليه بكتريا *A. chroococcum* بعمر 24 ساعة ثم نقل الاناء إلى الفرن بدرجة حرارة 40م° لمدة 5 أيام لحين جفافها جيدا مع مراعاة مراقبة مرحلة الجفاف يوميا للتأكد من عدم وجود رطوبة تماما ، بعدها تم طحن المسحوق المحملة عليه البكتريا في غرفة معقمة (Hood) ، وقدرت إعداد البكتريا في الغرام الواحد وذلك بأخذ 1غم من المسحوق واضيف الى الأنبوبة الأولى الحاوية على 9 مل ماء مقطر معقم للحصول على التخفيف<sup>1-10</sup> ، كررت العملية على باقي أنابيب الاختبار للحصول على سلسلة من التخفيف (10<sup>-1</sup> - 10<sup>-12</sup>)، ثم نقل 1مل من التخفيف الأخير للعالق البكتيري إلى أطباق معقمة حاوية على وسط Nutrient agar وبواقع ثلاث مكررات وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 27 م° لمدة 24 ساعة ( حميد ، 2001) . وقدرت أعداد البكتريا في الغرام الواحد من المادة الحاملة حسب معادلة Clark ( 1965) .

عدد خلايا البكتريا ( مل ) = معدل عدد المستعمرات في كل طبق × مقلوب التخفيف

### 3-5-2-3- اختبار كفاءة المستحضر الحيوي المصنع من بكتريا *A. chroococcum* في حماية

#### حبوب الحنطة المأخوذة خلال فترة الحصاد من الإصابة بالفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B<sub>1</sub>

اجريت هذه التجربة وفقا للخطوات الاتية:-

#### اولاً / تهيئة حبوب الحنطة

تم جلب عينات من حبوب الحنطة خلال فترة الحصاد من بساتين محافظة كربلاء المقدسة بتاريخ 2024/6/2 وبواقع 10 كغم بعدها وتم إجراء اختبار أولي عن مدى تلوث تلك الحبوب بالأفلاتوكسينات من خلال زراعتها في اطباق بتري حاوية على وسط PDA لمدة اسبوع وبدرجة حرارة 27-20 م<sup>0</sup>.

#### ثانياً / تحضير لقاح الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B<sub>1</sub>

تم اختيار الفطريات الاكثر انتاجاً للأفلاتوكسين وتنميتها على وسط PDA المعقم وكما مبين في الفقرة (2.2.3) ، بعدها تم تحضير لقاح الفطريات كلا على حده وذلك بإضافة 20 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق ومن ثم حصاد الابواغ بواسطة قضيب زجاجي ، بعدها تم حساب إعداد الابواغ بواسطة Haemocytometer .

#### ثالثاً / تنفيذ المعاملات

نفذت المعاملات الأتية على حبوب الحنطة قيد الدراسة الجدول (3-12) .  
جدول(3-12) تنفيذ المعاملات للتجربة الخزنية

توصيف المعاملات
حبوب دون اي معاملة
حبوب ملوثة معاملة بالفطريات فقط دون اضافة المستحضر الحيوي
حبوب ملوثة معاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري بتركيز 0.5غم/100كغم حبوب
حبوب ملوثة معاملة بالفطريات ومعاله بالمستحضر الحيوي البكتيري بتركيز 0.5غم/100كغم حبوب

تضمنت عملية المعاملات وضع 100 غم من حبوب الحنطة في كيس نايلون نظيف وإضافة 10 مل من لقاح الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B<sub>1</sub> ثم رج الكيس لنشر اللقاح الفطري ، ثم إضافة 0.5 غرام من المستحضر الحيوي الناتج إلى الكيس ورج الكيس بقوة لتوزيع المستحضر بالتساوي على أسطح الحبوب .

تم إجراء باقي المعالجات بنفس الطريقة وتم تعبئة الحبوب من كل معاملة بعد ذلك في ثلاثة أكياس من كلوريد البولي فينيل بوزن 100 غرام / كيس ، حفظت الاكياس في ظروف خزن طبيعية

من حيث درجات الحرارة والرطوبة والضوء والتلوث الخارجي لمدة ستة أشهر للفترة من 10/2024/6 ولغاية 10/2024/12 .

#### رابعاً / حساب تركيز الأفلاتوكسين B1 بعد مرور ستة أشهر من تخزين الحبوب بطريقة HPLC

اتبعت طريقة Lina وآخرون (2012) للكشف عن قياس تركيز AFB1 في الأكياس التي تحتوي على المعاملات وتم اتخاذ الخطوات التالية:

1- وضعت كمية 25 جرام من الحبوب المطحونة في دورق سعة 250 مل، بعدها تم إضافة 25 مل من الميثانول و25 مل من الكلوروفورم. تم رج الخليط لمدة ساعة باستخدام جهاز الهزاز . Shaker

2- رشحت العينة من خلال ورق الترشيح نوع Whatman No.4 ، ثم تمت إضافة 25 مل من الميثانول بنسبة 90٪ وفصلها بقمع الفصل.

3- نقل المرشح إلى قمع الفصل، وتم إضافة 25 مل من الهكسان و25 مل من الميثانول بنسبة 90٪ إليه. تمت إزالة الطبقة السفلية المحتوية على الميثانول وتجفيفها في حمام مائي.

4- اضيف للعينة كلوروفورم : ماء مقطر بنسبة 25:25 مل وفصلت باستخدام قمع الفصل، بعدها مررت الطبقة السفلى خلال ورقة ترشيح حاوية على 10 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية، أخذ الراشح وتم تجفيفه عند درجة حرارة 50 م<sup>0</sup> في حمام مائي .

5- حفظت العينات في المجمدة لحين استخدامها في قياس تركيز الأفلاتوكسين بتقنية HPLC.

اجري فحص العينات في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا – دائرة البيئة والمياه باستخدام جهاز كرماتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي موديل ( سيكام - SYKAMN ) الماني المنشأ ، حيث استخدم الطور الناقل : اسيتونترايل : ماء مقطر ( 70 : 30 ) وكان عمود الفصل : ( C18 – ODS ) ( 25cm \* 4.6 mm ) لفصل السموم الفطرية واستخدم كاشف الفلورة ( ex=365nm , em= 445nm ) للكشف عن السموم الفطرية ، اذ كان سرعة جريان الطور الناقل هي : 0.7 ml / min

#### خامساً / قابلية المستحضر الحيوي للخرن

بعد الانتهاء من عملية إنتاج مسحوق المستحضر الحيوي الجاف تم خزنه في قناني نايلون (بولي اثلين) وفي ظروف المختبر ، وقدرت أعداد البكتيريا في الغرام الواحد بعد مرور شهرا واحد من الإنتاج ولقد كررت العملية بعد مرور (3) أشهر من إنتاج المستحضر الحيوي وبنفس الأسلوب الوارد سابقا وايضا كررت بعد مرور ستة أشهر (الاسدي، 2013 ; العاشور ،2005) .

### 6-2-3- التحليل الإحصائي

تم التحليل الإحصائي باستخدام تحليل التباين ANOVA وقورنت المتوسطات باستعمال اقل فرق معنوي L.S.D (Least significant Difference) وعلى مستوى احتمالية 0.05 ( الراوي.2000).

## النتائج والمناقشة Results and Discussion

### 4-1- عزل الفطريات

أوضحت نتائج دراسة عزل وتشخيص الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة والتي اخذت من سايلوات مختلفة لمحافظة كربلاء المقدسة الجدول (4-1) الحصول على 349 عزلة تمثلت بتسعة انواع ، تعود لخمس اجناس من الفطريات الخيطية، تمثلت بالاجناس *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Alternaria* ، *Fusarium* و *Talaromyces* ، أما الأنواع هي *A. flavus* ، *Alternaria alternate* ، *A. caespitosus* ، *A. tubingensis* ، *A. terrus* ، *A. niger* ، *F. equiseti* ، *P. camemberti* و *Talaromyces tiftonensi* اذ كانت عدد عزلات الفطر *Aspergillus spp.* هي الأكثر سيادة من بين الأنواع الفطرية المعزولة حيث بلغت 258 عزلة .

يتضح من الجدول (4-2) ظهور سلالات للنوع *A. flavus* و *A. niger* وتم ترميزها بالأرقام *A. flavus*1 ، *A. flavus*2 ، *A. flavus*3 ، *A. niger*1 ، *A. niger*2 ، و *A. niger*3 أظهرت نتائج العزل والتشخيص سيادة العزلات الفطرية *A. flavus* ، *A. niger* ، *A. terrus* ، *Alternaria alternate* و *F. equiseti* في جميع أنواع الحبوب المدروسة حيث سجلت أعلى نسبة ظهور 100% الجدول (4-2) . في حين كانت نسبة الظهور لباقي العزلات الفطرية *A. caespitosus* و *P. camemberti* هي 83.33 % ، أما باقي الاجناس *Talaromyces tiftonensis* و *A. tubingensis* فظهرت بنسبة 50.00 و 33.33 % على التتابع الجدول (4-2) .

العزلات الفطرية المشار إليها في الجدول (4-2) فقد كانت أعلى نسبة تردد للفطر *A. flavus*1 بنسبة 16.04 % يليه الفطر *A. flavus*2 بنسبة 11.17 % ، أما الفطر *A. niger*2 أحتل المرتبة الثالثة بنسبة تردد 9.74 % ، أما باقي العزلات الفطرية *A. terrus* ، *Alternaria alternate* ، *F. equiseti* ، *A. flavus*3 ، *A. niger*1 ، *P. camemberti* ، *A. caespitosus* ، *A. niger*3 و *Talaromyces tiftonensis* فكانت نسبة التردد 9.20 ، 8.30 ، 7.73 ، 7.20 ، 6.60 ، 6.01 ، 5.44 ، 5.20 ، 4.01 % على التتابع اما ادنى تردد فكانت للعزلة الفطرية *A. tubingensis* حيث سجل 3.43 % الجدول (4-2) .

تماثلت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الأسدي (2013) و Nyirahakizimana وآخرون (2013) حيث أكدوا ان الجنس *Aspergillus* هو السائد في الحبوب وان بعض أنواعه تستطيع النمو و انتاج السموم الفطرية، كذلك أوضحت دراسة Riba (2008) ان اكثر الاجناس المعزولة من حبوب الحنطة كانت الاجناس *Aspergillus* ، *Penicillium* ، *Fusarium* ، *Mucor* و *Alternaria* . بينما وجد Sad و Srpska (2013) أن الاجناس *A. niger* ، *A. flavus* ، و *Alternaria*

*alternate* كانت الأكثر انتشاراً في عينات حبوب الحنطة ، في حين أوضح الراوي وآخرون (2010) ان نسبة ظهور الفطر *A.niger* كانت أعلى من نسبة ظهور الفطر *A.flavus* المعزول من حبوب الذرة في محافظة الموصل .

تعود سيادة الجنس *Aspergillus* إلى متطلباته الغذائية البسيطة ، فضلاً عن قدرته العالية على إنتاج وحدات تكاثر لاجنسية وامتلاكه نظاماً متعدد الإنزيمات يسمح لها باستغلال مصادر غذائية مختلفة (العاني، 1998) . يتميز أيضاً بكفاءته العالية في الانتشار والنمو في الأوساط الغذائية وتكيفه مع العيش في مستوى رطوبة منخفض سواء كانت الرطوبة أثناء التخزين أو أثناء الحصاد (الساعدي، 2004) ، كما أنه يتحمل الجفاف وظروف الرطوبة العالية ( Abdullah و Al-Bader، 1990)، بالإضافة إلى مقاومته الشديدة للظروف المناخية الحرجة فإنه يستطيع تحمل درجات حرارة تصل إلى 50م<sup>0</sup> (Gabler وآخرون، 2004).

أظهرت دراسة Logrieco وآخرون (2003) ان الفطر *Alternaria* ينتج السموم الفطرية التي تضر بصحة الإنسان والحيوان ويمكن أن تتراكم هذه السموم في الحبوب، مما يؤدي إلى مخاطر صحية كبيرة عند الاستهلاك ، كما ان أنواع *Alternaria*، وخاصة *Alternaria alternata*، توجد بشكل متكرر في الحبوب مثل الحنطة والشعير والذرة . كما يمكن للفطر *Alternaria alternata* أن يتكاثر في ظل ظروف درجة الحرارة والرطوبة العالية أثناء التخزين ( Bottalico و Perrone ، 2002). يتحدد وجود الفطريات في الحبوب على العوامل البيئية مثل درجة الحرارة ، درجة الحموضة ونوع المادة الغذائية التي تدعم نمو الفطريات. اذ أوضح Ababutain ( 2011 ) أن درجة الحرارة والرطوبة من العوامل الحاسمة في نمو فطر *A. niger* . كما أوضح Nawar (2008) أن نمو الفطريات يرتفع مع زيادة الرطوبة النسبية ، في حين أن انخفاض الرطوبة يمنع نمو الفطريات . في حين اكتشف ALwakeel (2008) أن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطريات هي 30 م<sup>0</sup> ، ومع ذلك حدد AL-Garni وآخرون (2007) أن درجة الحرارة المثلى هي 25 م<sup>0</sup> .

جدول (1-4) العدد الكلي لمستعمرات الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة المخزونة

عدد المستعمرات المعزولة في مناطق مختلفة						العدد الكلي	الاجناس والانواع
عين التمر	الحسينية	سايلو4	سايلو3	سايلو2	سايلو1		
16	-	12	10	-	18	56	<i>A. flavus1</i>
15	-	-	11	13	-	39	<i>A. flavus2</i>
-	1	4	-	8	12	25	<i>A. flavus3</i>
3	6	5	-	6	3	23	<i>A. niger1</i>
5	3	-	10	7	9	34	<i>A. niger2</i>
-	5	7	6	-	-	18	<i>A. niger3</i>
3	5	9	7	5	3	32	<i>A.terrus</i>
-	4	-	-	8	-	12	<i>A.tubingensis</i>
2	2	7	5	3	-	19	<i>A. caespitosus</i>
3	4	8	4	7	3	29	<i>Alternaria alternate</i>
5	6	4	6	4	2	27	<i>F. equiseti</i>
2	-	4	7	3	5	21	<i>P. camemberti</i>
4	-	3	7	-	-	14	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
58	36	63	73	64	55	349	المجموع الكلي

جدول (2-4) النسب المئوية لظهور وتردد الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة المخزونة

النسبة المئوية للتردد	النسبة المئوية للظهور	الاجناس والانواع
16.04	66.67	<i>A. flavus1</i>
11.17	50.00	<i>A. flavus2</i>
7.20	66.67	<i>A. flavus3</i>
6.60	83.33	<i>A. niger1</i>
9.74	83.33	<i>A. niger2</i>
5.20	50.00	<i>A. niger3</i>
9.20	100	<i>A.terrus</i>
3.43	33.33	<i>A.tubingensis</i>
5.44	83.33	<i>A. caespitosus</i>
8.30	100	<i>Alternaria alternate</i>
7.73	100	<i>F. equiseti</i>
6.01	83.33	<i>P. camemberti</i>
4.01	50.00	<i>Talaromyces tiftonensis</i>

2-4- تشخيص الفطريات المنتجة للافلاتوكسين والمعزولة من حبوب الحنطة

1-2-4- التشخيص المظهري والمجهري

تم تشخيص الفطريات المعزولة حسب صفاتها المظهرية morphological characteristics مثل لون المستعمرة والنسجة والخصائص المجهرية microscopic characteristics وخاصة شكل الخيوط الفطرية ، الحامل الكونيدي ، الكونيدات ، الحوصلة ولون الكونيدات وغيرها عند زراعتها على وسط PDA ولمدة سبعة أيام وفي درجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup> وحسب المفاتيح التصنيفية المعتمدة .

## اولا : الفطر *A.flavus*

شخصت ثلاث سلالات مختلفة تعود لهذا النوع وقد تم تشخيص السلالات المختلفة على المستوى الجزيئي ورسم الشجرة الوراثية لكل منها، ايضا" تم تحديد الاختلافات بين السلالات الثلاثة الجدول (4-18).

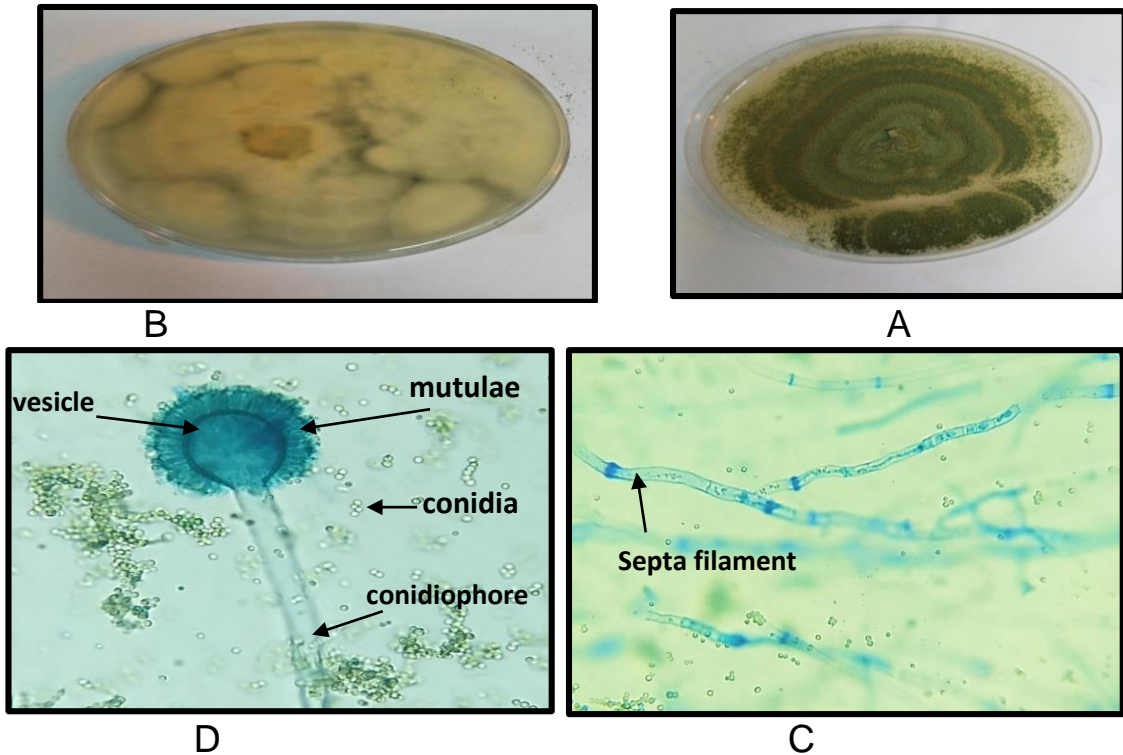
### صفات المستعمرة **Colony characters** :

يكون الفطر *A.flavus* مستعمرات مخملية معتدلة الكثافة متناثرة خضراء مصفرة اللون بحافات بيضاء على وسط PDA ، تبلغ اقطار المستعمرات 60-70 ملم خلال سبعة ايام وبدرجة حرارة 25-27 م° ، ظهر المستعمرة بني الى بني محمر الشكل (4-1) .

### الخصائص المجهرية **Microscopic morphology** :

الغزل الفطري مقسم ، الكونيدات صغيرة تكون كروية او شبه كروية محاطة بجدار سميك عادة خشن ونادرا املس (ناعم)، ذات لون أصفر واخضر تتحول الى اللون الرصاصي الغامق مع تقدم عمر المستعمرة تظهر المتبولات *Metulae* والفياليدات *Phialides* واضحة وأحيانا يمكن مشاهدة الفياليدات فقط الشكل (4-1) .

تماثلت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من (Moubasher، 1993؛ Payne و Scheidegger، 2003) .



شكل (4-1) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *A.flavus* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م° . A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) والخيوط الفطرية المقسمة D : صورة مجهرية (40x) الراس الكونيدي للفطر

## ثانيا : الفطر *A. niger*

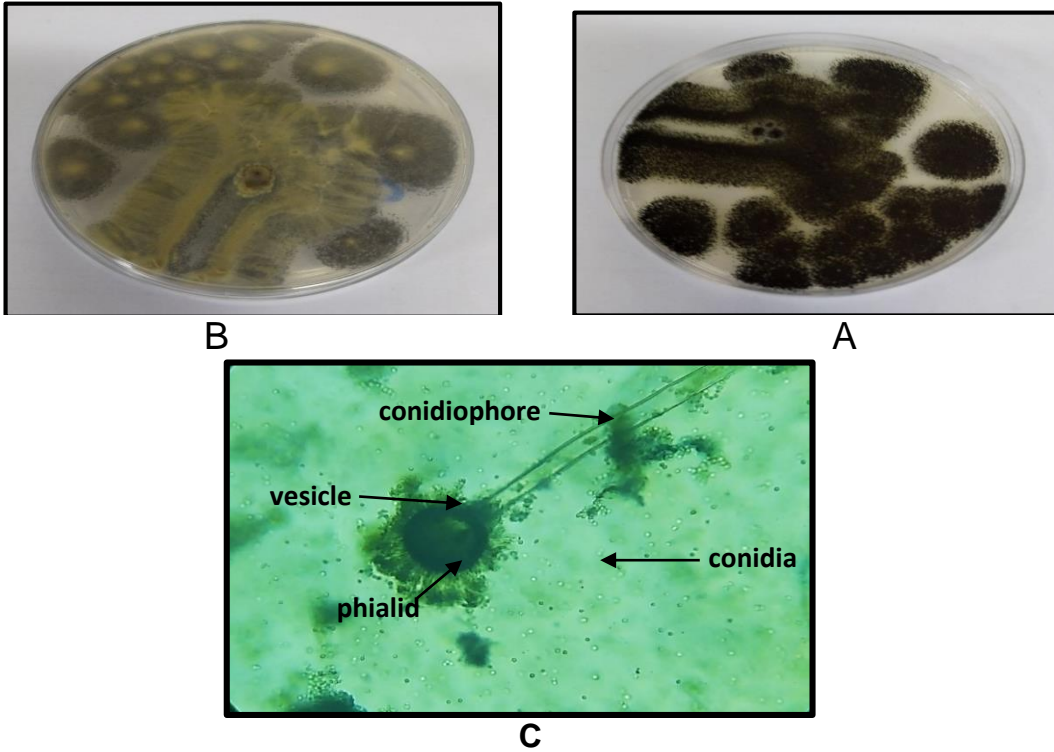
شخصت ثلاث سلالات مختلفة تعود لهذا النوع ، وتم تشخيص السلالات على المستوى الجزيئي ورسم الشجرة الوراثية لكل منها ، ايضا" تم تحديد الاختلافات بين السلالات الثلاثة الجدول (4-18) .

### صفات المستعمرة **Colony characters**:

ظهرت سلالات الفطر *A.niger* المزروعة على وسط PDA قطراً يبلغ 66-70 ملم خلال سبعة ايام وبدرجة حرارة 25 -27 م ° ، مع نمو أولي بلون ابيض والذي يكتسب مع مرور الوقت لوناً أسود بسبب إنتاج الكونيدات. اما ظهر المستعمرة عديم اللون إلى أصفر فاتح الشكل (4-2) .

### الخصائص المجهرية **Microscopic morphology** :

الغزل الفطري متفرع بغزارة شفاف ومقسم بحواجز ، الحامل الكونيدي طويل يصل طوله تقريبا 300-400 مايكرومتر، يحمل في طرفه حوصلات كروية ذات لون بني غامق إلى أسود ، تكون من النوع uniseriate يصل قطرها تقريبا 30-75 مايكرومتر ، الكونيدات كروية الشكل خشنة بشكل غير منتظم بقطر حوالي 3-5 مايكرومتر وهذا يتفق مع الباحثان Steinbach و Stevens (2003) ، الفيااليدات تغطي الحوصلة بالكامل والكونيدات كروية خشنة ذات لون بني غامق جدا الشكل (4-2) . اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من ( Cruz ، 2014 ؛ Vega ؛ اخرون، 2012؛ Silva ؛ اخرون 2011) .



شكل (2-4) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *A.niger* على وسط PDA

وبدرجة حرارة 25 -27 م ° . A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) للفطر

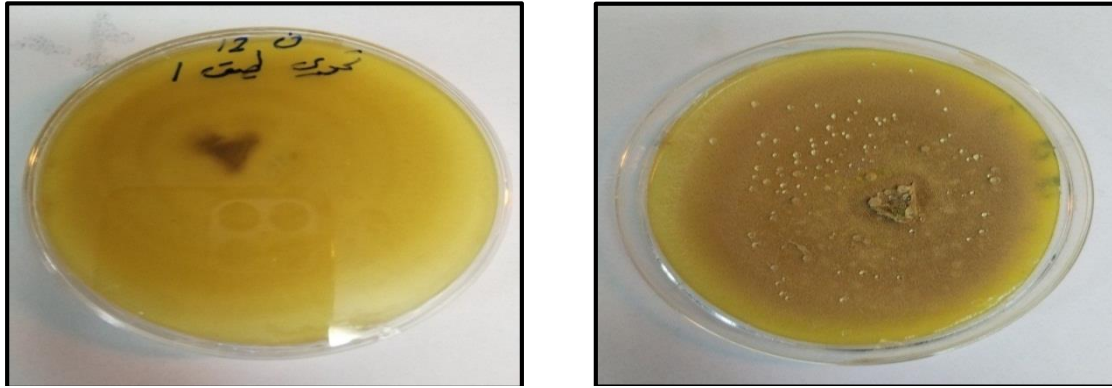
### ثالثا : الفطر *A. terreus*

#### صفات المستعمرة : Colony characters

نمت مستعمرة الفطر *A. terreus* بسرعة ، تظهر باللون البرتقالي إلى القرفة عند زراعتها على وسط PDA عند درجة حرارة 25-27 م° وأصبحت أكثر قتامة مع تقدم العمر، أما ظهر الطبق فظهر بلون أصفر فاتح الشكل (3-4) .

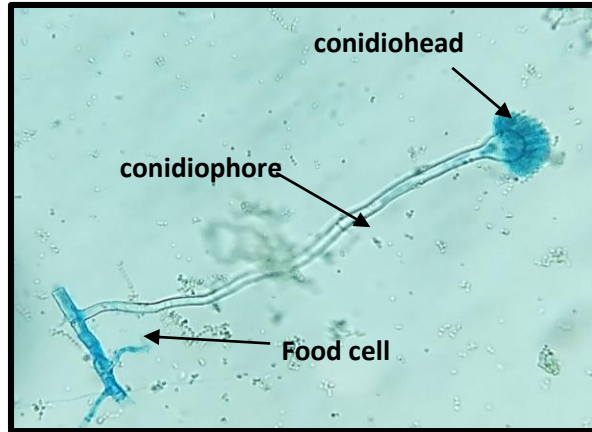
#### الخصائص المجهرية : Microscopic morphology

الخيوط الفطرية مقسمة ومتفرعة ، الحوامل الكونيدية طويلة، عديمة اللون، مع كونيديا مرتبة في صفين. الكونيدات صغيرة يبلغ قطرها حوالي 1.5-2.3 مايكرومتر، وهي كروية إلى بيضاوية ذات جدران ناعمة يتراوح لونها من الاصفر البراق الى الشفاف الشكل (3-4) .  
اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من (Cruz ، 2014 ؛ Louis واخرون، 2013؛ Balajee ، 2009) .



B

A



C

شكل (3-4) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *A. terreus* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م° : A : الجهة الامامية للطبق B : الجهة الخلفية للطبق C : صورة مجهرية (40x) للفطر

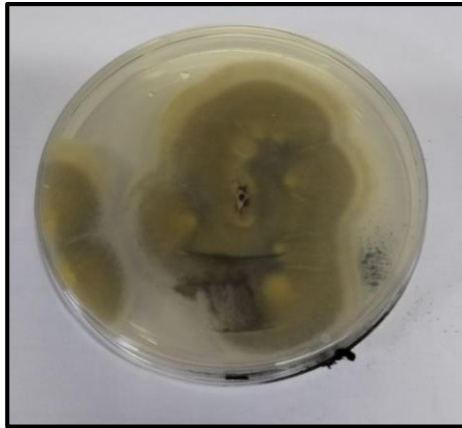
## رابعاً: الفطر *A. tubingensis*

### صفات المستعمرة *Colony characters*:

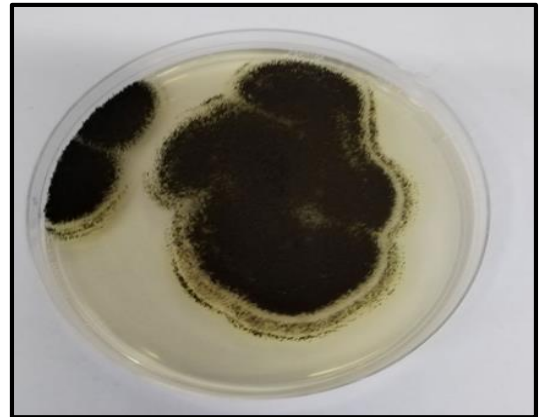
أظهرت المستعمرة الفطرية النامية على وسط PDA لون بني غامق مائلا الى السواد ومحاطه بهالة من النمو الأبيض وكانت تشبه الفطر *A.niger* ، اما الجهة الخلفية للطبق فظهرت المستعمرة بلون بني فاتح وذات شكل أملس .وقد بلغت اقطار المستعمرات تقريبا من 50-70 ملم و احيانا تغطي الطبق بالكامل عند درجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup> وخلال سبعة ايام من الحضانة شكل (4-4) .

### الخصائص المجهرية *Microscopic morphology*:

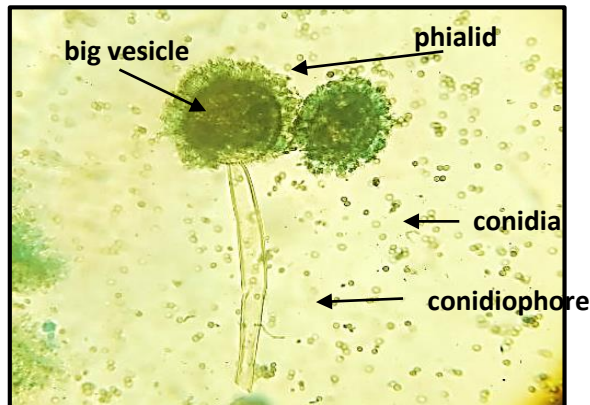
الغزل الفطري مقسم وغزير التفرع ، ظهرت الرؤوس الكونيدية محاطة بالفياثيدات ، الحويصلات كبيرة تقريبا ويبلغ متوسط قطر الحويصلات 8-21 مايكرومتر ، والكونيديا كروية الشكل ملساء وسوداء اللون ويبلغ قطرها 3-5 مايكرومتر ، اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به (Silva واخرون، 2011؛ Abdel-Motaal واخرون، 2021) .



B



A



C

شكل (4-4) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *A. tubingensis* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup>. A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) الراس الكونيدي

## خامسا: الفطر *A.caespitosus*

### صفات المستعمرة : Colony characters

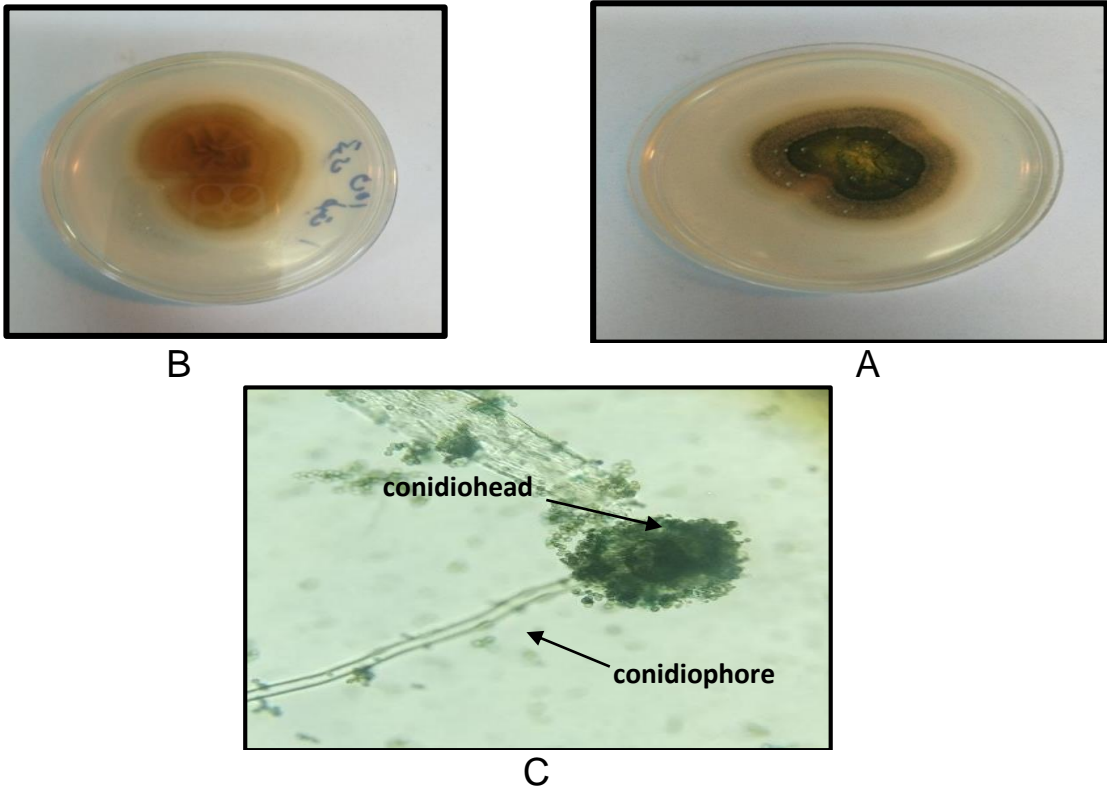
بلغ قطر المستعمرة على وسط PDA 22-25 ملم في غضون 10 أيام عند درجة حرارة 27 م° ، المستعمرة ذات لون أخضر باهت او أخضر زيتوني ، تنتج المستعمرة إفرازات بشكل قطيرات كثيفة عديمة اللون، أما ظهر المستعمرة فتميز بصبغة برتقالية باهتة شكل(4-5) .

### الخصائص المجهرية : Microscopic morphology

يمتلك الفطر رؤس كونيديية conidial heads مخروطية الشكل أو عمودية فضفاضة ذات لون أصفر مشمشي ، المايسيليوم mycelium لامع بلون بني محمر ، أما ظهر الطبق كان عديم اللون الى بني محمر لامع ، الحويصلات vesicles كروية الى شبه كروية ، الفرشاة ثنائية التفرع biseriata ، المتيولات من 1-3 اعلى الحوصلة ، الفياليات phialides تبلغ 3.7 مايكرومتر ذات شكل قاروري ، الكونيدات كروية الى شبه كروية شكل(4-5).

اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل

من (Al-Doory وآخرون، 1959؛ Domsch وآخرون، 1980؛ Scott وآخرون، 2000) .



شكل (4-5) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *A. caespitosus* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25 - 27 م° . A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) للفطر

سادسا: الفطر *P.camemberti*

صفات المستعمرة **Colony characters**:

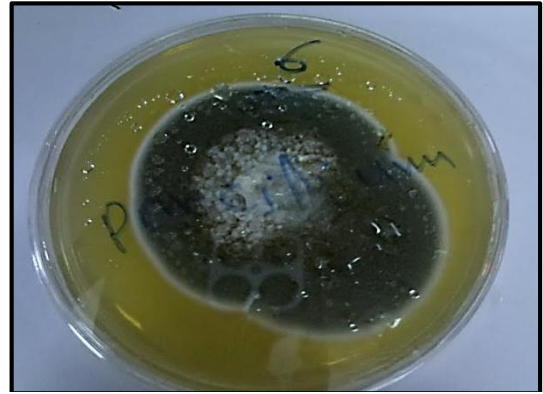
نمت المستعمرة على وسط PDA بشكل سريع بلغ قطرها 60-80 ملم واحيانا تغطي الطبق بالكامل عند درجة حرارة 25-27م° وخلال سبعة ايام ، أعطت العزلة على الوسط شكل مخملي وتميزت المستعمرة بلون زيتوني داكن مع حافات بيضاء اما قاعدة المستعمرة فظهرت بلون اصفر غامق الشكل (4-6).

**الخصائص المجهرية Microscopic morphology**:

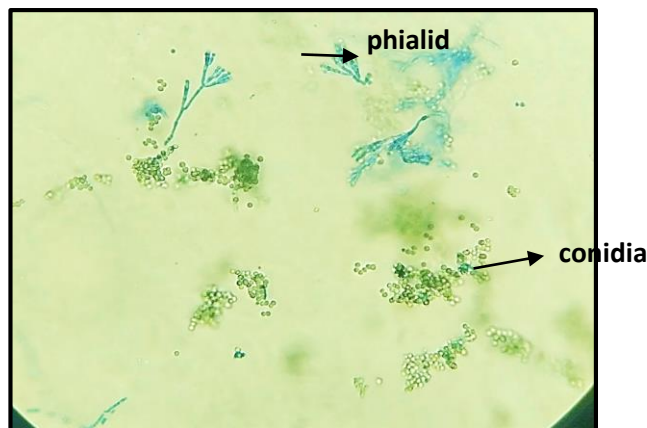
الخيوط الفطرية متفرعة ومقسمة بحواجز ، الحوامل الكونيدية متفرعة وتنتهي بأفرع قصيرة يطلق عليها اسم الفريعات التي تنشأ منها الفيااليدات phialids ، الكونيدات بيضوية الى شبه كروية الشكل وذات لون اصفر منتظمة على شكل سلاسل غير متفرعة على قمة الفيااليد phialid وهذه الصفات تتطابق مع ما ذكره ( Pitt, 1988; larone, 1996 ).



B



A



C

شكل (4-6) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *P.camemberti* وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م°. A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) للفطر

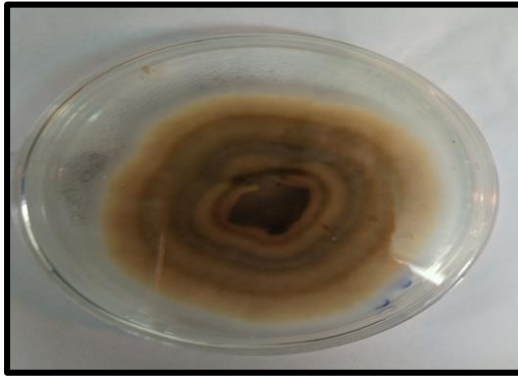
سابعا" : الفطر *Alternaria alternata*

صفات المستعمرة **Colony characters**:

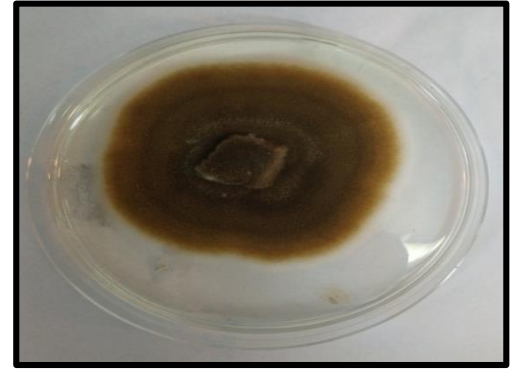
بلغ قطر المستعمرة على وسط PDA تقريبا" من 50-70 ملم واحيانا تغطي الطبق بالكامل عند درجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup> وخلال سبعة ايام ، تمتاز بكونها كثيفة الوفرة ذات لون بني زيتوني او رمادي ، ظهر الطبق بني غامق او اسود شكل (4-7) .

**الخصائص المجهرية Microscopic morphology :**

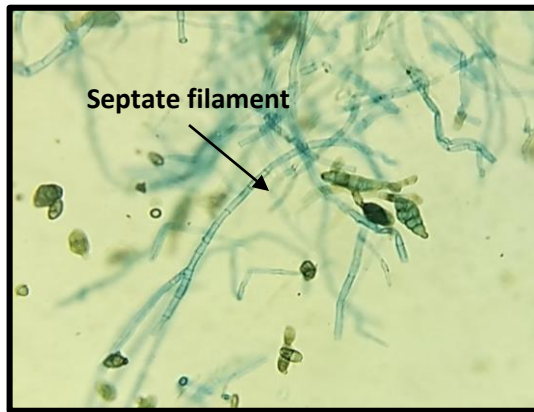
الغزل الفطري مقسم ، تنتظم الكونيدات بشكل سلاسل طويلة على حوامل قصيرة ومتفرعة بشكل غير منتظم ، قد تصل الكونيدات الى عشرة وحدات ، تمتاز الكونيدات بكونها مقسمة طوليا وعرضيا ذات شكل كمثري مستدق عند القمة ويبلغ قطرها 20-40 مايكرومتر .  
اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من ( Webb وMundt , 1978 ; Wouden berg واخرون , 2015 ; Simmons , 2007) .



B



A



C

شكل (4-7) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *Alternaria alternata* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup> . A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية (40x) الكونيدات

ثامنا": الفطر *F. equiseti*

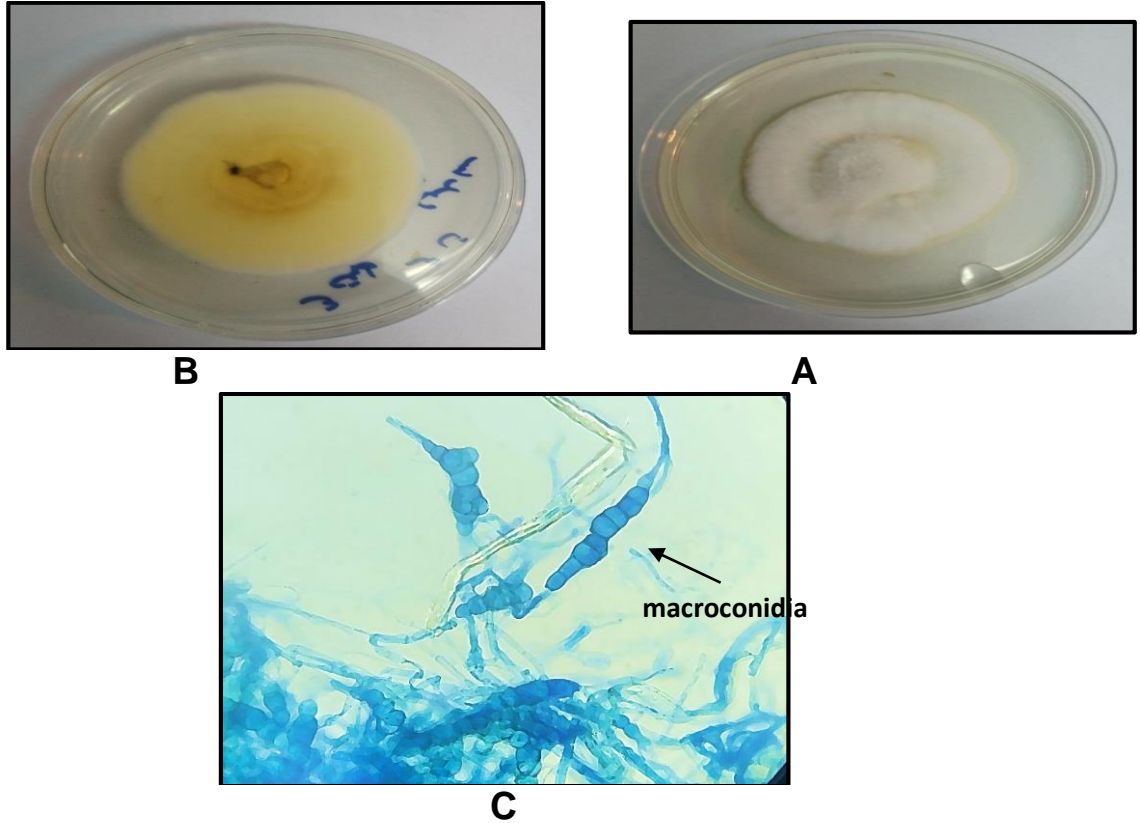
### صفات المستعمرة :Colony characters

امتازت المستعمرات على وسط PDA بنمو وبري كثيف باللون الابيض او الكريمي يتحول مع تقدم العمر الى اللون البني وبمراكز ذات لون برتقالي ، اما ظهر المستعمرات فقد كان باللون الأصفر الفاتح ، بلغت اقطار المستعمرات 5-6 سم خلال 7 ايام بدرجة 27-30 م<sup>0</sup> ، كانت المستعمرات سريعة النمو عند درجة 30 م<sup>0</sup> ولم يظهر أي نمو عند درجة 37 م<sup>0</sup> الشكل ( 4-8 ) .

### الخصائص المجهرية : Microscopic morphology

ينتج الفطر كونيدات macroconidia بلغت اقطارها حوالي 10-19 مايكروميتر وتمتاز بالاستطالة مع انحناء في الخلايا القمية ، الخيوط الفطرية مقسمة ، الحوامل الكونيدية ذات اشكال غير محددة ، كما امتاز الفطر بإنتاجه للسبورات الكلاميدية التي بلغت اقطارها 8-9 مايكروميتر الشكل ( 4-8 ) .

اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من Hocking و Andrews ، 1987 ؛ Hestbjerg و اخرون ( 2002 ) .



شكل(4-8) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *F. equiseti* على وسط PDA ودرجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup> : A : الجهة الامامية للطبق B : الجهة الخلفية للطبق C : صورة مجهرية(40x) الكونيدات الكبيرة

## تاسعا: الفطر *Talaromyces tiftonensis*

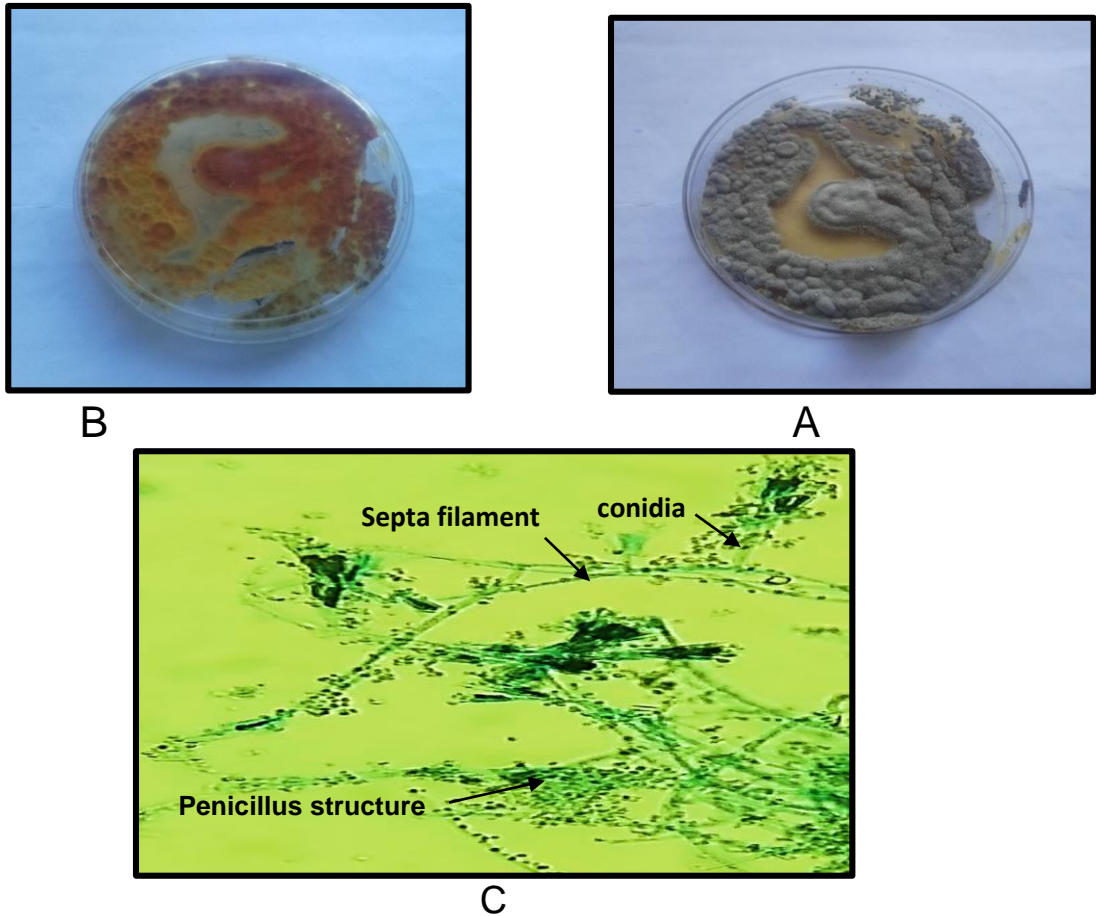
### صفات المستعمرة :Colony characters

امتازت مستعمرات الفطر عند درجة حرارة 25 م<sup>0</sup> بأنها سريعة النمو ، لونها أبيض مع رؤوس مخروطية خضراء زيتونية . أما قاعدة المستعمرة فظهرت بلون أصفر تحول تدريجيا" الى اللون البرتقالي الشكل (9-4) .

### الخصائص المجهرية : Microscopic morphology

الفطر يشبه الفطر *penicillium* ، الخيوط الفطرية قصيرة ومفصولة ومتفرعة وتنتج تفرعات قصيرة تحمل في نهايتها تراكيب تدعى *Penicillus structure* والكونيدات تكون بيضوية او كروية الشكل وذات جدران رقيقة ، وبلغت اقطار المستعمرات 6-7 سم خلال سبعة أيام بدرجة 27-30 م<sup>0</sup> ، الشكل ( 9-4 ) .

اتفقت نتائجنا في وصف صفات المستعمرة وخصائصها المجهرية مع ما جاء به كل من (Yilmaz واخرون، 2016، Jurjević و Peterson، 2017) .



شكل(9-4) الصفات المظهرية والمجهرية للفطر *Talaromyces tiftonensis* على وسط PDA وبدرجة حرارة 25-27 م<sup>0</sup>. A: الجهة الامامية للطبق B: الجهة الخلفية للطبق C: صورة مجهرية للفطر(40x)

#### 4-2-2- الكشف عن قدرة العزلات الفطرية على إنتاج الأفلاتوكسين B<sub>1</sub>

استخدمت تقنيات مختلفة في الكشف عن قدرة عزلات الفطريات المدروسة على إنتاج الأفلاتوكسين

وهي:

اولا/ طريقة الأمونيا

أظهرت نتائج هذا الاختبار باستعمال وسط جوز الهند والامونيا قدرة 9 اجناس من الفطريات المعزولة من أنواع مختلفة من حبوب الحنطة والتي تمثلت بـ *A. flavus*, *A. niger* ، *Alternaria* ، *P. camembert* ، *A. caespitosus*، *A.tubingensis*، *A.terrus* و *F. equiseti*، *alternate* و *Talaromyces tiftonensis* على إنتاج الأفلاتوكسينات إذ ظهر تغير واضح في لون قواعد المستعمرات وظهور اللون الأحمر وبدرجات مختلفة .

ان التدرج في اللون يعود ربما إلى اختلاف قدرة العزلات على إنتاج الأفلاتوكسينات فالعزلات الفطرية الأكثر إنتاجا" للسمية هي الأكثر تغيرا في لون قاعدة المستعمرة ، هذا يتفق مع ما ذكره كل من (علي ، 2017) و(الاسدي، 2023) عند اجراء الاختبار نفسه ، إذ اوضحت هذه الدراسات أن درجة اللون الأحمر تعود إلى الكميات المنتجة من الأفلاتوكسينات فالعزلة ذات اللون الاحمر الغامق تدل على قدرتها في إنتاج كميات أكبر من العزلات التي تكون قواعد مستعمراتها حمراء فاتحة او وردية . اما العزلات الاخرى غير المنتجة للأفلاتوكسينات فأنها غير قادرة على إنتاج السموم قد يعود السبب إلى المنافسة الحيوية بين العزلات الفطرية (Cotty و Bayman ، 1993) . او وجود اخطاء تحدث اثناء الكشف بوسط جوز الهند والامونيا قد [تصل إلى 8% ( Kumar و اخرون ، 2007) ، اذ اختبر Yazdani و اخرون ( 2010 ) قدرة الفطرين *A.flavus* و *A.niger* على إنتاج الأفلاتوكسينات في وسط جوز الهند والامونيا و اعطى هذا الوسط نتائج سلبية لكلا الفطرين ، اذ ذكر إن وسط جوز الهند لا يمكن الاعتماد عليه في الكشف عن الأفلاتوكسينات بسبب الحساسية العالية للفطر *Aspergillus* لمكونات هذا الوسط. كما وجدت دراسة Abdel-Hadi و اخرون (2011) ان 5 عزلات من بين 18 عزلة للفطر *A.flavus* كانت غير قادرة على إنتاج الأفلاتوكسينات اما عند استخدام طريقة PCR التي اثبتت ان جميع العزلات كانت منتجة للأفلاتوكسينات .

يتضح بهذه النتيجة عدم كفاءة هذا الوسط في الكشف عن سموم الافلا حيث جاءت هذه الدراسة

متوافقة مع ما توصل اليه الاسدي (2023) اذ اوضحت قدرة بعض عزلات الفطر *Aspergillus spp* المعزولة من أنواع المكسرات والحبوب على إنتاج الأفلاتوكسينات .

توافقت النتائج أيضا" مع ما توصل اليه الباحث Balina و اخرون (2018) ان جنس

*Aspergillus* وخاصة *A.flavus* و *A.parasiticus* هي ابرز الأنواع التي تفرز الأفلاتوكسين ، كما ان الفطر *Alternaria* يتميز بقدرته على افراز انواع مختلفة من السموم ( Thomma ، 2003)

## ثانيا/ الكشف باستخدام طريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC)

أوضحت نتائج الكشف الكيمياوي باستعمال تقنية الصفائح الرقيقة (TLC) قدرة 13 عزلة فطرية والمعزولة من حبوب الحنطة والتي تمثلت بـ *A. tubingensis*، *A. terrus* ، *A. flavus*, *A. niger*، *F. equiseti*، *Alternaria alternate*، *P. camembert* ، *A. caespitosus*، و *Talaromyces tiftonensis* على انتاج الافلاتوكسين B<sub>1</sub> وذلك بظهور بقع ذات تآلق أزرق عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UV) و هذا يتطابق تماماً مع لون و معامل جريان البقع لسم الأفلا B<sub>1</sub> القياسي . وظهر تباين في شدة التآلق للعزلات المختلفة مما يدل على اختلاف قابلية العزلات في انتاجها الكمي للافلاتوكسين B<sub>1</sub> ، ويرجع سبب الاختلاف في قابلية العزلات على انتاج سم الافلا كماً ونوعاً الى جينات الفطر المتخصصة في تشفير الانزيمات المسؤولة عن تكوين وتخليق السم ( Scherm واخرون ،2005) ، كما ان للمادة الاساس علاقة كبيرة بتخليق سم الافلا اذ كلما احتوت المادة الاساس على تراكيز عالية من الكربوهيدرات والاحماض الدهنية فأنها تعزز من انتاج سم الافلا (Arseculeratne واخرون 1969 ) . وهذه النتيجة مقاربة لما وجدته الاسدي (2023) والساعدي (2012) على قدرة بعض العزلات الفطرية على انتاج الافلاتوكسين B<sub>1</sub> باستعمال تقنية TLC.

## ثالثا/ تقدير تركيز سم الافلا B<sub>1</sub> للعزلات الفطرية المعزولة من حبوب الحنطة بتقنية HPLC

أظهرت نتائج التقدير الكمي بتقنية الكروماتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC جدول (3-4) ان عزلة الفطر *A. flavus*1 كانت اكثر عزلة منتجة لسم الافلاتوكسين B<sub>1</sub> وبتركيز 215.9 ppb الشكل(4-10) تلاها الفطر *A. niger*3 بتركيز 184.9 ppb الشكل (4-11) ، جاء بالمرتبة الثالثة الفطر *A. flavus*3 بتركيز 162.5 ppb الشكل (4-12) ، ثم العزلات *A. flavus*2 بتركيز 156.9 ppب الشكل (4-13) ، بتركيز 155.8 ppb الشكل(4-14) ، *Alternaria alternate* بتركيز 145.9 ppb الشكل (4-15) ، ثم *A. niger*2 و *A. tubingensis* بتركيز (124.6 و 114.5) ppb الشكل (4-16)(4-17) في حين كانت نتائج التقدير الكمي للافلاتوكسين للعزلات *A. terrus* بتركيز 90.5 ppb الشكل (4-18) ، *A. caespitosus* بتركيز 44.9 ppb الشكل ( 4-19) ، *F. equiseti* بتركيز 41.3 ppb الشكل ( 4-20) و *Talaromyces tiftonensis* بتركيز 35.61 ppb الشكل (4-21) ، اما اقل عزلة منتجة للافلاتوكسين B<sub>1</sub> كانت *A. niger*1 بتركيز 30.5 ppb الشكل (4-22) . الشكل رقم (4-23) يوضح تركيز السم القياسي لسم الافلاتوكسين المحقون أولاً في جهاز HPLC والمعتمد عليه في قراءة تراكيز المعاملات كما هو واضح عند تركيز 5 ppb .

جدول (3-4) نسبة تركيز سم الافلاتوكسين B1 بتقنية HPLC

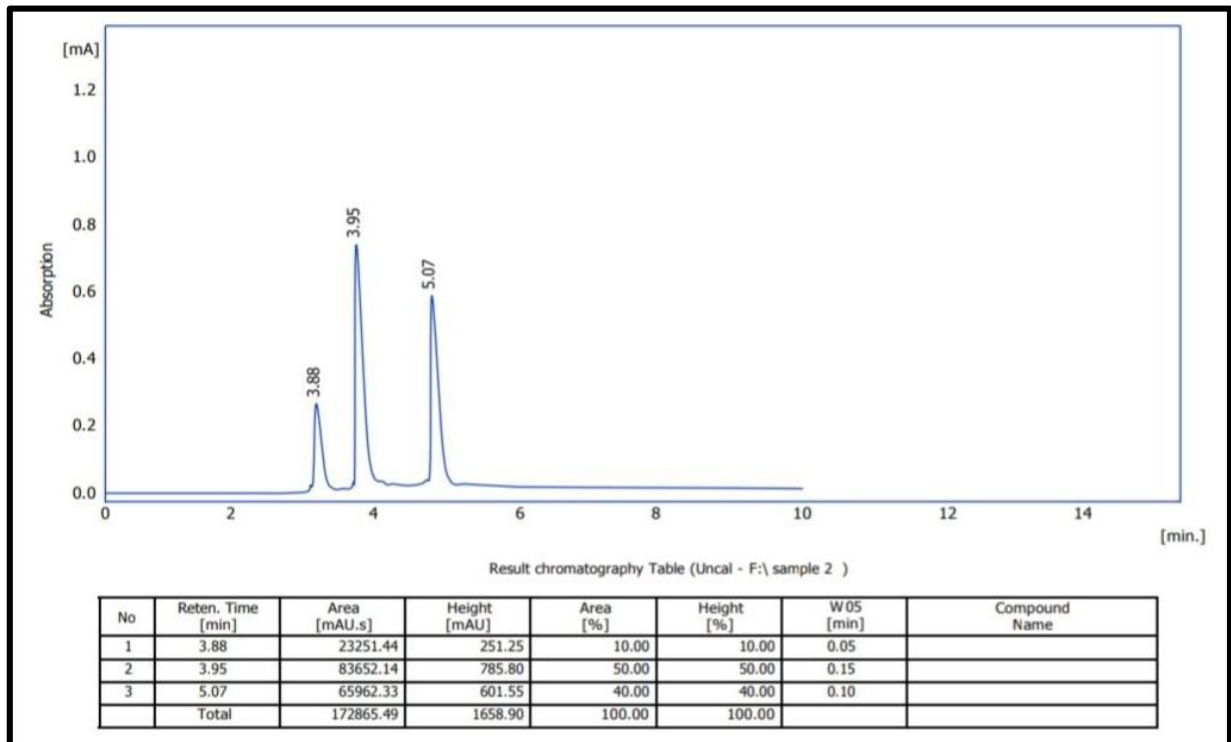
تركيز الافلاتوكسين B1 (ppb)	النوع الفطري	تركيز الافلاتوكسين B1 (ppb)	النوع الفطري
114.5	<i>A.tubingensis</i>	215.9	<i>A. flavus1</i>
44.9	<i>A.caespitosus</i>	156.9	<i>A. flavus2</i>
145.9	<i>Alternaria alternate</i>	162.5	<i>A. flavus3</i>
41.3	<i>F. equiseti</i>	30.5	<i>A. niger1</i>
155.8	<i>P. camemberti</i>	124.6	<i>A. niger2</i>
35.61	<i>Talaromyces tiftonensis</i>	184.9	<i>A. niger3</i>
		90.5	<i>A.terrus</i>

يعد الفطر *Aspergillus spp.* احد الفطريات التي لها القدرة العالية على انتاج سم الافلا وبتراكيز عالية تصل إلى (PPb740-18.6) (الراوي،2017) والسبب يعود إلى قدرته العالية على النمو في بيئات مختلفة وبمديات حرارة و رطوبة مختلفة فضلا عن قدرته التثبيطية العالية لباقي الأنواع الفطرية وكذلك منافسته على الغذاء ، ويتميز بسرعة انتشاره مقارنة مع باقي الأنواع في مختلف الظروف والبيئات (الاسدي،2023). كما ان للفطر القدرة على انتاج إنزيم الألفا أميليز a- amylase الذي يلعب دورا مهماً في تحفيز البناء الحيوي للافلاتوكسين (Woloshuk، 1997) .

ان انتاج السموم الفطرية ومنها الافلاتوكسينات يرتبط بصورة عامة بعوامل بيئية تشمل درجة الحرارة والاس الهيدروجيني والنشاط المائي ، وعندما تكون هذه العوامل

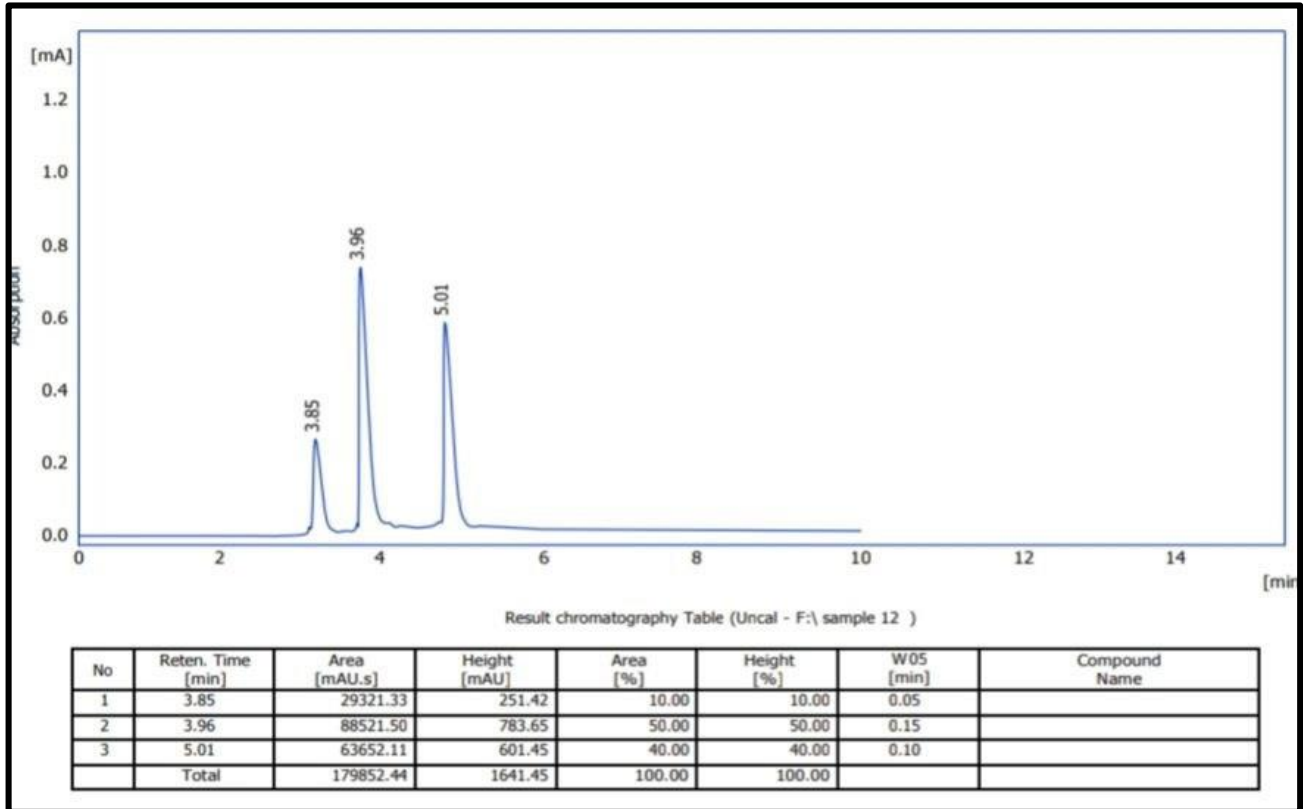
مناسبة لنمو الفطر المنتج للسموم فهذا يعني امكانية انتاجه للسموم بصورة جيدة (Bayman وآخرون، 2002) ، كما إن جينات البناء الحيوي للسموم الفطرية ممكن أن تكون فعالة أو غير فعالة اعتمادا على الظروف البيئية (Mayer و Geisen، 2003) ، فقد اشار Thalij وآخرون (2021) ارتفاع تركيز الافلاتوكسين B1 مع زيادة درجة الحرارة والرطوبة النسبية في ثلاثة انواع من المحاصيل الاقتصادية وهي الحنطة والرز والذرة المأخوذة من سايلاوات مختلفة لمحافظة صلاح الدين .

توافقت نتائج الدراسة مع نتيجة دراسة El Khoury و Atoui (2010) اذ وجدت ان نسبة 40-25 % من الحبوب تتلوث سنويا بمستويات عالية من السموم الفطرية . توافقت الدراسة أيضا" مع دراسة الفيتوري وآخرون (2015) اذ وجد ان الاجناس الفطرية المعزولة من حبوب الحنطة والاكثر شيوعا كانت جنس *Aspergillus spp.* يليه الاجناس *Fusarium* ، *Alternaria* و *Rhizopus* بنسب اقل . كما اشار Haggag وآخرون (2014) أن نفس النوع من جنس *Aspergillus* ينتج الأفلاتوكسين ولكن بكميات مختلفة .

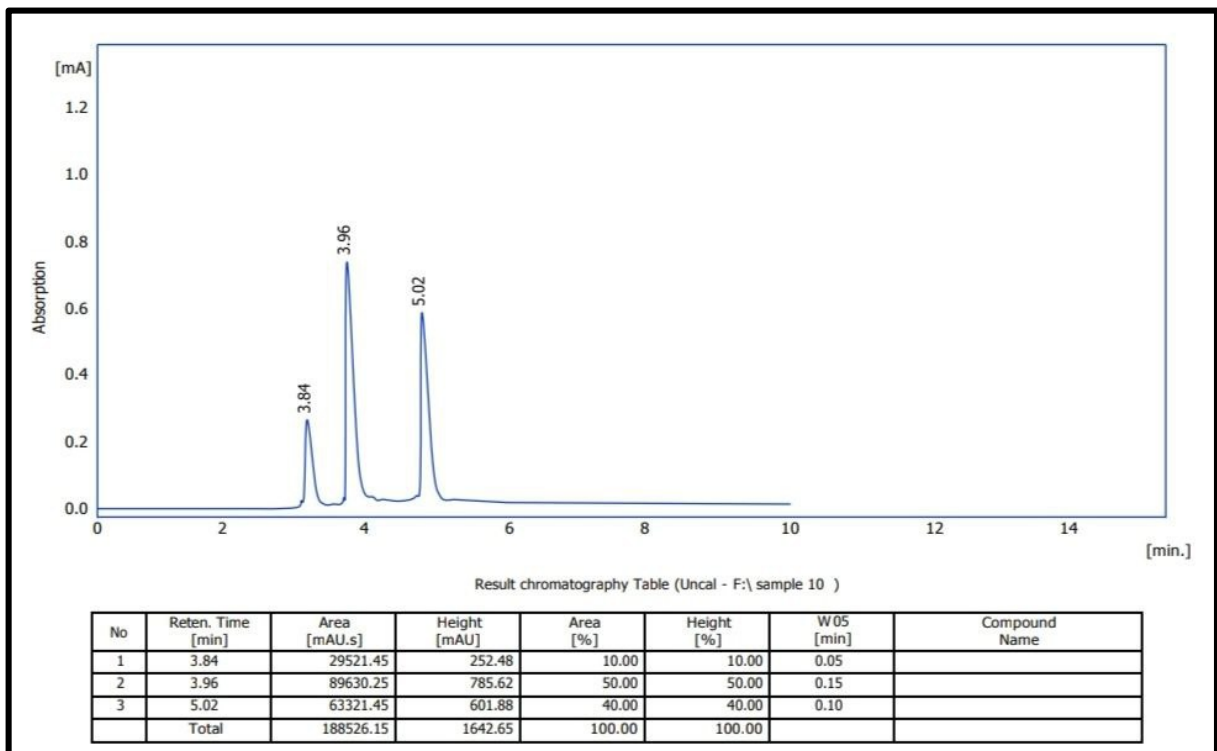


شكل (4-10) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. flavus1*

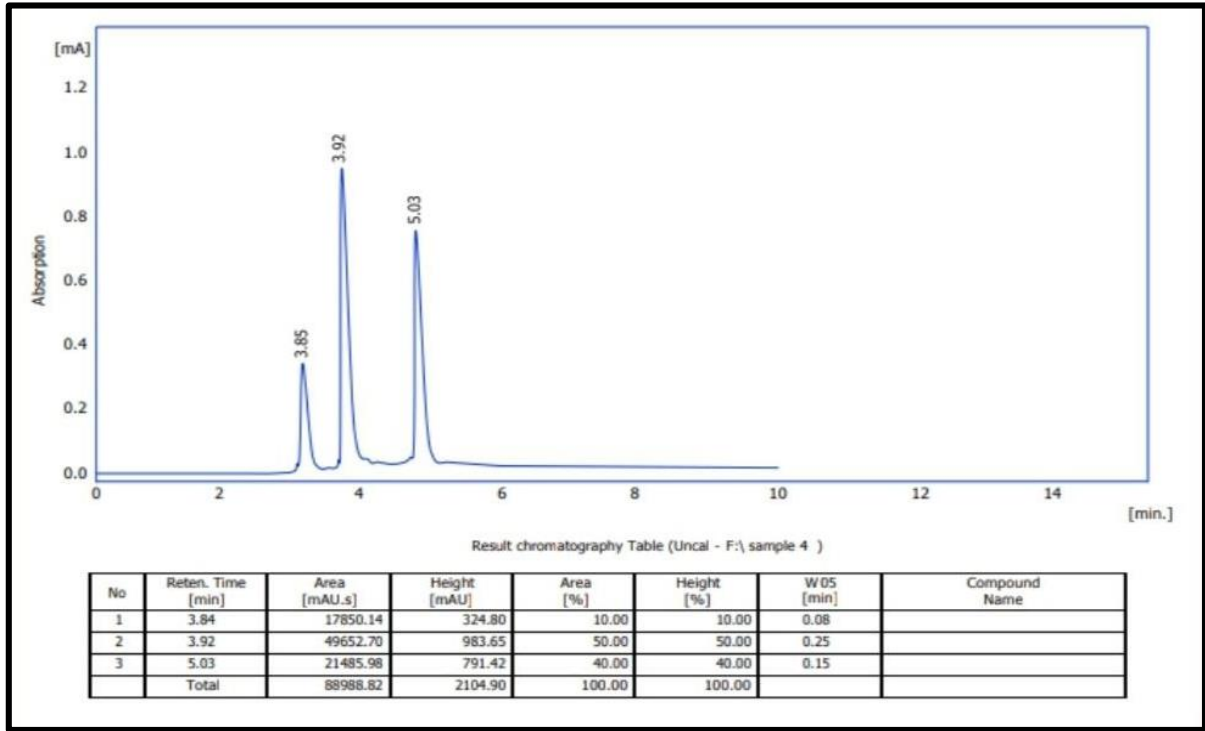
بواسطة HPLC



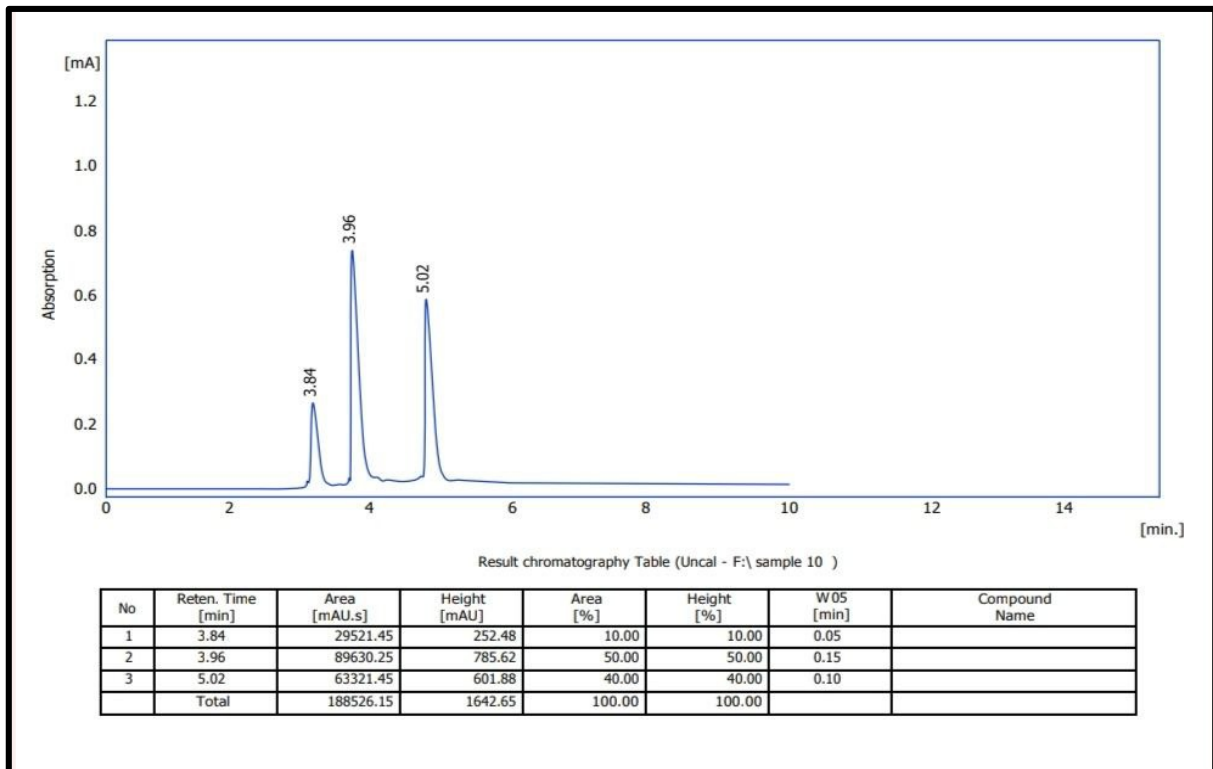
شكل (4-11) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. niger*3 بواسطة HPLC



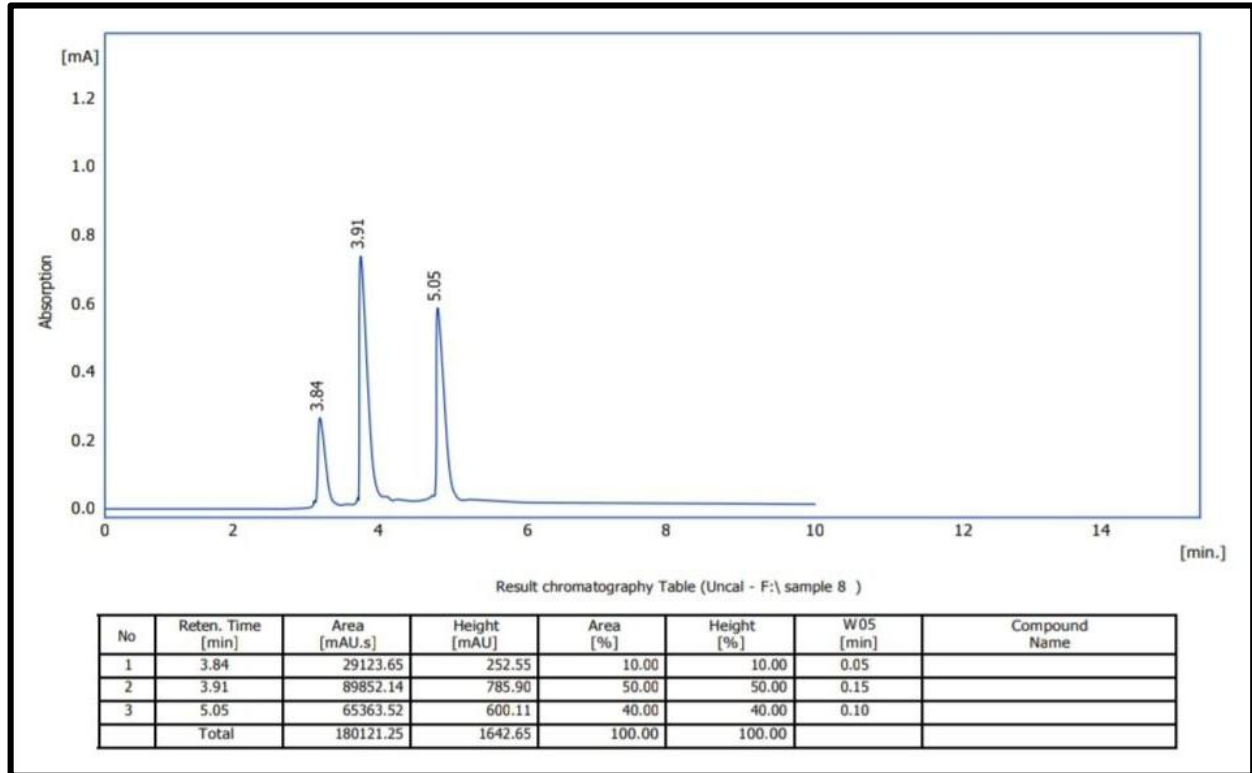
شكل (4-12) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. flavus*3 بواسطة HPLC



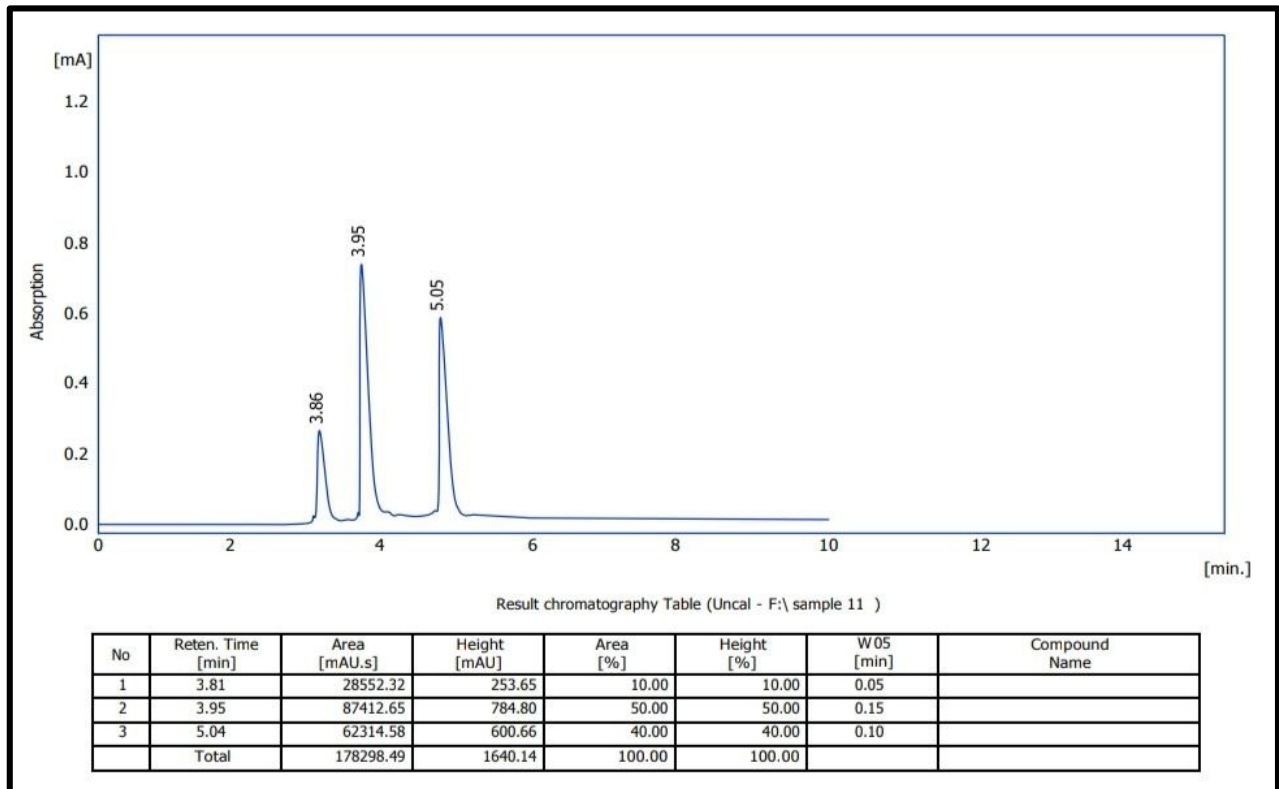
شكل (13-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. flavus2* بواسطة HPLC



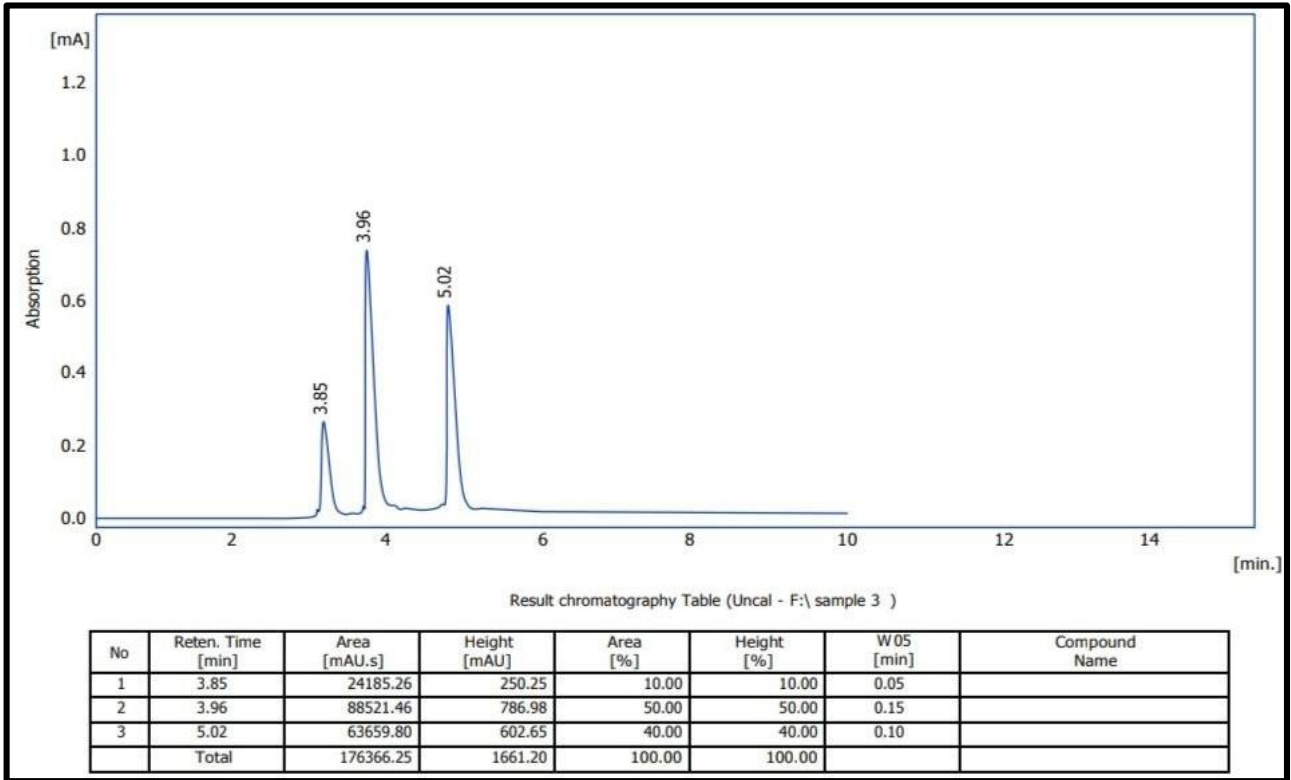
شكل (14-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *p.camembeti* بواسطة HPLC



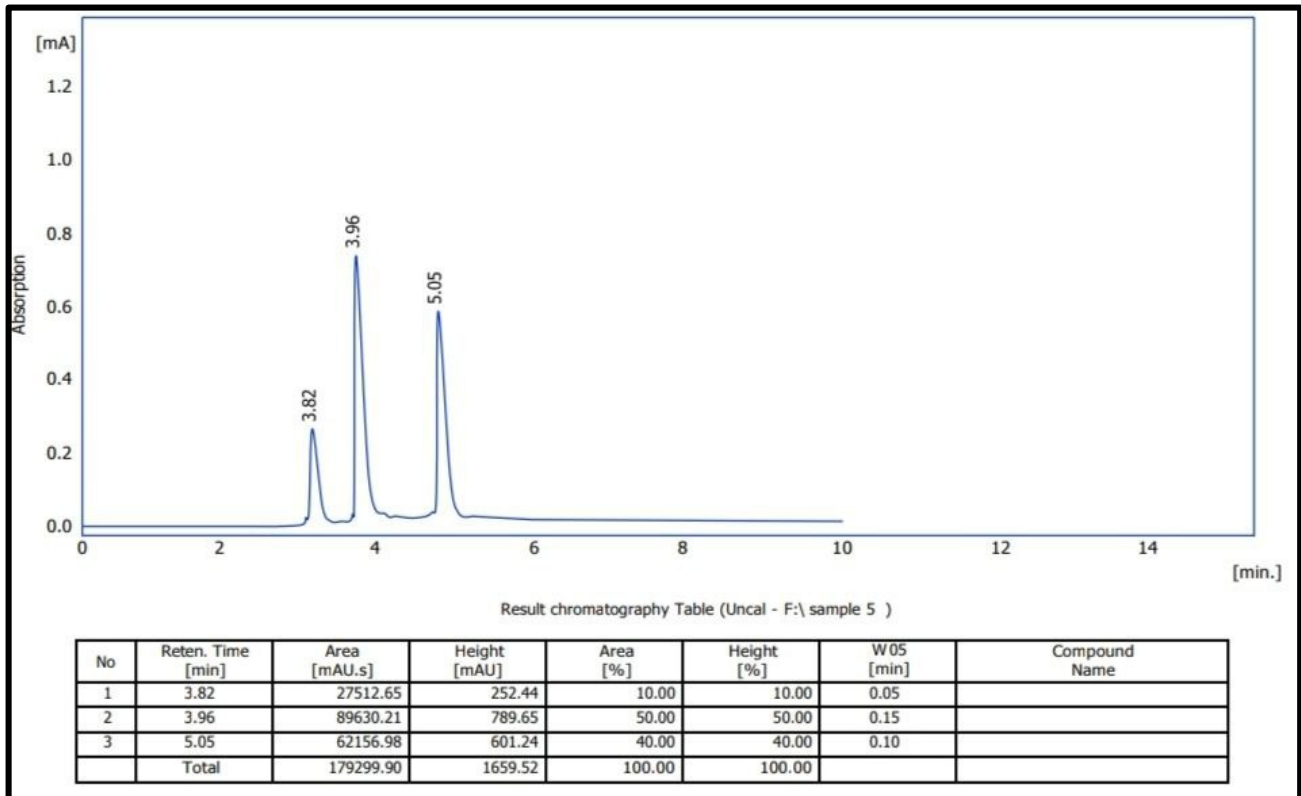
شكل (15-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *Alternaria alternata* بواسطة HPLC



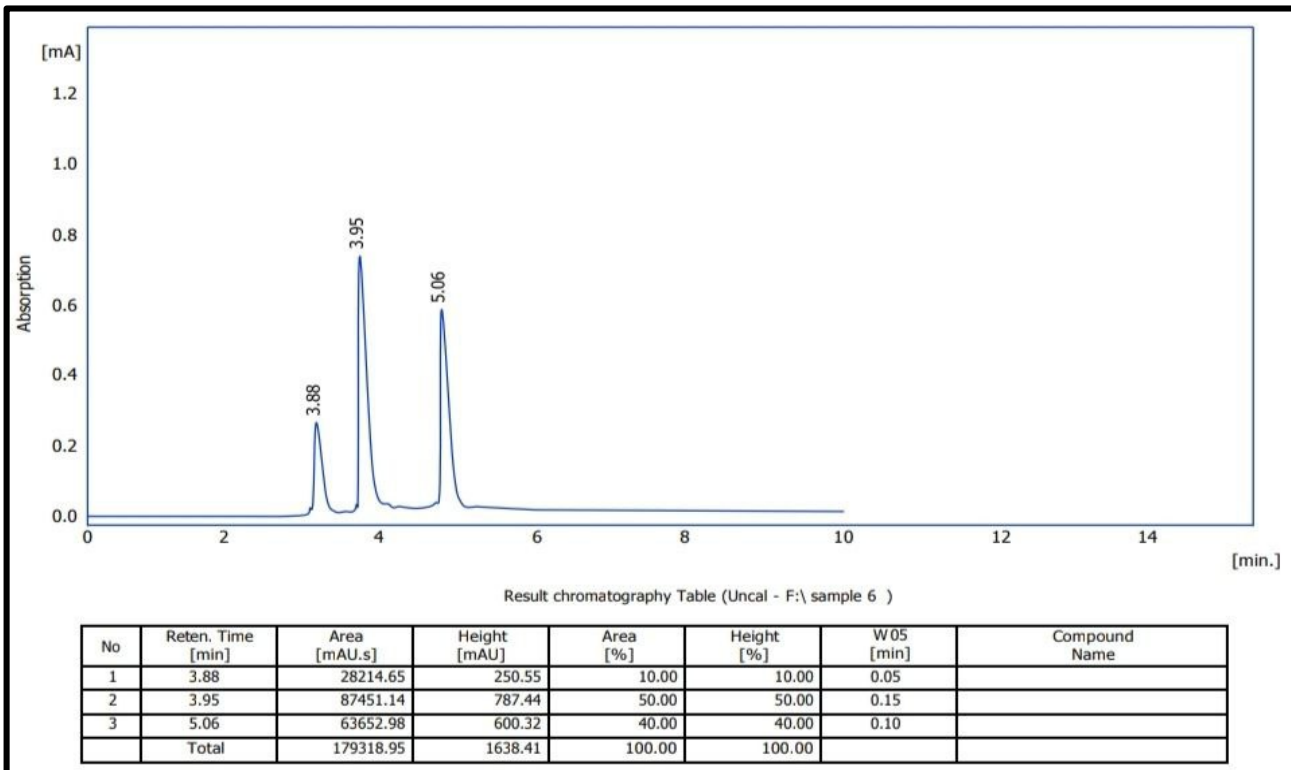
شكل (16-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. niger*2 بواسطة HPLC



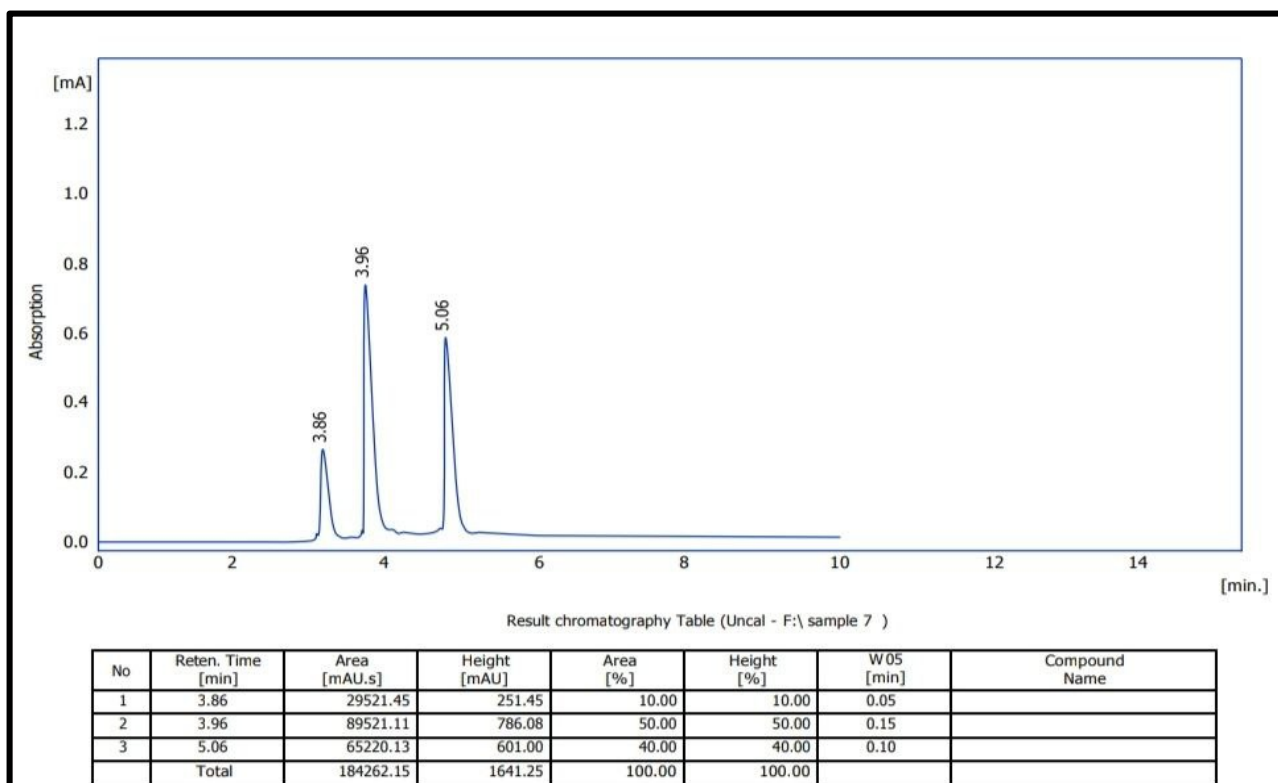
شكل (17-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الأفلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A.tubingensis* بواسطة HPLC



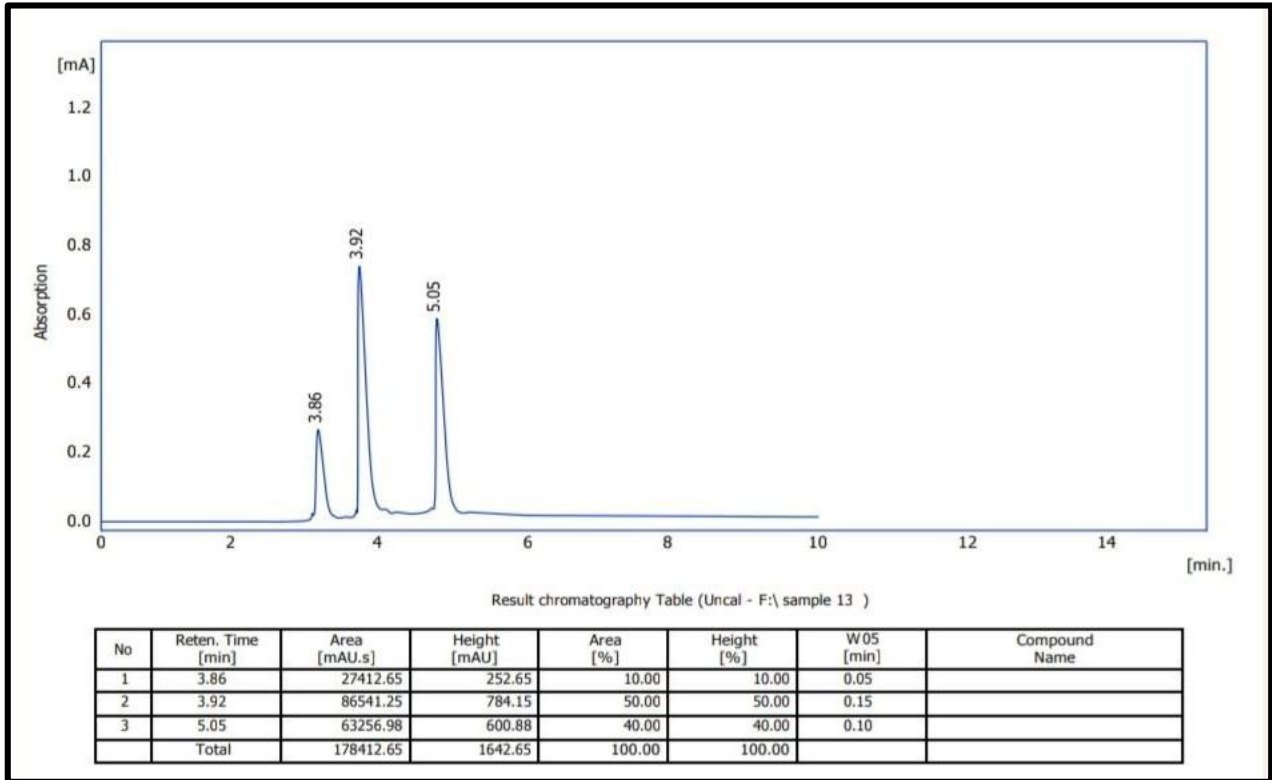
شكل (18-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الأفلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A.terrus* بواسطة HPLC



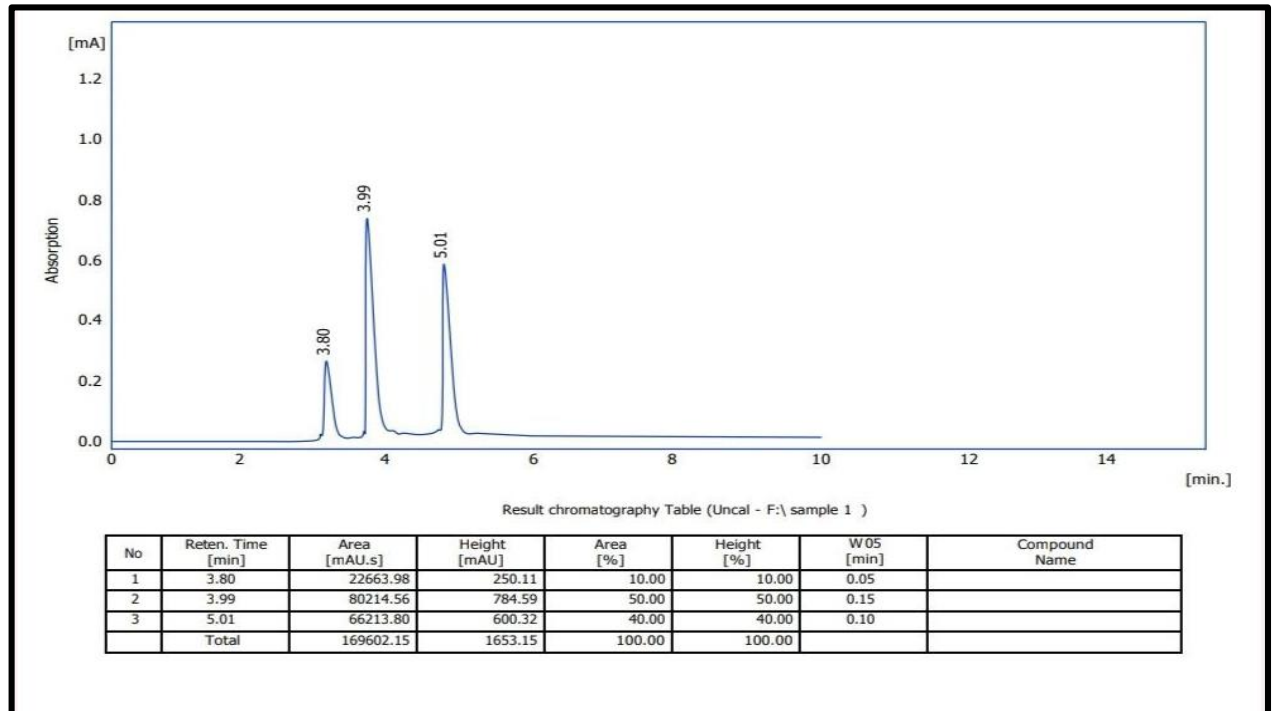
شكل (19-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. caespitosus* بواسطة HPLC



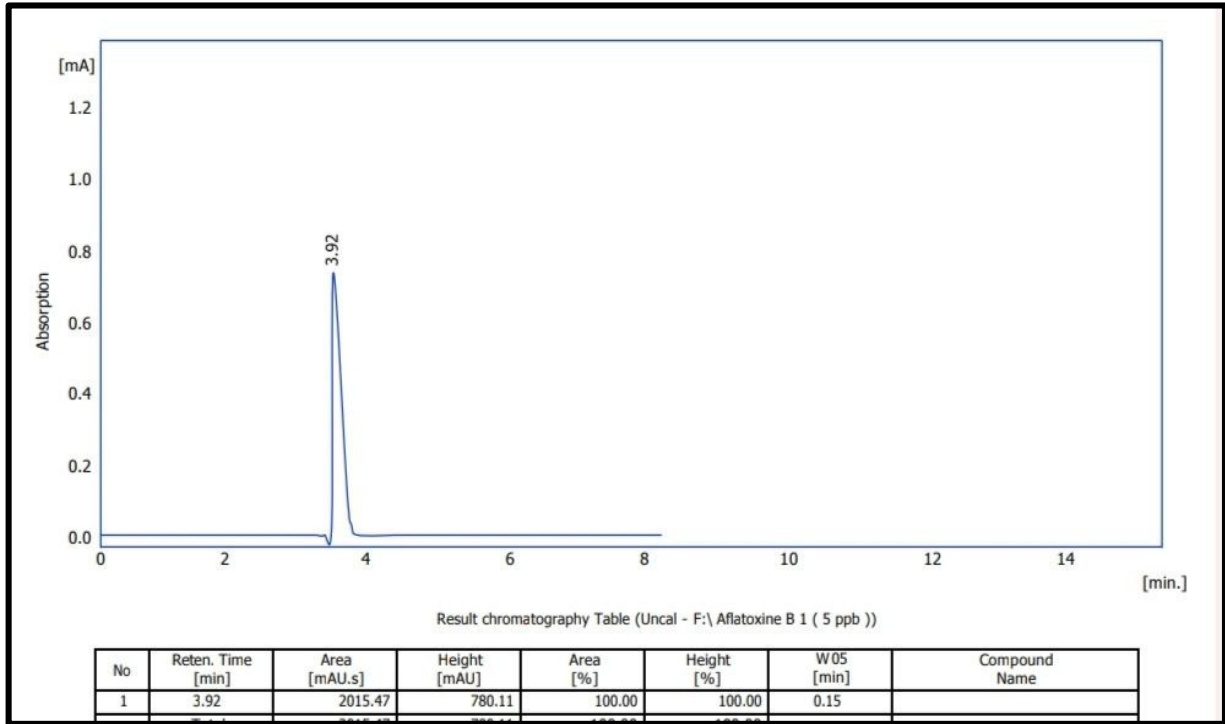
شكل (20-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *F. equiseti* بواسطة HPLC



شكل (21-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *Talaromyces tiftonensis* بواسطة HPLC



شكل (22-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الفطر *A. niger1* بواسطة HPLC



شكل رقم (23-4) المخطط الكروماتوغرافي للستاندر القياسي لسلم الافلا B1 عند تركيز

### HPLC بواسطة 5PPb

رابعا / التشخيص الجزيئي للعزلات الفطرية المنتجة للافلاتوكسين B1 والمعزولة من حبوب الحنطة  
أ. تحليل تتابعات نواتج التضخيم

لغرض تأكيد التشخيص المظهري للفطريات المنتجة لسلم الافلا B1 فقد اختيرت العزلات

الفطرية والمتمثلة بـ *A. niger1*، *A. niger2*، *A. flavus1*، *A. flavus2*، *A. flavus3*،

*Alternaria* ، *A.caespitosus* ، *A.tubingensis* ، *A.terrus* ، *A. niger3* ،

*alternata* ، *F. equiseti* و *Talaromyces tiftonensis* لغرض تشخيصها على المستوى

الجزيئي وتحديد مستوى المفاغرة (AG) التي تعود اليها .

أظهرت النتائج ان المنطقة البيئية الفاصلة (ITS5+ ITS4) في المنطقة ITS - rDNA

ثابتة وتستخدم بنجاح في تمييز انواع الفطريات المختلفة وتعطي نتائج حاسمة في التشخيص

(White واخرون،1990) ، اذ تم الحصول على ناتج تضاعف بحجم ( 559 ) قاعدة نايتروجينية

للفطر *A. flavus1* و ( 574 ) قاعدة نايتروجينية للفطر للفطر *A. flavus2* و ( 552 ) قاعدة

نايتروجينية للفطر *A. flavus3* و (567) قاعدة نايتروجينية للفطر *A. niger1* و ( 557 ) قاعدة

نايتروجينية للفطر *A. niger2* و ( 558 ) قاعدة نايتروجينية للفطر *A. niger3* و ( 570 ) قاعدة

نايتروجينية للفطر *A.terrus* و ( 567 ) قاعدة نايتروجينية للفطر *A.tubingensis* و ( 558 )

قاعدة نايتروجينية للفطر *A.caespitosus* و (560) قاعدة نايتروجينية للفطر *P. Camembert*

و ( 554 ) قاعدة نايتروجينية للفطر *Alternaria alternate* و ( 530 ) قاعدة نايتروجينية للفطر  
*F. equiseti* و ( 590 ) قاعدة نايتروجينية للفطر *Talaromyces tiftonensis* .  
استعملت نفس البادئات بنجاح في تحديد تتابع القواعد النايتروجينية العائدة لهذه العزلات الفطرية  
وسجلت في قاعدة بيانات ال Genbank التابعة للمركز الدولي لمعلومات التقانات الأحيائية  
National Center of Biotechnology Information (NCBI) ، وحدد لكل عزلة رمز  
تسلسلي خاص الجدول (4-4).

**جدول (4 - 4) الرموز التسلسلية المحددة في البنك الجيني للفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1  
والمعزولة من حبوب لحنطة المخزونة**

الرمز التسلسلي في البنك الجيني	اسم العزلة	ت
PP577787.1	<i>A. flavus1</i>	1
PP581359.1	<i>A. flavus2</i>	2
PP593589.1	<i>A. flavus3</i>	3
PP581350.1	<i>A. niger1</i>	4
PP593590.1	<i>A. niger2</i>	5
PP593599.1	<i>A. niger3</i>	6
PP581362.1	<i>A.terrus</i>	7
PP 581356.1	<i>A.tubingensis</i>	8
PP216644.1	<i>A.caespitosus</i>	9
PP216658.1	<i>Alternaria alternate</i>	10
PP216655.1	<i>F. equiseti</i>	11
PQ151777.1	<i>P. camembert</i>	12
PP216657.1	<i>Talaromyces tiftonensis</i>	13

ب/ تحديد تسلسل القواعد النيروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية والشجرة الوراثية **Phylogeny**  
أظهرت نتائج تحليل تسلسل القواعد النروجينية (Nucleotide sequence) لنواتج الحامض  
النووي المضاعفة باستعمال برنامج BLAST وبمقارنتها مع البيانات الموجودة في المركز الوطني

لمعلومات التقانة الاحيائية (NCBI) بان العزلات المعزولة من حبوب الحنطة تعود إلى الانواع *P. camember* ، *A.tubingensis* ، *A.terrus* ، *A. niger* ، *A. flavus* ، *Talaromyces* و *F. equiseti* ، *Alternaria alternate*، *A.caespitosus* . *tiftonensis*

توضح النتائج ان المنطقة البينية الفاصلة ITS5 و ITS4 في المنطقة ITS - rDNA تستعمل بنجاح في تشخيص وتمييز انواع الفطريات المختلفة ( Marciano واخرون،2005). كما انها تعد أداة قوية تعزز دقة وسرعة التعرف على الفطريات .

لقد أصبح استخدام المنطقة البينية الفاصلة (ITS) في التشخيص الجزيئي للفطريات، وخاصة في تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، حجر الزاوية في علم الفطريات حيث توفر المناطق البينية الفاصلة (ITS)، وهي تسلسلات غير مشفرة تقع بين جينات الحمض النووي rRNA ، وايضا توفر تنوعًا كبيرًا لتحديد الأنواع والدراسات النشئية ، وبناء أشجار التطور، مما يساعد في فهم العلاقات الفطرية والتطور، كما تساعد في تحديد الأنواع الغامضة التي قد لا يمكن تمييزها من خلال الشكل وحده ( Schmidt واخرون، 2013).

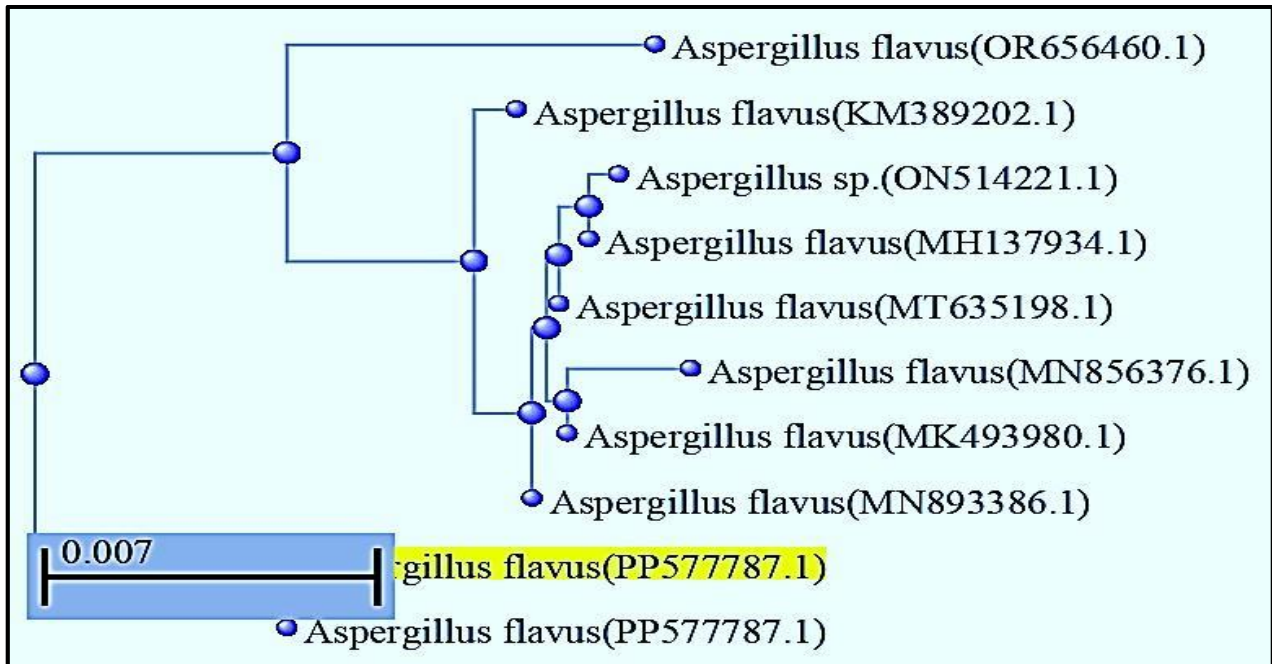
اذ تم تصميم بادئات مناطق (ITS) لغرض استهداف أنواع فطرية محددة، مما يسمح بالكشف الحساس حتى في العينات ذات الكتلة الحيوية المنخفضة. وهذا مهم بشكل خاص في البيئات السريرية حيث يمكن للتشخيص المبكر أن يؤثر بشكل كبير على نتائج العلاج (White واخرون، 1990) ، وفي التشخيص البيئي والسريري (Meyer واخرون، 2008) .

تبين عبر النتائج ان العزلة *A. flavus*1 أظهرت نسبة تشابه وراثي بلغت 98% مع العزلات العالمية للفطر *A. flavus*1 المعزولة من الهند ، الولايات المتحدة الامريكية ،كينيا وتركيا ونسبة 97% مع العزلات المعزولة من العراق، الصين، مصر، والسعودية جدول ( 4-5 ) شكل(4-24) .

جدول (5-4) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. flavus* 1 المعزول في

هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه	Bp	اسم السلالة
/Kerbala Iraq	PP577787.1		559	<i>Aspergillus flavus</i> 1
India	OR656460.1	98%	571	<i>Aspergillus flavus</i>
USA	MN893386.1	98%	555	<i>Aspergillus flavus</i>
Kenya	MK493980.1	98%	593	<i>Aspergillus flavus</i>
Turkey	MH137934.1	98%	580	<i>Aspergillus flavus</i>
Iraq/Najaf	OR656460.1	97%	565	<i>Aspergillus flavus</i>
China	MN856376.1	97%	601	<i>Aspergillus flavus</i>
Egypt	ON514221.1	97%	607	<i>Aspergillus flavus</i>
Saudi Arabia	OR051631.1	97%	571	<i>Aspergillus flavus</i>



شكل (4-24): الشجرة الوراثية للفطر *A. flavus* AJM-6 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت

بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات

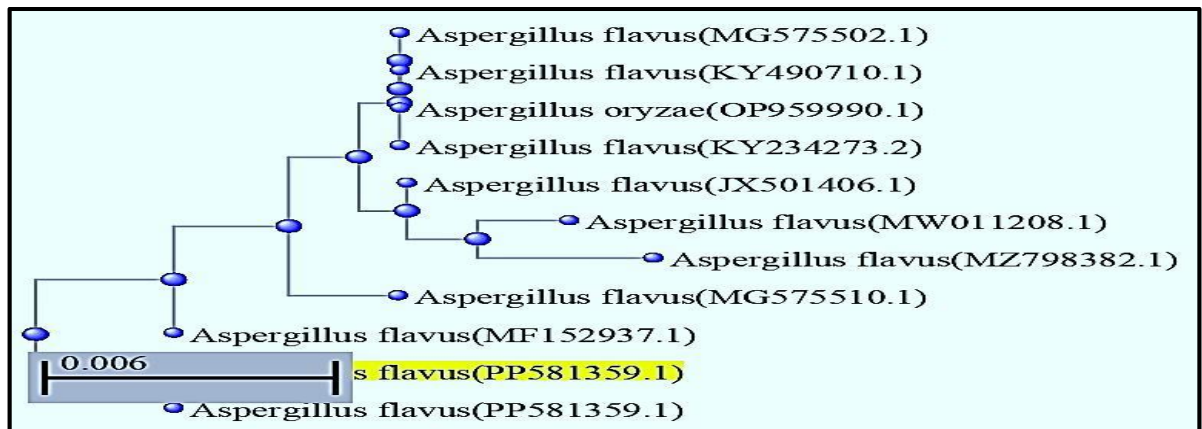
عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

أيضا" أظهرت العزلة *A. flavus*2 نسبة تشابه 98% مع سلالة الفطر المعزولة من الهند ، ماليزيا ، السعودية ، الصين ، نيجيريا ، ايران والسعودية (جدول 4-6 ) (شكل 4-25) .

جدول (4-6) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. flavus*2 المعزول في

هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP581359.1	Iraq/Karbala	574	<i>Aspergillus flavus</i> 2
98%	MF152937.1	India	693	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	JX501406.1	Malaysia	597	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	MG575510.1	Malaysia	599	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	MG575502.	Malaysia	599	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	OP959990.1	Saudi Arabia	596	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	MW011208.1	Nigeria	580	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	MZ798382.1	Negeria	595	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	KY490710.1	Iran	590	<i>Aspergillus flavus</i>
98%	KY234263.1	Australia	816	<i>Aspergillus flavus</i>



شكل (4-25): الشجرة الوراثية للفطر *A. flavus* AJM- 8 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت

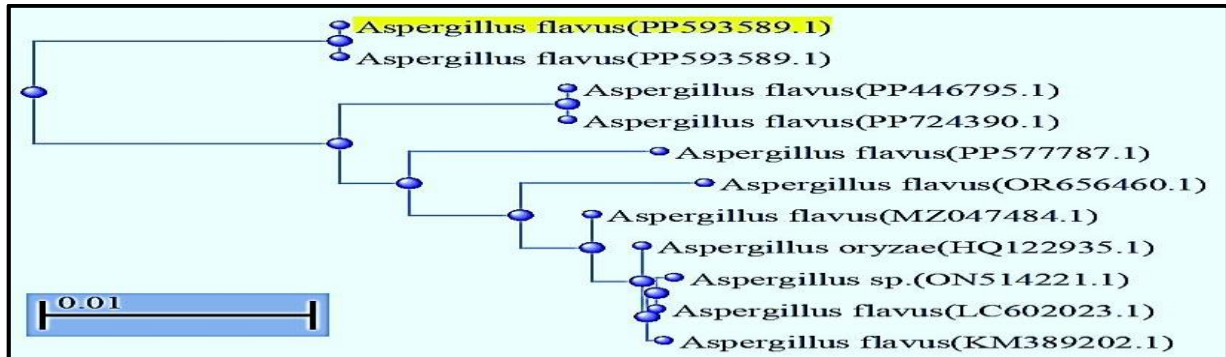
بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات

عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBan

في حين العزلة *A. flavus*3 كانت نسبة التشابه 96% مع العزلات العالمية لنفس السلالة المعزولة من العراق ، اليابان ، مصر والهند ونسبة 95% مع العزلات المعزولة من العراق ، الصين والهند (جدول 4-7 ) ( شكل 4-26 ) .

جدول (4-7) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. flavus*3 المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

اسم السلالة	Bp	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus flavus</i> 3	552	Iraq/Karbala	PP593589.1	
<i>Aspergillus flavus</i>	545	Iraq	PP724390.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	559	Iraq	PP577787.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	622	Japan	LC602023.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	607	Egypt	ON514221.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	581	India	HQ122935.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	558	Iran	PP446795.1	96%
<i>Aspergillus flavus</i>	565	Iraq	OR656460.1	95%
<i>Aspergillus flavus</i>	590	China	MZ047484.1	95%
<i>Aspergillus flavus</i>	566	India	KM389202.1	95%



شكل (4-26): الشجرة الوراثية للفطر *A. flavus* AJM-11 (محددة باللون الاصفر) والتي

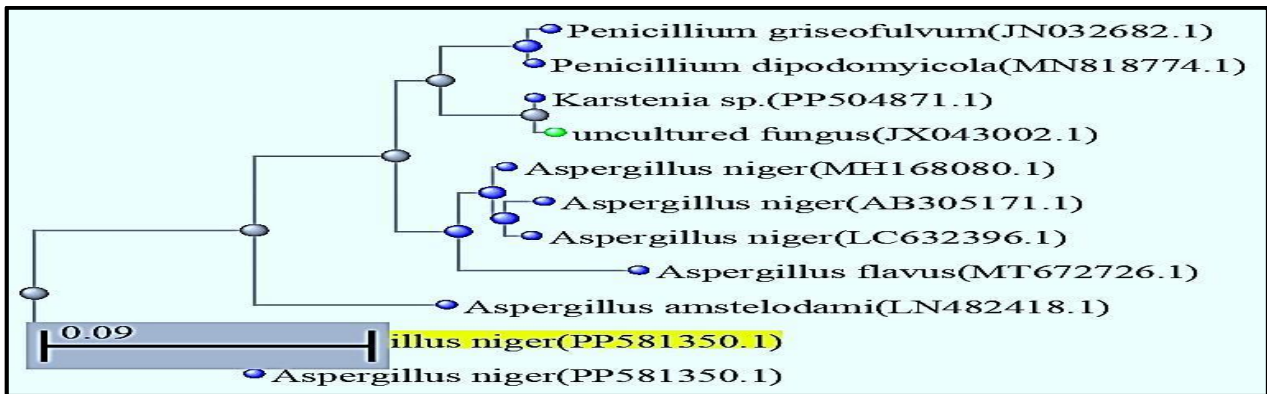
أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات

سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

أما نسبة التشابه بين العزلة الفطرية العائدة للفطر *A. niger1* وبين العديد من الفطريات فبلغت 82% مع العزلات العالمية المعزولة من لوكسمبورغ ، الولايات المتحدة الأمريكية و السعودية ، ونسبة تشابه 81% مع عزلات الصين ومصر في حين بلغت نسبة التشابه 80% مع عزلات مصر واليابان ونسبة تشابه 79% مع العزلة المعزولة من الصين ونسبة تشابه 74% مع العزلة المعزولة من الفلبين (جدول 4-8) (شكل 4-27).

**جدول (4-8) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. niger1* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP581350.1	Iraq/Karbala	567	<i>Aspergillus niger1</i>
82%	PP504871.1	Luxembourg	1516	<i>Aspergillus niger</i>
82%	JX043002.1	USA	586	<i>Aspergillus niger</i>
82%	LN482418.1	Saudi Arabia	588	<i>Aspergillus niger</i>
81%	JN032682.1	China	564	<i>Penicillium griseofulvum</i>
81%	MN818774.1	Egypt	562	<i>Aspergillus niger</i>
80%	MH168080.1	Egypt	623	<i>Aspergillus niger</i>
80%	AB305171.1	Japan	561	<i>Aspergillus niger</i>
79%	LC632396.1	China	626	<i>Aspergillus niger</i>
74%	MT672726.1	Philippines	576	<i>Aspergillus flavus</i>

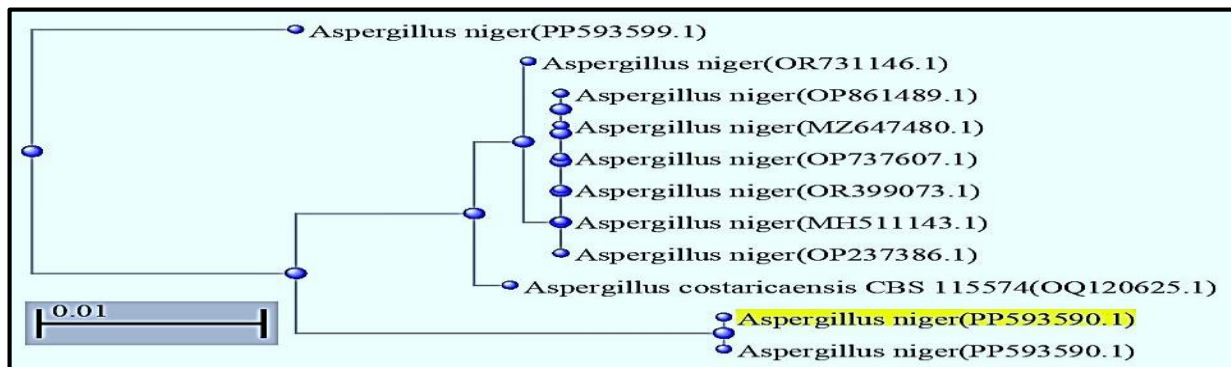


شكل (4-27): الشجرة الوراثية للفطر *A. niger* AJM-5 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

كما اظهرت نتائج تحديد التشابه BLAST analysis التابعة لعزلة الفطر *A. niger2* مع العزلات العالمية ان هناك تشابه بنسبة 96% بينها وبين العديد من العزلات العائدة لنفس الفطر المعزولة من نيجيريا ، الهند ،ايران، الصين و كينيا ونسبة تشابه 95% مع العزلة المعزولة من العراق والهند جدول(9-4) شكل (4-28).

جدول (9-4) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. niger2* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

اسم السلالة	Bp	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus niger2</i>	557	Iraq/Karbala	PP593590.1	
<i>Aspergillus niger</i>	600	Nigeria	OR731146.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	575	India	OQ120625.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	614	Iran	OP861489.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	572	China	OR399073.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	602	Kenya	OP737607.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	603	China	OP237386.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	657	India	MH511143.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	558	Iraq	PP593599.1	95%
<i>Aspergillus niger</i>	588	India	MZ647480.1	95%

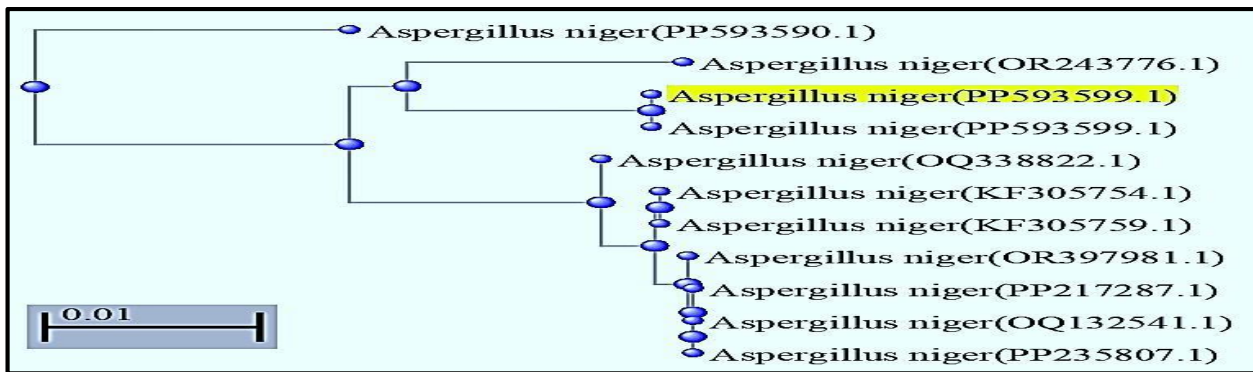


شكل (4-28): الشجرة الوراثية للفطر *A. niger* AJM-12 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تنابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تنابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

في حين العزلة *A.niger3* كانت نسبة التطابق مع العزلات العالمية بنسبة 97% و 96% و 95% مع العزلات العالمية جدول(4-10) شكل (4-29).

جدول (4-10) مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. niger3* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

اسم السلالة	Bp	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus niger3</i>	558	Iraq/Karbala	PP593599.1	
<i>Aspergillus niger</i>	526	Mexico	OQ338822.1	97%
<i>Aspergillus niger</i>	562	Iraq	OR243776.1	97%
<i>Aspergillus niger</i>	656	Singapore	KF305759.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	653	Singapore	KF305754.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	2267	Egypt	PP235807.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	587	Malaysia	PP217287.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	607	Malaysia	OQ132541.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	639	Kenya	OR397992.1	96%
<i>Aspergillus niger</i>	557	Iraq	PP593590.1	95%

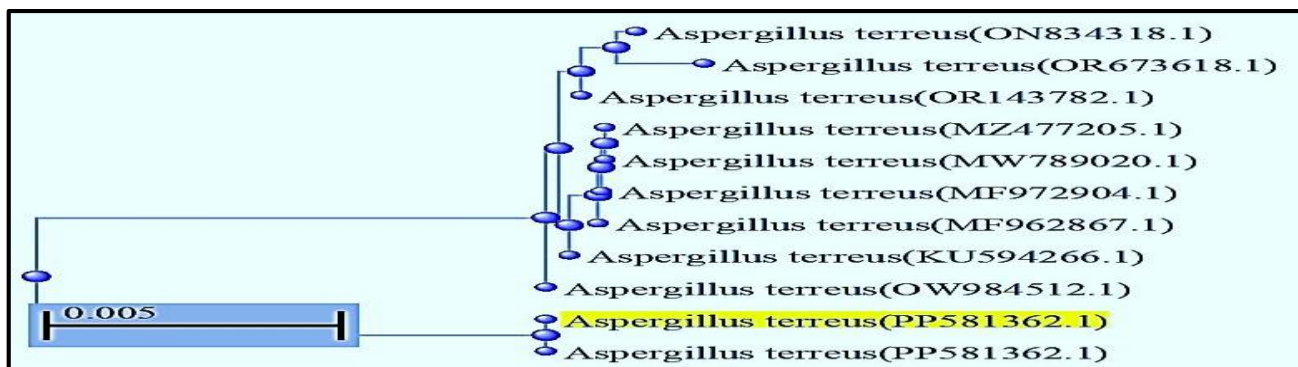


شكل (4-29): الشجرة الوراثية للفطر *A. niger* AJM-13 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

أما نسبة التشابه بين العزلة الفطرية العائدة للفطر *A. terreus* وبين العزلات العالمية المعزولة من الصين ، بلجيكا ، عمان ومصر فبلغت 97%، في حين كانت نسبة التشابه 96% مع عزلات العربية السعودية ، الصين والعراق جدول (4-11) شكل (4-30).

جدول (4-11) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. terreus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI

اسم السلالة	Bp	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus terreus</i>	570	Iraq/Karbala	PP581362.1	
<i>Aspergillus terreus</i>	611	China	KU594266.1	97%
<i>Aspergillus terreus</i>	613	Belgium	OW984512.1	97%
<i>Aspergillus terreus</i>	601	Oman	OR143782.1	97%
<i>Aspergillus terreus</i>	669	Egypt	MW789020.1	97%
<i>Aspergillus terreus</i>	590	China	MZ477205.1	97%
<i>Aspergillus terreus</i>	588	Saudi Arabia	ON834318.1	96%
<i>Aspergillus terreus</i>	626	China	MF962867.1	96%
<i>Aspergillus terreus</i>	626	China	MF972904.1	96%
<i>Aspergillus terreus</i>	582	Iraq	OR673618.1	96%

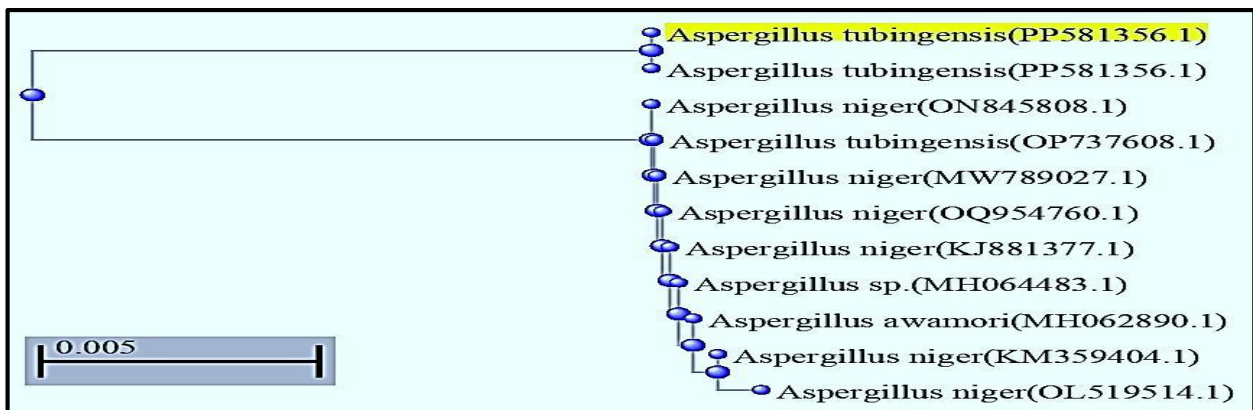


شكل (4-30): الشجرة الوراثية للفطر *A. terreus* AJM-9 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

في حين العزلة *A. tubingens* كانت نسبة التشابه 97% مع العزلات العالمية المعزولة من الهند ، في حين بلغت نسبة التشابه 96% مع العزلات العالمية المعزولة من كينيا ، الصين ، مصر و السعودية جدول ( 4-12 ) شكل (4-31).

**جدول (4-12) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. tubingens* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

اسم السلالة	Bp	المنشأ	الرمز التسلسلي	نسبة التشابه
<i>Aspergillus tubingens</i>	567	Iraq/Karbala	PP 581356.1	
<i>Aspergillus tubingens</i>	644	India	MH064483.1	97.24%
<i>Aspergillus tubingens</i>	854	India	KJ881377.1	97.24%
<i>Aspergillus tubingens</i>	574	India	KM359404.1	97.06%
<i>Aspergillus tubingens</i>	649	India	MH062890.1	97.06%
<i>Aspergillus tubingens</i>	603	Kenya	OP737608.1	96.93%
<i>Aspergillus tubingens</i>	586	China	OQ954760.1	96.75%
<i>Aspergillus tubingens</i>	578	Egypt	MW789027.1	96.74%
<i>Aspergillus tubingens</i>	574	Saudi Arabia	ON845808.1	96.58%
<i>Aspergillus tubingens</i>	576	Egypt	OL519514.1	96.58%

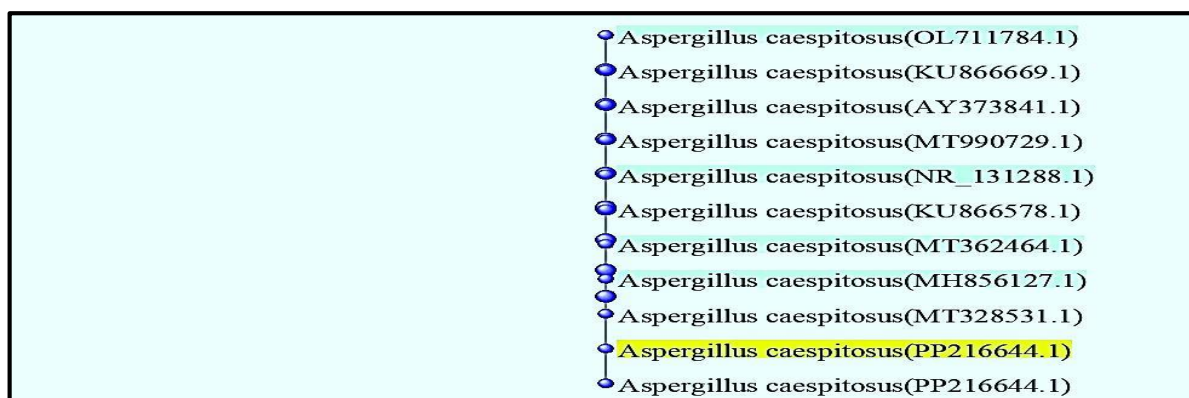


شكل (4-31): الشجرة الوراثية للفطر *A. tubingens* AJM-7 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBan

أظهرت نتائج تحليل BLAST لتسلسل العزلات الفطرية مع العزلات العالمية ان الفطر *A. caespitosus* في هذه الدراسة كانت مشابهة بنسبة 100% مع السلالة المعزولة من العربية السعودية و 99% للسلالات العالمية المعزولة من هولندا ، مصر، الولايات المتحدة واليونان ، نسبة تتشابه 98% مع العزلات المعزولة من الولايات المتحدة وهولندا الجدول (4-13) الشكل (4-32).

**جدول (4-13) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *A. caespitosus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP216644.1	Iraq/Karbala	558	<i>Aspergillus caespitosus</i>
100%	MT328531.1	Saudi Arabia	525	<i>Aspergillus caespitosus</i>
99%	MH856127.1	Netherland	571	<i>Aspergillus caespitosus</i>
99%	MT362464.1	Egypt	555	<i>Aspergillus caespitosus</i>
99%	KU866578.1	Netherland	560	<i>Aspergillus caespitosus</i>
99%	NR131288.1	USA	591	<i>Aspergillus caespitosus</i>
99%	MT990729.1	Greece	716	<i>Aspergillus caespitosus</i>
98%	AY37841.1	USA	752	<i>Aspergillus caespitosus</i>
98%	KU866669.1	Netherland	752	<i>Aspergillus caespitosus</i>
98%	OL711784.1	USA	1670	<i>Aspergillus caespitosus</i>

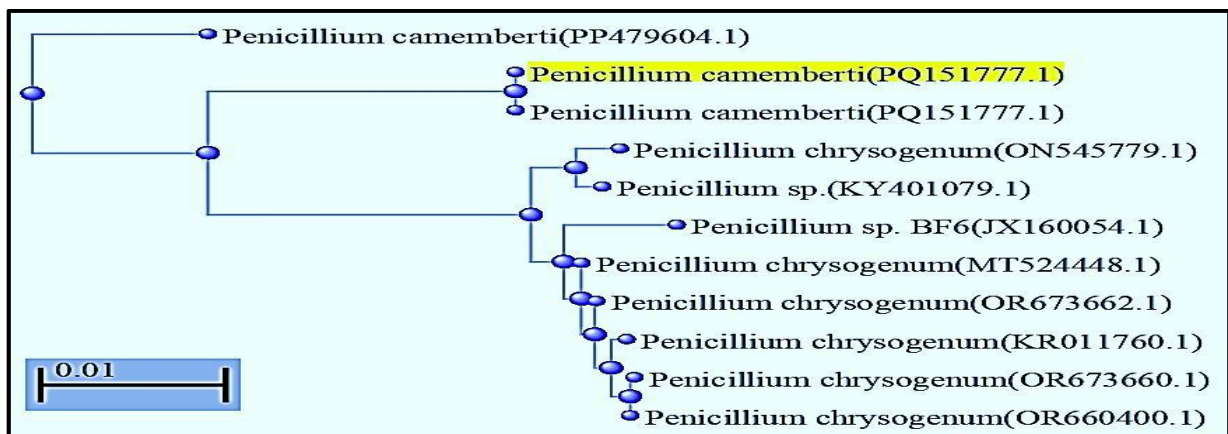


شكل (4-32): الشجرة الوراثية للفطر *A. caespitosus* AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

اظهرت نتائج العزلة *P.camemberti* ان هناك نسبة تشابه وراثي بلغت 94% مع العزلات العالمية المعزولة من ايران ، العراق، الولايات المتحدة الامريكية ، الصين ، تشيلي والبرازيل  
جدول (14-4) شكل (33-4) .

**جدول (14-4) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *P.camemberti* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PQ151777.1	Iraq/Karbala	560	<i>Penicillium camemberti</i>
94%	PP479604.1	Iran	566	<i>Penicillium camemberti</i>
94%	OR673660.1	Iraq	564	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	OR660400.1	Iraq	549	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	OR673662.1	Iraq	564	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	JX160054.1	USA	627	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	KR011760.1	China	595	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	ON545779.1	China	592	<i>Penicillium chrysogenum</i>
94%	KY401079.1	Chile	594	<i>Penicillium sp.</i>
94%	MT524448.1	Brazil	836	<i>Penicillium chrysogenum</i>



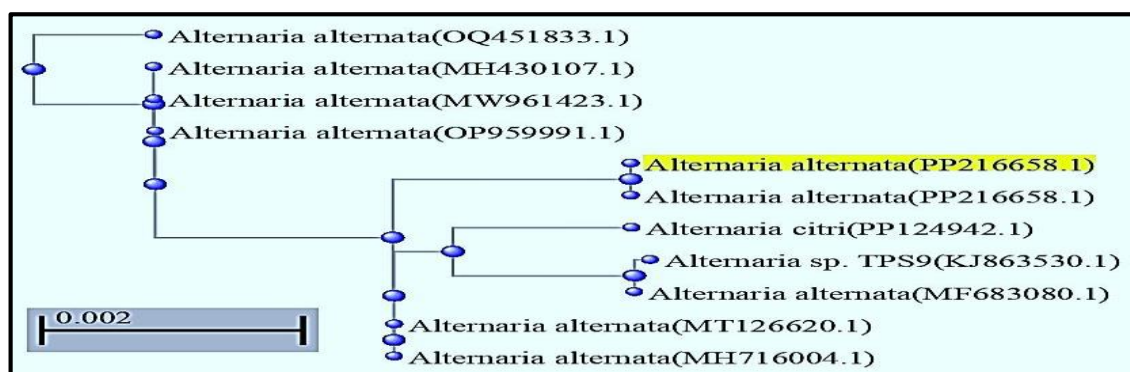
شكل (33-4): الشجرة الوراثية للفطر *P.camemberti* AJM-14 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

أظهرت العزلة *Alternaria alternata* نسبة تشابه وراثي بلغت 99% مع العزلات العالمية المعزولة من الصين ، باكستان ، تونس ، السعودية ومصر ، ونسبة 75% مع العزلة المعزولة من الصين جدول ( 15-4 ) شكل ( 4-34 ) .

جدول (15-4) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *Alternaria alternata* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في

NCBI

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP216658.1	Iraq/Karbala	554	<i>Alternaria alternata</i>
99%	MF683080.1	China	563	<i>Alternaria alternata</i>
99%	MH716004.1	Pakistan	568	<i>Alternaria alternata</i>
99%	MW961423.1	China	564	<i>Alternaria alternata</i>
99%	MT126620.1	Tunisia	553	<i>Alternaria alternata</i>
99%	OQ451833.1	Pakistan	570	<i>Alternaria alternata</i>
99%	KJ863530.1	China	564	<i>Alternaria alternata</i>
99%	OP959991.1	Saudi Arabia	569	<i>Alternaria alternata</i>
99%	PP124942.1	Egypt	558	<i>Alternaria alternata</i>
75%	MH581239.1	China	706	<i>Alternaria alternata</i>



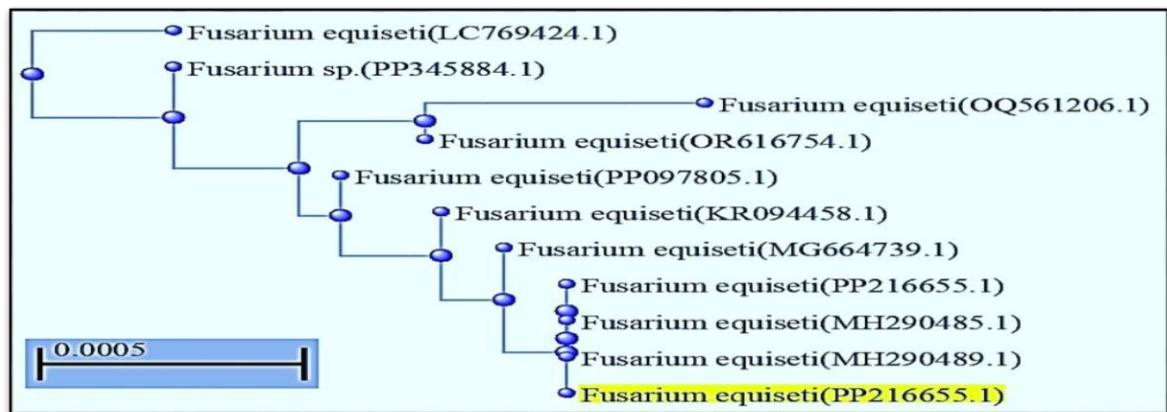
شكل ( 4-34 ) : الشجرة الوراثية للفطر *Alternaria alternata* AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعد النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات

GenBank

كان لعزلة الفطر *F. equiseti* في هذه الدراسة أعلى معدل تشابه وراثي بنسبة 100% مع سلالات *F. equiseti* المعزولة من الصين، الجزائر، اوكلاند وكينيا، ونسبة تشابه بلغت 99% مع السلالات المعزولة من منغوليا، ايران والصين الجدول (4-16) الشكل (4-35).

**جدول (4-16) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية لمنطقة ITS للفطر *F. equiseti* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP216655.1	Iraq/Karbala	530	<i>Fusarium equiseti</i>
100%	PP814859.1	China	552	<i>Fusarium equiseti</i>
100%	PP345884.1	Algeria	557	<i>Fusarium equiseti</i>
100%	PP097805.1	Auckland	562	<i>Fusarium equiseti</i>
100%	OR616754.1	China	562	<i>Fusarium equiseti</i>
100%	MG664739.1	Kenya	558	<i>Fusarium equiseti</i>
99%	LC769424.1	Mongolia	1148	<i>Fusarium equiseti</i>
99%	MH290485.1	Iran	551	<i>Fusarium equiseti</i>
99%	MH290489.1	Iran	551	<i>Fusarium equiseti</i>
99%	OQ561206.1	China	579	<i>Fusarium equiseti</i>

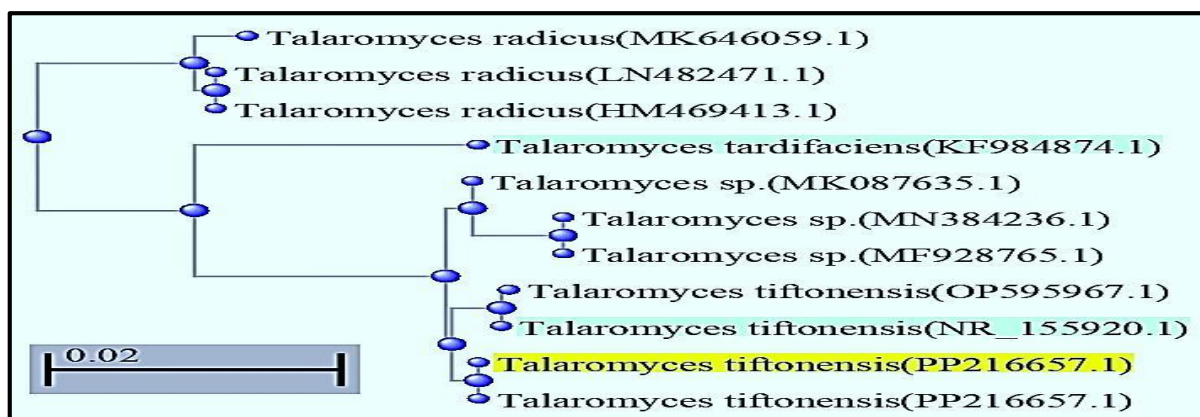


شكل (4-35): الشجرة الوراثية للفطر *F. equiseti* AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank

بالإضافة إلى ذلك، أشارت مقارنة تسلسل القواعد النيتروجينية لمقاطع ITS4 و ITS5 المكررة للفطر *Talaromyces tiftonensis* المعزول في هذه الدراسة إلى وجود تشابه وراثي بنسبة 99% مع العزلات العالمية من الولايات المتحدة وجنوب أفريقيا ، في حين بلغت نسبة التشابه 98% مع العزلات المعزولة من جنوب أفريقيا ، ونسبه تشابه بلغت 94% مع العزلة المعزولة من هولندا ، و 93% مع العزلات المعزولة من كوريا ،السعودية والفلبين الجدول ( 4-17 ) الشكل ( 4-36 ) .

**جدول (4-17) مقارنة تسلسل القواعد النيتروجينية لمنطقة ITS للفطر *Talaromyces tiftonensis* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات العالمية التابعة للفطر نفسه والمسجلة عالميا في NCBI**

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
	PP216657.1	Iraq/Karbala	590	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
99%	NR155920.1	USA	562	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
99%	MK087635.1	South Africa	541	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
98%	MF928765.1	South Africa	549	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
98%	OP595967.1	South Africa	872	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
98%	MN384236.1	South Africa	549	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
94%	KF984874.1	Netherland	583	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
93%	HM469413.1	Korea	1153	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
93%	LN482471.1	Saudi Arabia	910	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
93%	MK646059.1	Philippines	596	<i>Talaromyces tiftonensis</i>



**شكل (4-36): الشجرة الوراثية للفطر *Talaromyces tiftonensis* AJM-1 (محددة باللون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النيتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالإضافة الى تتابعات سلالات عالمية لنفس الفطر الممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات**

أظهرت النتائج أيضا اختلافات بين سلالات الـ *A. flavus* و *A. niger* الثلاثة التي عزلت من حبوب الحنطة حيث تميزت بوجود عدة طفرات وراثية وهي الطفرات الانتقالية Transition و الطفرات العكسية Transversion و طفرات الحذف Deletion الجدول ( 4-18 ) .

#### جدول ( 4-18 ) الاختلافات بين السلالات المشخصة لـ *A. niger* و *A. flavus*

Query strain	Subject strain	Variation type	Location	Nucleotide
<i>A. flavus1</i>	<i>A. flavus2</i>	Transition	66-95-533	C/ A - T /C - C /T
		Transversion	19-65-538	G/C - C/G - C /G
		Deletion	530	0
	<i>A. flavus3</i>	Transition	23- 537- 547	T /C -T/ G -T/ G
		Transversion	24- 39 -122	A/ T - G/C - C/G
		Deletion	504	0
<i>A. niger1</i>	<i>A. niger2</i>	Transition	236-247 -467	T /C - G/T – A/G
		Transversion	253- 446-453	G/C- C/G - T/ C
		Deletion	400	0
	<i>A. niger3</i>	Transition	235-283 - 405	T/ C - A/ C- T /G
		Transversion	284- 454 -462	C /G - G /C - T /A
		Deletion	401	0

ان سبب حدوث هذه الطفرات تعود لأسباب عديدة ، قد تكون ناتجة عن العديد من العوامل البيئية مثل التغيرات في الظروف البيئية مثل درجات الحرارة والرطوبة، أو بسبب التعرض الى المواد الكيميائية السامة أو الملوثات مثل المبيدات مما أن يؤدي إلى ظهور طفرات وراثية تنتج سلالات جديدة تكون أكثر قدرة على التكيف مع هذه الظروف (Feng وآخرون، 2021؛ Liu وآخرون، 2022) أو تكون ناتجة عبر حدوث اخطاء في عملية نسخ الحمض النووي DNA أثناء التكاثر اللاجنسي ، مما يؤدي إلى ظهور سلالات جديدة (Zhu وآخرون، 2023) . او اثناء التكاثر الجنسي الذي يحدث في بعض الظروف غير المناسبة ، اذ يؤدي إلى خلط المواد الوراثية بين الأبوين مما يسهم في إنتاج سلالات جديدة بوساطة زيادة التنوع الوراثي (Horn و Greene، 2018؛ Cary وآخرون، 2015) ان السلالات الجديدة الناتجة من الطفرات الوراثية قد تكون أكثر قدرة على إنتاج السموم الفطرية مثل سموم الأفلا مما يزيد من خطورتها على الصحة العامة (Wu وآخرون، 2023) ، وايضا تكون

أكثر تكيفاً مع البيئات المتنوعة أو مقاومة للعوامل المضادة للفطريات ( Geiser وآخرون، 2020).  
توافقت نتائج الدراسة مع دراسة Sharma وآخرون (2017) الذي أثبت أن للفطر *Aspergillus* سلالات ناتجة من الطفرات الوراثية وتكون أكثر قدرة على التكيف مع الظروف البيئية المحلية وأكثر إنتاجاً للمواد الكيميائية مثل الأحماض العضوية والإنزيمات. كما توافقت مع دراسة الباحث Dyer وآخرون (2022) حيث أكدت ظهور سلالات جديدة للفطر *A. flavus* ناتجة من الطفرات الانتقالية والحذف وتكون أكثر مقاومة للأدوية.

#### 4-2-3- فحص تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي مع النسخ العكسي في الوقت الحقيقي (RT-qPCR)

في هذه الدراسة تم استخلاص الحمض النووي الكلي من العزلتين الفطرتين *A. flavus* و *A. niger*. إذ أظهرت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي العكسي في الوقت الحقيقي (RT-qPCR) لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المرسل (mRNA) للعزلتين *A. flavus* و *A. niger* الدالة على مقدار التعبير الجيني لجين AFLD لإنتاج الأفلاتوكسين وكذلك استخدام الجين القياسي ITS وحسب معادلة Livak، أن هنالك اختلاف في كمية الإنتاج للأفلاتوكسين حيث أن عزلة الفطر *A. flavus* أنتجت الأفلاتوكسين بمقدار 5.27 fold change مقارنة مع عزلة الفطر *A. niger* التي كان إنتاجها للأفلاتوكسين بمقدار 1.00 fold change مما أدى إلى زيادة التعبير الجيني لعزلة الفطر *A. flavus* مقارنة مع عزلة الفطر *A. niger* الجدول (4-19) الشكل (4-37).

أظهرت النتائج أن العزلتين الفطرتين *A. flavus* و *A. niger* تحتويان على الجين AFLD المرتبط بإنتاج الأفلاتوكسين. إذ كانت طريقة القياس الكمي RT-PCR في الوقت الحقيقي تعتمد على أرقام عتبة الدورة (Cycle Threshold (CT) التي تستخدم لكشف التضخيم للجين المستهدف AFLD وجين المحافظ ITS. حيث سجلت قيم CT للجين المحافظ للفطر *A. niger* 19.71، 20.89 و 18.21 مقارنة مع الجين المستهدف 24.09، 25.01 و 23.43، في حين سجلت قيم CT للجين المحافظ للفطر *A. flavus* 20.19، 21.65 و 18.44 مقارنة مع الجين المستهدف 22.72، 23.45 و 20.64 الجدول (4-19) الشكل (4-38) (4-39).

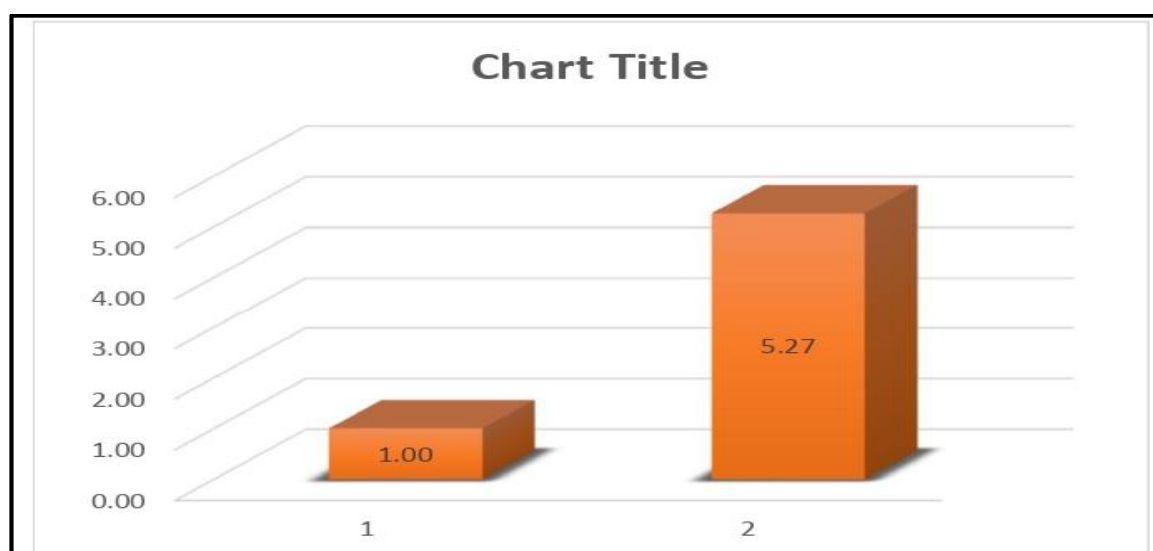
أشارت الدراسات إلى وجود العديد من الجينات التي لها علاقة وثيقة بتكوين الأفلاتوكسين من هذه الجينات aflR و aflP (Sohrabi و Taghizadeh، 2018) و أيضا aflQ و aflI (Jamali وآخرون، 2013)، وإن سبب اختيارنا للجين AFLD للدراسة الحالية لعلاقته في إنتاج الأفلاتوكسين، وهذا ما أكدته أيضاً دراسة Baquião وآخرون (2016)، كما أن جين aflD يلعب دوراً مهماً في التحويل المبكر norsolorinic acid إلى averantin (Baquião وآخرون، 2016).

إن نتائج الدراسة الحالية في التعبير الجيني للجين AFLD توافقت مع نتائج دراسة Taghizadeh و Sohrabi (2018) إذ وجدت ان عزلات الفطر *A. parasiticus* و *A. flavus* كانت إيجابية لجين aflD . كما أظهرت نتائج الدراسات السابقة أن هنالك العديد من الجينات والعوامل الأخرى مسؤولة عن إنتاج الأفلاتوكسين (Dehghan وآخرون، 2008) ، منها العوامل البيئية التي لها تأثير مهم على تنظيم جينات تخليق الأفلاتوكسين (Schmidt-Heydt وآخرون 2009) . أشارت نتائج دراسة Taghizadeh و Sohrabi (2018) إلى أن نقص إنتاج الأفلاتوكسين في بعض الأنواع المنتجة للأفلاتوكسين قد يكون بسبب حذف وتحور بسيط (استبدال بعض القواعد) لجينات أو فقدان جينات أخرى مسؤولة عن مسار إنتاج الأفلاتوكسين . ومع ذلك، فإن بعض الظروف الفسيولوجية قد تؤثر على تخليق الأفلاتوكسين ( Yu، 2012) . علاوة على ذلك، فإن التعبير الجيني للجينات المحتملة في مسار تخليق الأفلاتوكسين قد يكون مفيداً في التمييز بين السلالات الفطرية السامة وغير السامة ، فقد وجد الباحث Mahmoud (2015) ان نسخ aflD و aflQ هو علامة جيدة للتمييز بين عزلات *A. flavus* المسببة للسموم وغير المسببة لها ، وايضا مرتبطة بكميات AFB1 المنتجة (Jamali وآخرون، 2013). ثبت في الوقت الحاضر أن RT-PCR أكثر حساسية من الزراعة (تنمية الكائن الممرض) ، إذ ان التنمية تستغرق وقتاً طويلاً ويتطلب الكثير من العمل، كما أن اختيار الوسائط يؤدي إلى تحيز من حيث الأنواع التي قد تنمو، إذ تم توحيد اختبار RT-PCR للكشف السريع عن *A. flavus* في محاصيل مختلفة باستعمال بادئات حساسة ومحددة قد تكون مثل هذه الاختبارات القائمة على PCR مفيدة للغاية في صناعات الأغذية والأعلاف وكذلك في مختبرات الحجر الصحي ( Shweta وآخرون، 2013). يمكن أيضاً أن تكون هذه الطريقة مفيدة للتنمية الزراعية والتنظيم الطبي أو البيطري في ضوابط تنظيم الأفلاتوكسين وفي التخطيط وتنفيذ الاستراتيجيات التي تستهدف تحسين سلامة الغذاء البشري أو الحيواني ( Taghizadeh و Sohrabi ، 2018) .

جدول (4- 19) التعبير الجيني لجين الـ ITS وجين الـ AFLD باستخدام طريقة method

Livak للغلزتين الفطريتين *A. niger1* و *A. flavus2*

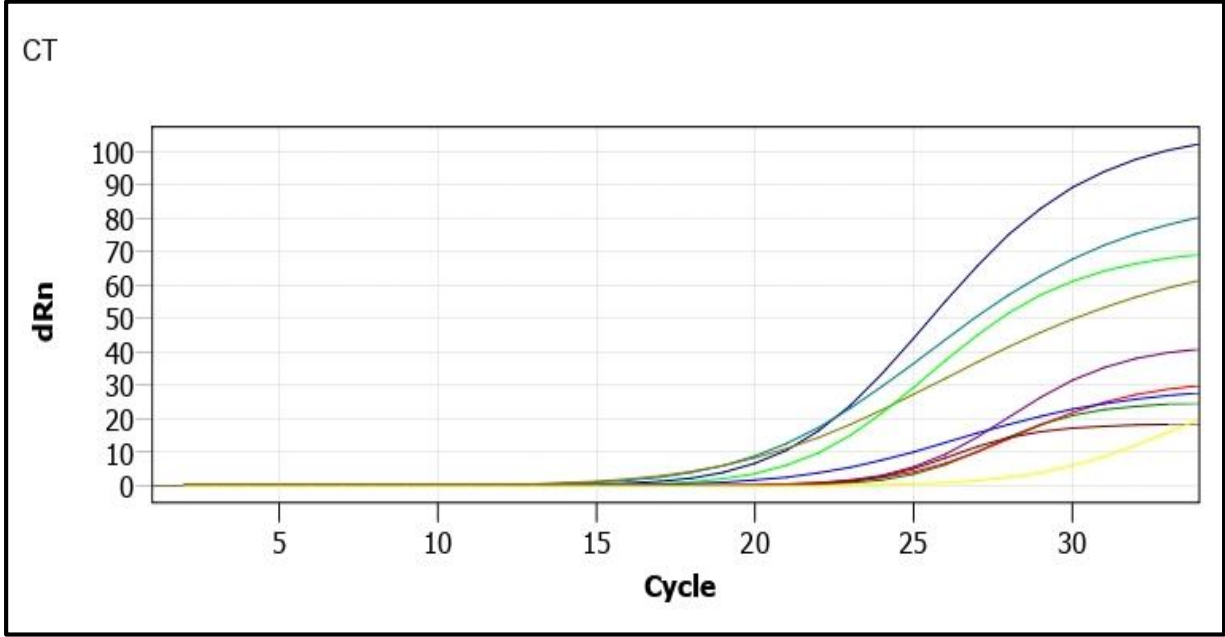
Average Fold change	Fold change ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ )	$\Delta\Delta CT$	$\Delta CT$	Average CT AFLD	Average CT ITS4	الفطر
1.00	1.143	-0.193	4.38	24.09	19.71	1
	1.369	-0.453	4.12	25.01	20.89	2
	0.639	-0.647	5.22	23.43	18.21	3
<b>4.57</b>						
5.27	4.122	-2.043	2.53	22.72	20.19	1
	6.837	-2.773	1.80	23.45	21.65	2
	5.181	-2.373	2.20	20.64	18.44	3



Experimental group

شكل (4 - 37) الشكل البياني للتعبير الجيني النسبي لجين الـ ITS وجين الـ AFLD

## للغزلتين *A. niger1* و *A. flavus2*



شكل (4-38) منحنى تضخيم التعبير الجيني لتقنية تفاعل سلسلة البوليمريز بالوقت الحقيقي

و *A. niger1* و *A. flavus2* و *ITS* و *AFLD* للغزلتين الفطريتين *PCR-time Real* والخاص بجين الـ

### 3-4- عزل وتشخيص بكتريا *Azotobacter chroococcum*

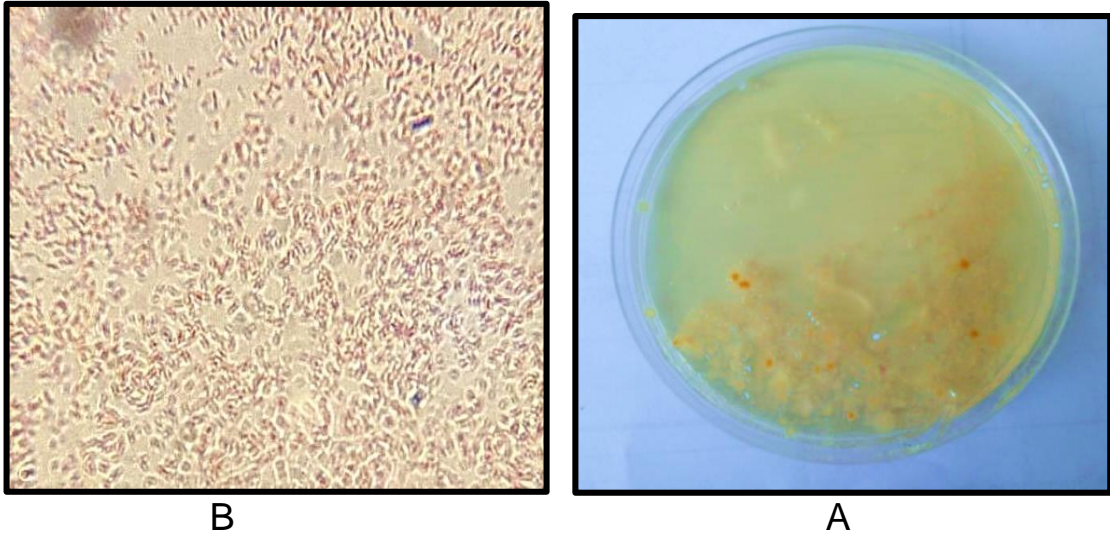
#### 1-3-4- فحص الصفات المظهرية والمجهريّة

أظهرت النتائج أن المستعمرات البكتيرية التي نمت على وسط NA كانت لامعة ، ناعمة ، لزجة ومتوسطة إلى كبيرة الحجم ، كما أن الصبغة البنية أصبحت واضحة مع الوقت مع ظهور صبغة برتقالية . هذا يتفق مع ما وجدته الكعبي(2013) من أن الصبغة البنية كانت واضحة مع مرور الوقت عند عزل بكتيريا

*A. chroococcum* من التربة العراقية شكل (4-39) .

تنتج بكتيريا *A. chroococcum* الكاروتينات كمستقلبات ثانوية التي تساعد في حماية الخلايا من الإجهاد التأكسدي وايضا يمكن أن تساعد في امتصاص الضوء لعمليات التمثيل الكربوني (Fuchs واخرون، 2017)، كما ان للظروف البيئية دور مهم في نمو ونشاط التمثيل الغذائي للبكتيريا مثل مصدر النيتروجين وتوافر الكربون ودرجة الحموضة مما يؤدي إلى إنتاج صبغات متفاوتة. على سبيل المثال قد تعزز الظروف الغنية بالمغذيات نموًا أكثر وتخليقًا للصبغات (Shah و Nisar، 2020)

أظهرت نتائج الفحص المجهرى للشرائح الزجاجية المحتوية على الغشاء البكتيري الثابت الملوخ بصبغة كرام أن أشكال الخلايا البكتيرية كانت على شكل قضبان ( عصوية ) قصيرة غالباً ما تكون في أزواج، كما كانت سالبة لصبغة كرام اذ اصطبغت باللون الاحمر شكل (4-39) .  
هذه الخصائص تتوافق مع الخصائص المجهرية لجنس *Azotobacter* التي ذكرها كل (Holt واخرون،1994؛ AL-Azawy،2010؛ Prakash و Karthikeyan،2013).



شكل ( 4-39 ) الصفات المظهرية والمجهرية للبكتريا *A. chroococcum*

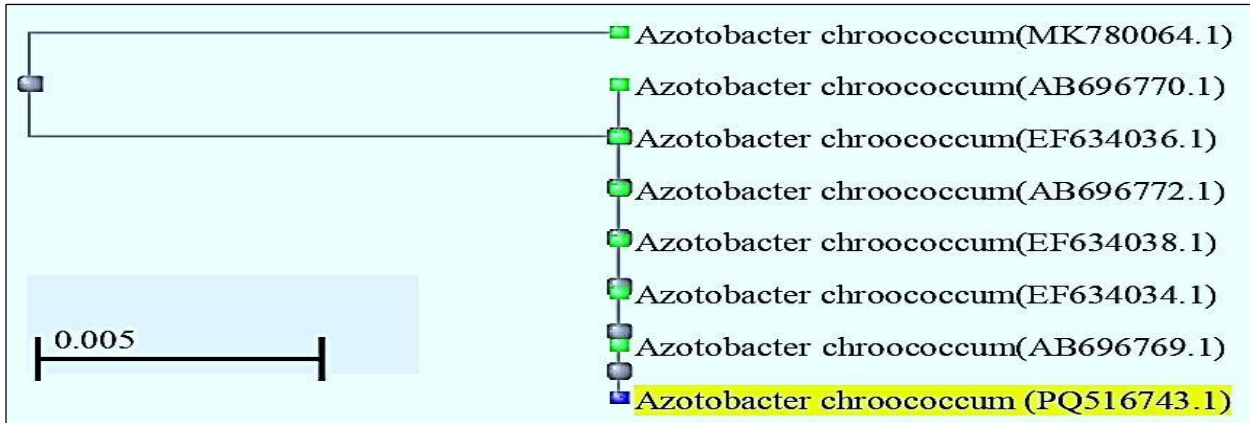
(A)الصفات المظهرية (B) الصفات المجهرية (40x)

#### 4-3-2-التشخيص الجزيئي للعضلة البكتيرية *A. chroococcum*

لغرض تأييد التشخيص المظهري للبكتريا المدروسة فقد تم تشخيصها على المستوى الجزيئي .  
اذ بينت النتائج ان البادئات المستخدمة في هذا الاختبار كانت ناجحة في المضاعفة الكاملة للجين 16s rRNA المهم في تشخيص البكتريا ، اذ تم الحصول على ناتج تضاعف بحجم (881) قاعدة نايتروجينية للبكتريا *A. chroococcum* ، كما استخدمت نفس البادئات في تحديد تتابع القواعد النايتروجينية العائدة لهذه البكتريا التي اودعت في قاعدة بيانات البنك الجيني التابعة للمركز الدولي لمعلومات التقانات الأحيائية (NCBI) National Center of Biotechnology Information حيث حدد للبكتريا رمز تسلسلي خاص بها وهو PQ516743.1 .

اظهرت نتائج تحديد التشابه BLAST analysis لتتابع عذلة البكتريا *A. chroococcum* مع العزلات العالمية ان هناك تشابه بنسبة 100% مع العزلات العالمية المعزولة من تايوان وايطاليا ، ونسبة 99% مع العزلة المعزولة من تايوان ، ونسبة 70% مع العزلة المعزولة من الهند  
جدول ( 4-20 ) شكل (4-4)

كانت النتيجة متفقة مع دراسة العامري (2021) في اختيار المنطقة الجينية 16S rRNA في تشخيص البكتريا على مستوى الجنس والنوع .  
يستخدم جين 16S rRNA على نطاق واسع في تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR لتصنيف وتحديد الميكروبات ، بما في ذلك *A. chroococcum* ، نظراً لطبيعته المحفوظة ووجوده في معظم البكتريا (Sadik وآخرون، 2014، Case وآخرون، 2007) ، مما يسهل تصميم البادئ الشامل والمحدد (Janda و Abbott ، 2007) .



شكل (4-40) : الشجرة الوراثية للبكتريا المدروسة *A. chroococcum* والمؤشرة باللون الاصفر توضح العلاقة الوراثية بينها وبين العزلات الأخرى العائدة لنفس النوع و المسجلة سابقا في

NCBI

جدول (4-20) مقارنة تسلسل القواعد النايروجينية للبكتريا *A. chroococcum* مع العزلات العالمية التابعة لنفس النوع والمسجلة عالميا في NCBI

نسبة التشابه	الرمز التسلسلي	المنشأ	Bp	اسم السلالة
		Iraq/Karbala	881	<i>Azotobacter chroococcum</i>
100%	AB696769.1	Taiwan	1527	<i>Azotobacter chroococcum</i>
100%	EF634034.1	Italy	1449	<i>Azotobacter chroococcum</i>
100%	EF634038.1	Italy	1401	<i>Azotobacter chroococcum</i>
100%	AB696772.1	Taiwan	1404	<i>Azotobacter chroococcum</i>
100%	EF634036.1	Italy	1367	<i>Azotobacter chroococcum</i>
99%	AB696770.1	Taiwan	1529	<i>Azotobacter chroococcum</i>
97%	MK780064.1	India	1408	<i>Azotobacter chroococcum</i>

أشارت دراسات سابقة بأن تشخيص الأنواع البكتيرية بالاعتماد على الصفات المظهرية قد يعطي نتائج خاطئة أثناء عملية التشخيص ، كما ان هنالك العديد من المشاكلات التي تصاحب اثناء التشخيص المظهري للبكتريا منها ان يكون القائم بعملية التشخيص يمتلك خبرة عالية خاصة في الأنواع البكتيرية القريبة التشابه فيما بينها ، كما ان عملية التشخيص المظهري تحتاج إلى وقت و جهد كبيرين ( Tumbarski واخرون،2020) ، لذلك استعمل في هذه الدراسة فحص تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) و تسلسل القواعد النروجينية للتأكد من تشخيص البكتريا *A. chroococcum* . ومن الدراسات السابقة التي استعملت تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) في تشخيص العديد من الكائنات الحية و منها البكتريا مثل بكتريا *Clavibacter michiganensis* ، *Pseudomonas grimontii* ، *Xanthomonas oryzae* ، *Pseudomonas fuscovaginae* و *Xanthomonas spp.* (Sarjono و آخرون ، 2020 ، Cellier ؛ واخرون.2020 ؛ Bangratz واخرون،2020) .

#### 4-3-3- حساب الكثافة العددية للبكتريا *A. chroococcum*

اظهرت نتائج الدراسة إلى أن 1 مليلتر من المعلق البكتيري يحتوي على  $10^6 \times 93$  خلية بكتيرية او وحدة بناء مستعمرة من نوع *A. chroococcum* ، ان هذه الكثافة من الوحدات الحيوية إلى جانب آلياتها العدائية والتنافسية المتعددة، تحد من تكاثر الفطريات المسببة للأمراض في بيئتها. ونظراً لقلة عدد الوحدات التكاثرية الفعالة للبكتيريا في الوسط، فإنها ستكون أقل فعالية في تثبيط الفطريات التي تغزو بسهولة وسطها المتخصص ومحتواه من العناصر الغذائية الجاهزة.

#### 4-3-4- اختبار فعالية عزلة البكتريا *A. chroococcum* في تثبيط العزلات الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1

أظهرت نتائج الدراسة الجدول (4-21) عدم وجود فروق معنوية بين العزلات الفطرية المنتجة للافلاتوكسين ، في حين اظهرت النتائج أن هناك فروقات معنوية بين تراكيز المعلق البكتيري *A. chroococcum* المستخدمة . اذ اظهرت البكتريا *A. chroococcum* كفاءة عالية في تثبيط النمو الشعاعي للفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 المعزولة من حبوب الحنطة والنامية على وسط PDA .

اوضحت الدراسة ان بكتريا *A. chroococcum* اعطت اعلى تأثير لها عند التركيز 3 مل اذ بلغ قطر المستعمرة 0.00 سم ولجميع الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 والمعزولة من الحبوب، اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط ولجميع الفطريات المدروسة 100 % .

اظهر ايضا التركيز 2 مل من المعلق البكتيري كفاءه عالية في تثبيط الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 اذ بلغ قطر المستعمرة 0.00 سم للأجناس *A.niger1* ، *A.niger2* ، *A.caespitosis* ، *P.camemberti* ، *Alternaria Alternaria* و *Talaromyces tiftonensis* ، اذا بلغت النسبة المئوية للتثبيط 100 % ، في حين بلغت اقطار المستعمرات للأجناس *A.flavus1* ، *A.flavus2* و *A.flavus3* 0.50 ، 2.50 ، 2.05 سم على التتابع، اما الاجناس *A.niger3* ، *A.tubingensis*، *A.terrus* و *F. equiseti* 1.25 ، 3.70 ، 2.45 و 1.12 سم على التتابع . بينت النتائج ان التركيز 1 مل من المعلق البكتيري اعطى نتيجة تثبيط عالية ضد الفطر *A.niger1* بلغ قطر المستعمرة 0.00 سم وكانت النسبة المئوية للتثبيط 100 % .

في حين اعطى نتائج تثبيط اقل من التركيزين السابقين 3 و 2 مل من المعلق البكتيري ضد باقي الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1، فقد كان معدل قطر المستعمرة للفطر *A.flavus1* 3.25 سم ، الفطر *A.flavus2* 2.63 سم ، في حين الفطر *A.flavus3* 3.00 سم .

اما الفطر *A.niger2* فقد كان قطر المستعمرة 1.65 سم، و 4.50 سم للفطر *A.niger3* و 3.25 سم للفطر *A.terrus* و 3.00 سم للفطر *A.tubingensis* ، 1.6 سم للفطر *A.caespitosis* و 1.60 سم للفطر *P.camemberti* .

في حين بلغت اقطار الاجناس الفطرية *Alternaria alternate* ، *F. equiseti* و *Talaromyces tiftonensis* ( 0.25 ، 3.75 و 0.75 ) سم على التتابع .

اوضحت الدراسة ان هنالك تناسباً عكسياً بين قطر المستعمرة الفطرية و تركيز البكتريا *A. chroococcum* ، اذ كلما كان تركيز البكتريا اعلى ادى الى حدوث انخفاضاً معنوياً في نمو الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 مقارنة مع معاملة الفطريات بمفردها شكل (4-41) .

يعزى كفاءة البكتريا *A. chroococcum* في تثبيط الفطريات المدروسة الى قابليتها العالية على إنتاج بعض المركبات المضادة للفطريات وكذلك إنتاج مواد ايضية ومركبات عضوية و الأنزيمات التي لها القدرة على تحلل جدران الخلايا الفطرية ومن هذه الأنزيمات *Glucanase* ، *Chitinase* ، *laminarinase* ، كما تتميز البكتريا بإنتاج عدد من المضادات الحيوية مثل *Pyoluteorin* ، *Phenazin* و *herbicolin* (Muslim وآخرون 2021) .

ان البكتريا *A. chroococcum* تمتلك القدرة على إنتاج مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة التي تعمل على مقاومة الفطريات (Aasfar وآخرون 2021 ؛ Pual Kumar و Kumar، 2021) . وكذلك إنتاج سيانيد الهيدروجين (HCN) الذي يعمل عند وجوده بتركيز كبيرة على تثبيط نمو الفطريات الممرضة للنبات (Deniel وآخرون 2004) ، ايضا إنتاج اندول حامض الخليك وبعض المضادات الحيوية مثل *Azotobacterin* و *Conactine* وغيرها ، كما تتميز البكتريا *A. chroococcum* بمنافستها للكائنات الممرضة على المكان والمواد الغذائية (Hillel، 2005 ؛ Nia، 2015).

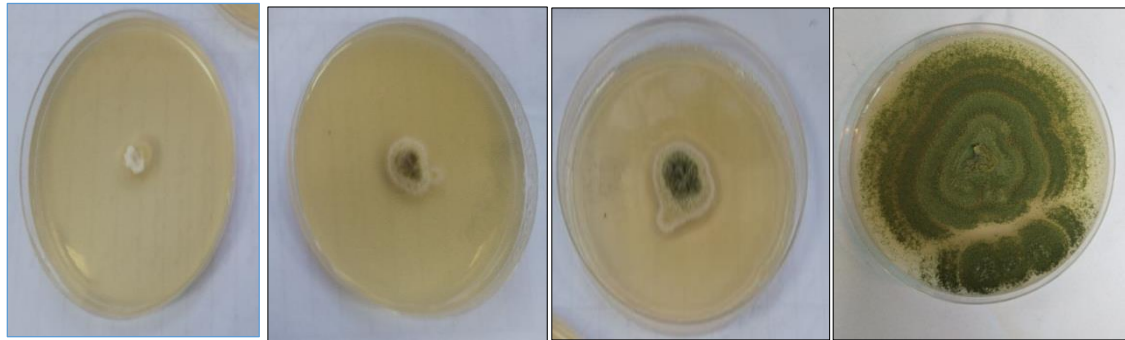
توافقت نتائج الدراسة مع نتائج دراسات اخرى توصلت الى الكفاءة التثبيطية للبكتريا *A.chroococcum* ضد العديد من الممرضات النباتية ، فقد اثبت الباحث شيحان (2022) كفاءة البكتريا *A.chroococcum* في تثبيط الفطريات المسببة لتعفن جذور نبات عرف الديك *Celosia argentea* اذ بلغت نسبة التثبيط 100 % . كما وجد المرعاوي واخرون (2013) الى ان هذه البكتريا لها القدرة في تثبيط نمو الفطر الممرض *Macrophomona phaseolina* المسبب لمرض التعفن الفحامي على نبات الباقلاء وبلغت نسبة التثبيط 69% على الوسط الزرعي PDA مما ادى الى توفير الحماية للنبات من الاصابة بهذا الفطر الممرض.

تماثلت نتائج الدراسة مع نتائج دراسة Al-Awsi و Alsudani (2020) التي اثبتت فعالية البكتريا *A.chroococcum* في تثبيط نمو الفطرين *R.solani* و *F.solani* المسببة لموت بادرات الطماطة . وايضا تثبيط نمو الفطريات *Trichocladium*، *Marcelleina persoonia*، *F. equiseti*، *Curvularia lunata*، *griseum* المسببة لمرض تعفن جذور بعض نباتات الزينة (دخيل، 2021) .

الجدول (21-4) تأثير البكتريا *A. chroococcum* في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 بعد أسبوع من الحضان بدرجة حرارة  $27 \pm 2$  م<sup>0</sup>

المعدل	3 ml	2 ml	1 ml	مقارنة	تركيز البكتريا الفطريات المعزولة
3.70	0.00	2.50	3.25	9.00	<i>A.flavus1</i>
3.03	0.00	0.50	2.63	9.00	<i>A.flavus2</i>
3.51	0.00	2.05	3.00	9.00	<i>A.flavus3</i>
2.25	0.00	0.00	0.00	9.00	<i>A.niger1</i>
2.41	0.00	0.00	1.65	8.00	<i>A.niger2</i>
4.30	0.00	3.70	4.50	9.00	<i>A.niger3</i>
3.38	0.00	1.25	3.25	9.00	<i>A.terrus</i>
3.61	0.00	2.45	3.00	9.00	<i>A.tubingensis</i>
2.40	0.00	0.00	1.60	8.00	<i>A.caespitosis</i>
2.40	0.00	0.00	1.60	8.00	<i>P.camemberti</i>
3.31	0.00	0.00	0.25	9.00	<i>Alternaria alternate</i>
3.50	0.00	1.12	3.75	9.00	<i>F. equiseti</i>
2.43	0.00	0.00	0.75	9.00	<i>Talaromyces tiftonensis</i>
NS*					LSD بين العزلات الفطرية
0.75					LSD بين التراكيز

\*عدم وجود فروق معنوية No significant



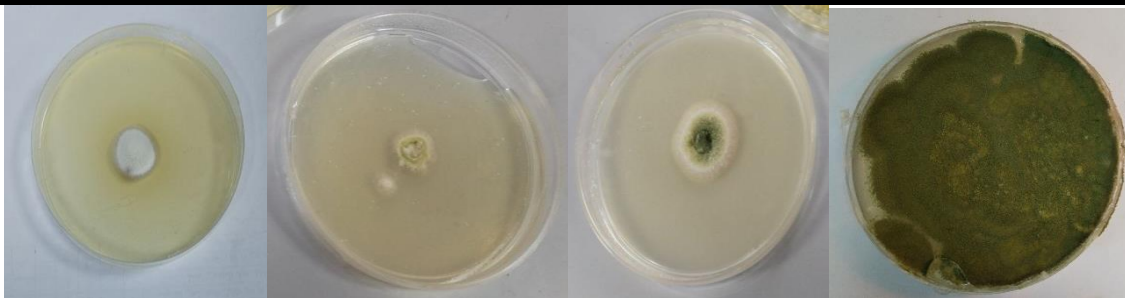
3 مل

2 مل

1 مل

Control

*A.flavus1*



3 مل

2 مل

1 مل

Control

*A.flavus2*



2 مل

1 مل

Control

*A.flavus3*



2 مل

1 مل

Control

*A.niger1*

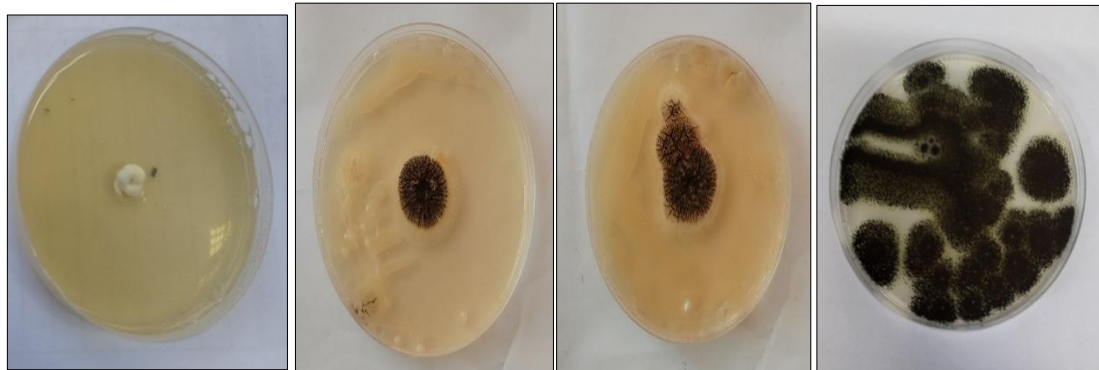


2 مل

1 مل

Control

*A.niger2*



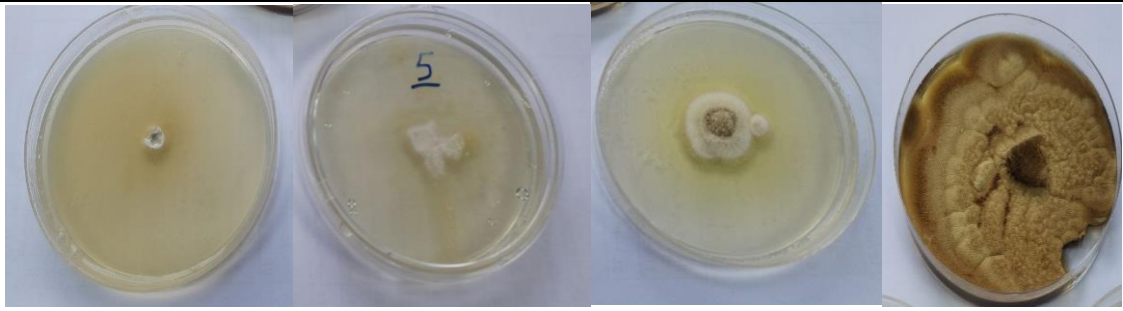
3 مل

2 مل

1 مل

Control

*A.niger3*



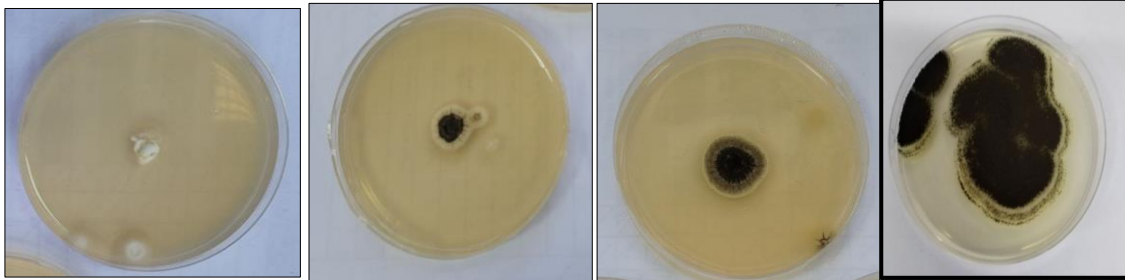
3 مل

2 مل

1 مل

Control

*A.terrus*



3 مل

2 مل

1 مل

Control

*A.tubingensis*



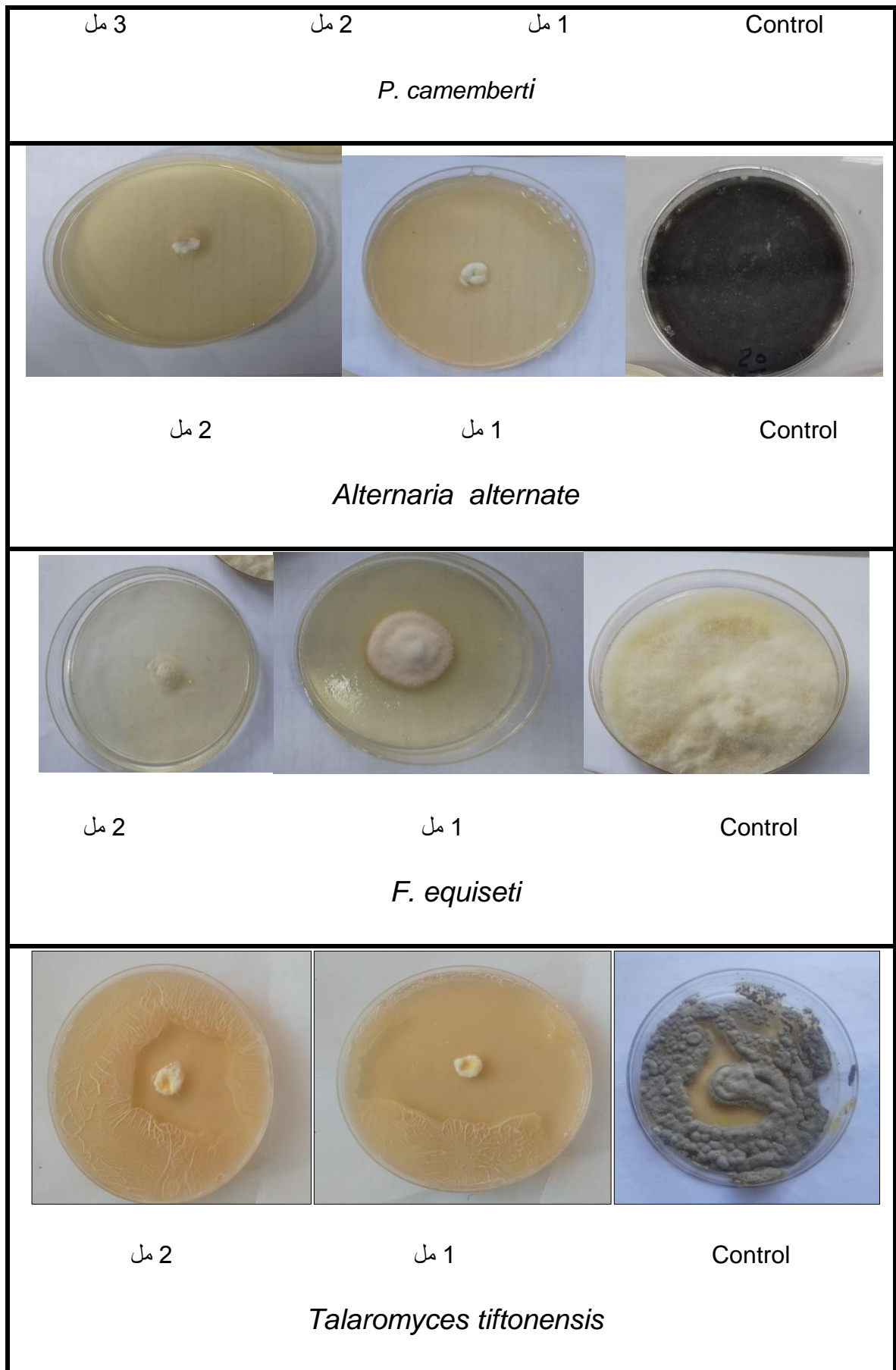
2 مل

1 مل

Control

*A. caespitosus*





شكل (41-4) تأثير البكتريا *A. chroococcum* على نمو الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 بعد أسبوع من الحضان بدرجة حرارة  $27 \pm 2$  م<sup>0</sup>

#### 4-4- مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح *A. chroococcum* بكتريا

##### 4-4-1- اختبار نقاوة حبوب الحنطة

أوضحت الدراسة ان حبوب الحنطة المأخوذة اثناء فترة الحصاد من بعض حقول محافظة كربلاء المقدسة بتاريخ 2024/6/2 وذلك عبر زراعتها في اطباق بتري حاوية على وسط PDA لمدة أسبوع ودرجة حرارة 20-27 م<sup>0</sup> كانت غير ملوثة بالفطريات .

##### 4-4-2- اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم $CaCO_3$ كمادة حاملة للقاح البكتريا

أشارت نتائج الاختبار إلى أن كاربونات الكالسيوم ليس لها تأثيرات ضارة على نمو بكتيريا *A. chroococcum* ، وقد ثبت ذلك من خلال التركيز العالي للخلايا البكتيرية في غرام واحد من هذه المادة، والذي وصل إلى  $10^{12} \times 110$  وحدة تكوين مستعمرة/غرام . توافقت هذه النتيجة مع Kumar وآخرون (2020) في ملائمة هذه المادة لحمل خلايا بكتريا *A. chroococcum* .

تعد كاربونات الكالسيوم مهمة في زيادة فعالية المستحضرات البيولوجية المستخدمة في تصنيعها وذلك لقدرتها على تثبيط نمو الفطريات الممرضة من خلال التأثير غير المباشر مثل تغيير طبيعة الوسط المغذي وتغيير الرقم الهيدروجيني ، اذ تقوم بتغيير الوسط المزروع إلى قلوي عند تحلله ماثيا بإعطاء أيونات هيدروكسيل سالبة (عواد، 1986) ولأن الفطريات تفضل الوسط المحايد أو الحمضي قليلا للنمو فإن تغيير قيمة الرقم الهيدروجيني للوسط يؤثر في توفر العناصر الغذائية التي تحتاجها الفطريات مما يثبط معدلات نموها (بلكارامي وفيرما، 1988) بالإضافة إلى كونها مادة متوفرة محليا وغير مكلفة مما يخفض تكلفة الإنتاج على نطاق واسع (الاسدي، 2023) .

##### 4-4-3- حساب الكثافة العددية للبكتريا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي

أظهرت نتائج الدراسة إن إعداد خلايا البكتريا *A. chroococcum* في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي قد بلغت  $10^{12} \times 110$  وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد التحضير مباشرة ، ولقد انخفضت بعد مرور ستة أشهر من التحضير إذ وصلت إلى  $10^{12} \times 80$  وحدة تكوين مستعمرة/غم .

يعزى الانخفاض في عدد خلايا *A. chroococcum* لكل غرام في المستحضر البيولوجي الذي يتضمن البكتيريا و كاربونات الكالسيوم إلى عدة عوامل منها عدم توفر العناصر الغذائية اذ ان وجود كاربونات الكالسيوم يؤثر على ديناميكيات العناصر الغذائية ، كما ان كاربونات الكالسيوم يعمل كعامل تخزين ولكنه لا يوفر العناصر الغذائية الأساسية، فقد تعاني البكتريا من تقييد النمو، مما يؤدي إلى انخفاض عدد الخلايا (Heggo و Bock، 1996) . كما ان كاربونات الكالسيوم تغيير درجة PH للبيئة إذا تحول الأس الهيدروجيني بعيدًا جدًا عن هذا النطاق الأمثل بسبب إذابة كاربونات الكالسيوم ، وبما ان

البكتريا تزدهر عادةً في ظروف محايدة إلى قلوية قليلاً ، فقد يؤثر ذلك سلْبًا على قابلية الخلايا للبقاء على قيد الحياة ( Fenn و Hinton، 2013؛ Dileep و Shukla، 2019) .  
توافقت نتائج هذه الدراسة مع نتائج الباحثين (العاشور، 2005 و الهاشمي، 2014) في انخفاض اعداد البكتريا في المستحضر الحيوي البكتيري .

#### 4-4-4- دراسة فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح بكتريا *A. chroococcum* في حماية حبوب الحنطة من الإصابة بالفطريات المنتجة للافلاتوكسين B<sub>1</sub>

تم تقدير تركيز الافلاتوكسين B<sub>1</sub> لبعض الفطريات المنتجة الافلاتوكسين B<sub>1</sub> جدول (4-3) واختبار كفاءة البكتريا *A. chroococcum* بمنع انتاج الافلاتوكسين بعد مرور ستة اشهر من الخزن باستخدام تقنية HPLC ، حيث كشفت نتائج تحليل HPLC المستخدم لتحديد وجود وتركيز الأفلاتوكسين AFB<sub>1</sub> في جميع معاملات تجربة التخزين عن وجود فروق معنوية بين حبوب الحنطة دون اي معاملة (Control) مع حبوب الحنطة الملوثة بلقاح العزلات الفطرية المنتجة للافلاتوكسين B<sub>1</sub> وبين المعاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري للبكتريا *A. chroococcum* والملوثة باللقاح الفطري الجدول (4-22).

#### جدول (4-22) معاملات التجربة الخزنية ونسبة تركيز الافلاتوكسين AFB<sub>1</sub> بتقنية HPLC

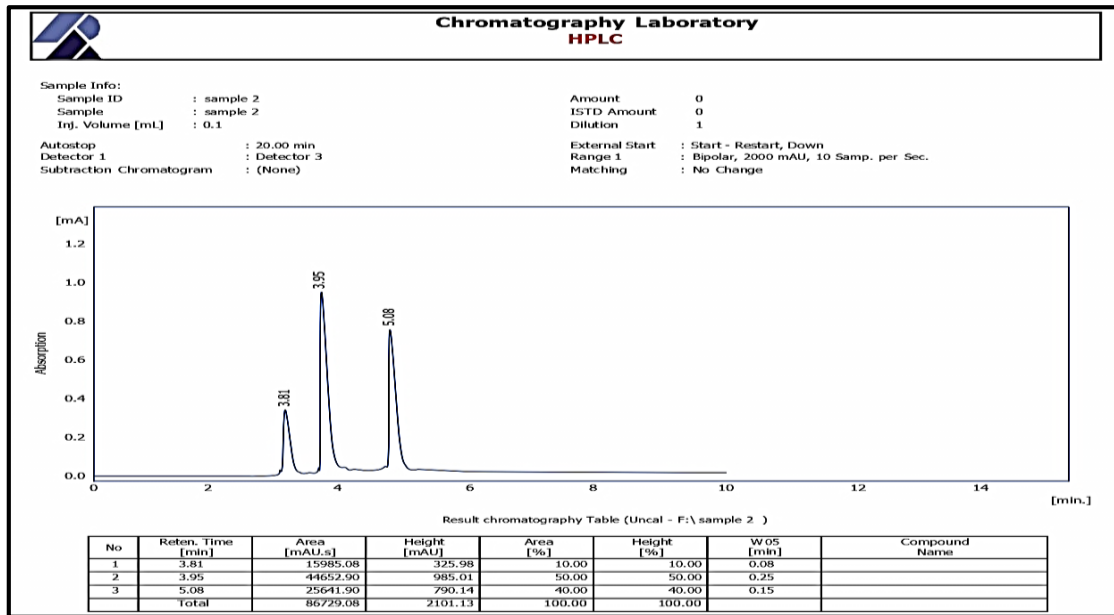
بعد مرور ستة أشهر من الخزن

تركيز الافلاتوكسين B <sub>1</sub> ( ppb)	المعاملات
4.1	الحبوب دون اي معاملة (Control)
UDL	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط
168.1	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. flavus</i> فقط
41.6	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. flavus</i> + المستحضر الحيوي البكتيري
173.9	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. tubigensis</i> فقط
33.6	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. tubigensis</i> + المستحضر الحيوي البكتيري
132.8	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. terrus</i> فقط
27.9	حبوب ملوثة بالفطر <i>A. terrus</i> + المستحضر الحيوي البكتيري

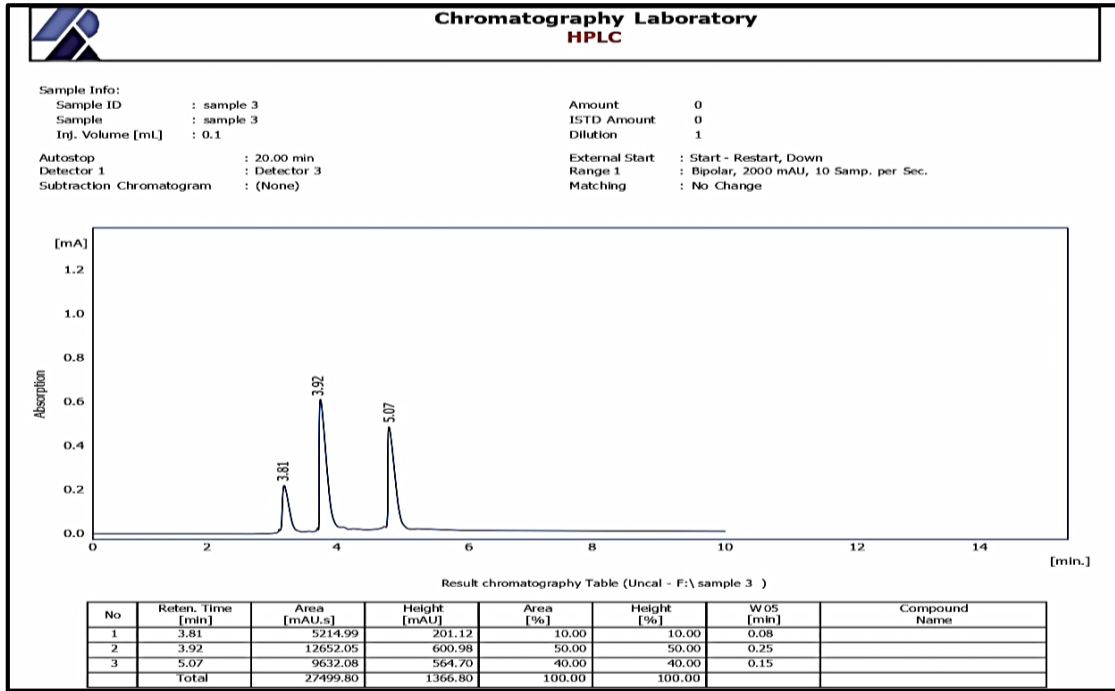
142.9	حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 2 فقط
41.0	حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 2 + المستحضر الحيوي البكتيري
166.9	حبوب ملوثة بالفطر <i>F. equiseti</i> فقط
27.9	حبوب ملوثة بالفطر <i>F. equiseti</i> + المستحضر الحيوي البكتيري
174.2	حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 3 فقط
25.6	حبوب ملوثة بالفطر <i>A.niger</i> 3 + المستحضر الحيوي البكتيري
5.07	LSD

\*UDL = تركيز السم 0.25 PPb

أظهرت نتائج التقدير الكمي بتقنية الكروماتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC ان عزلة الفطر *A.flavus*1 كانت منتجة لسم الافلا B1 وبتركيز 168.1ppm الشكل (4-42) بينما في الحبوب الملوثة بالفطر *A.flavus*1 مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري فقد كان تركيز السم المسجل هو (41.6) PPb الشكل (4-43) .

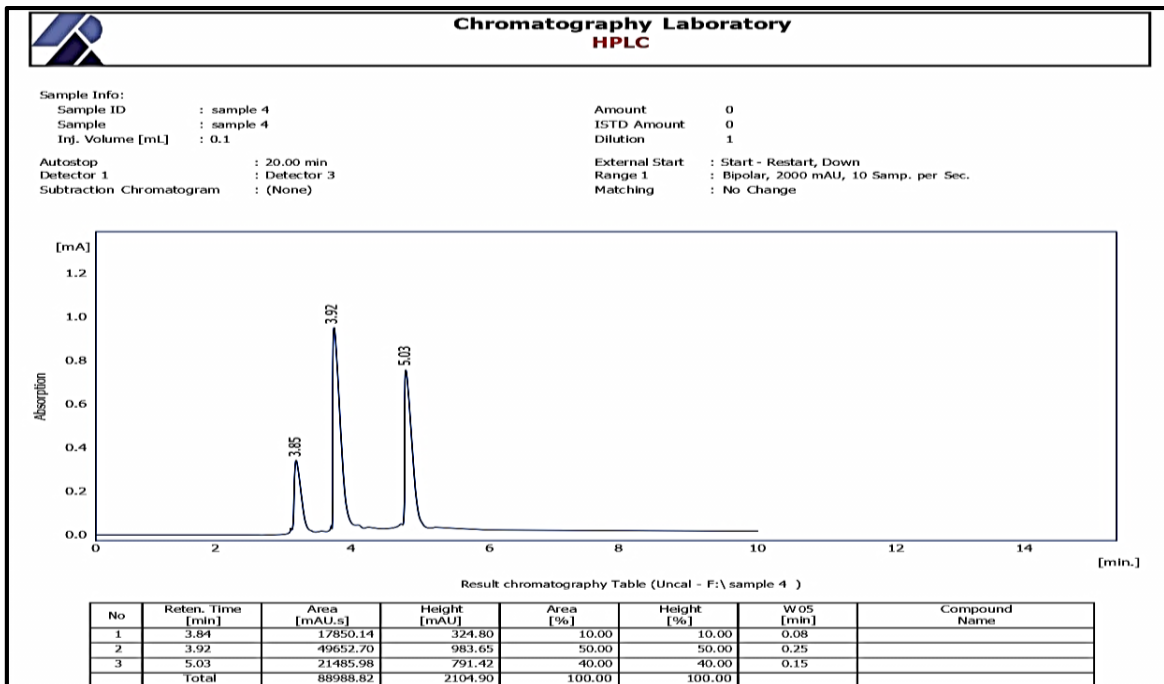


شكل (4-42) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.flavus*1 فقط

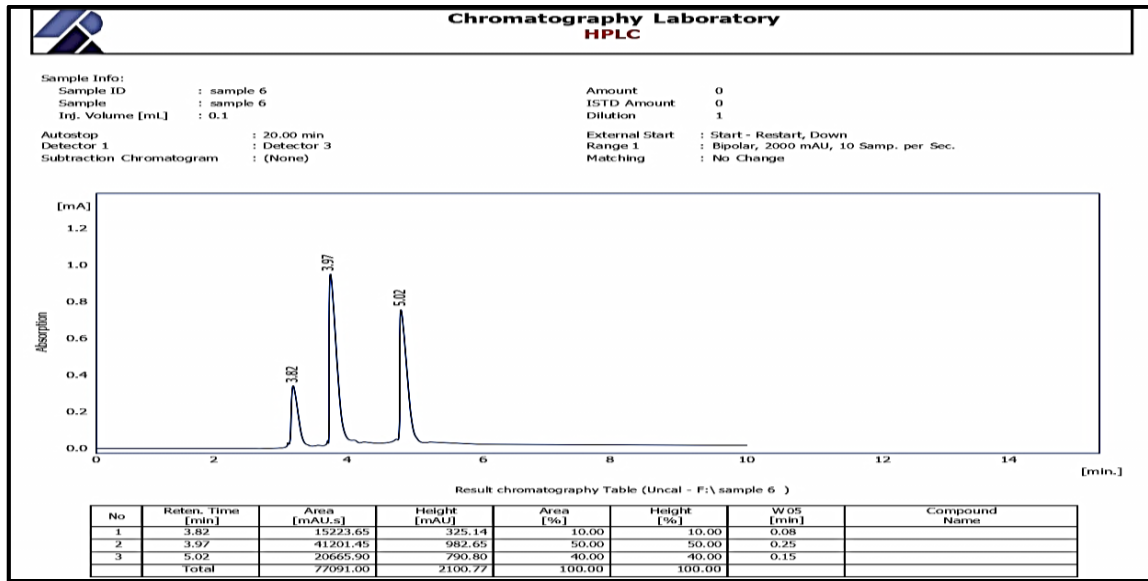


شكل (43-4) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.flavus* + المستحضر الحيوي البكتيري

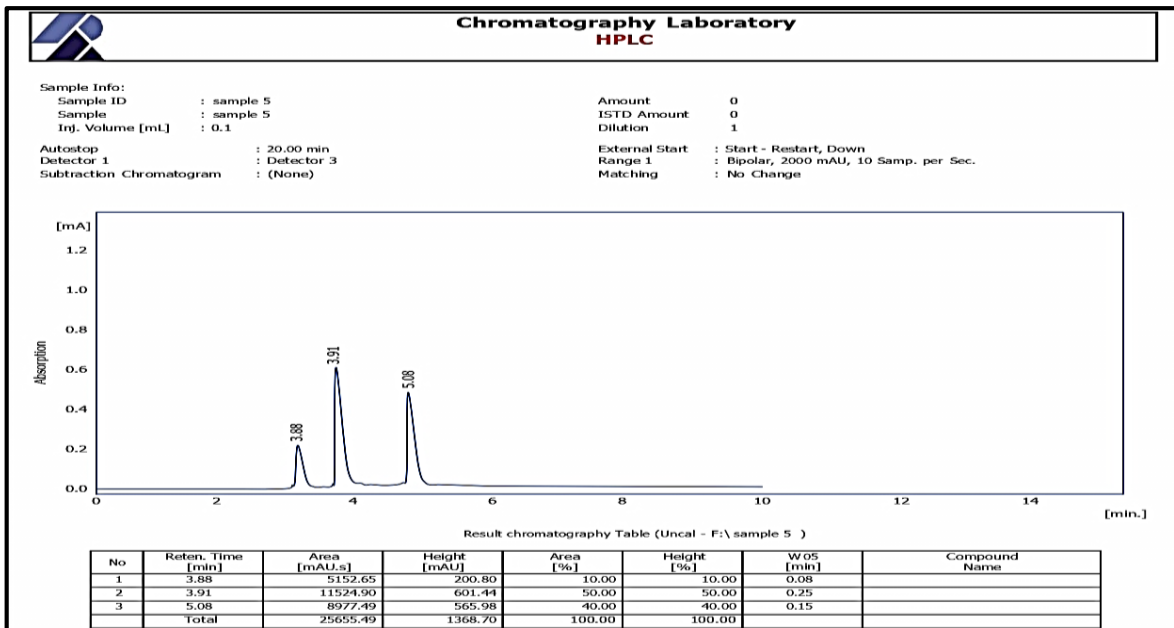
أما في المعاملات الملوثة بالفطر فقط لكل *A.tubigensis* والفطر *A.terrus* فقط بلغت السمية الفطرية (173.9) PPb الشكل (44-4) و (132.8) PPb الشكل (45-4) بالتتابع ، في حين الحبوب الملوثة بنفس الفطرين *A.terrus* و *A.tubigensis* مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري فقد كان تركيز السم المسجل هو (33.6) PPb الشكل (46-4) ، (27.9) PPb الشكل (4-47) بالتتابع .



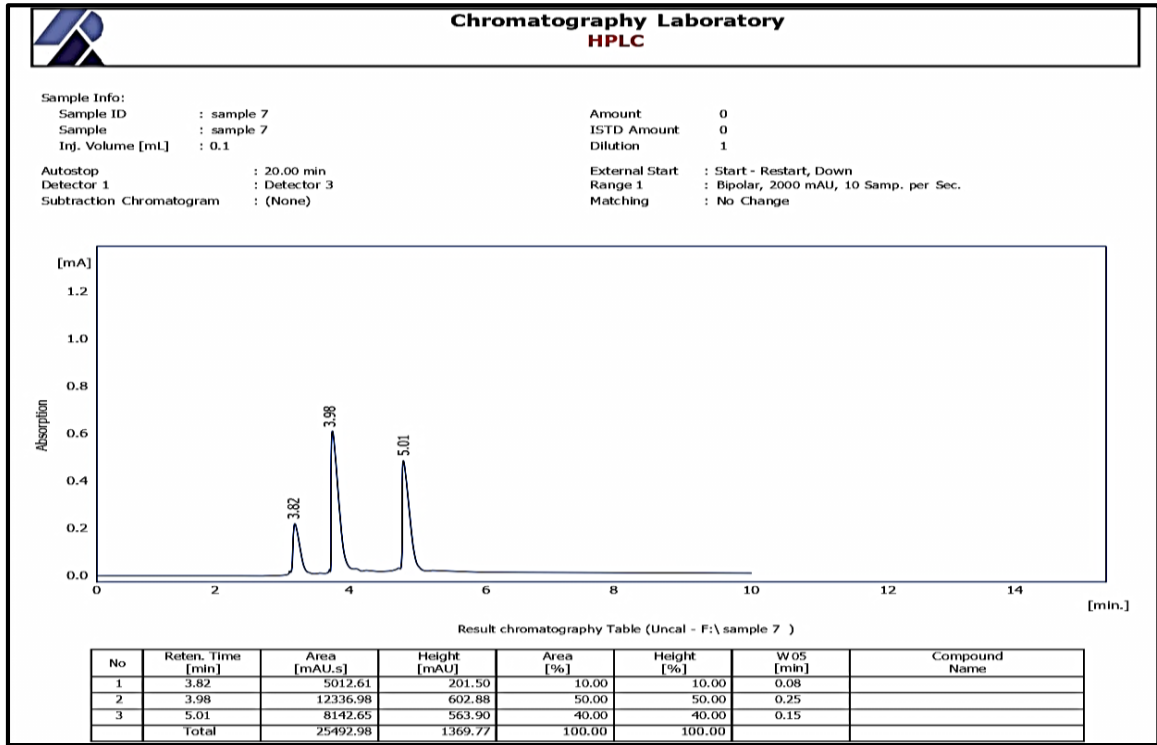
شكل ( 44-4 ) المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.tubigensis* فقط



شكل ( 45-4 ) المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.terrus* فقط



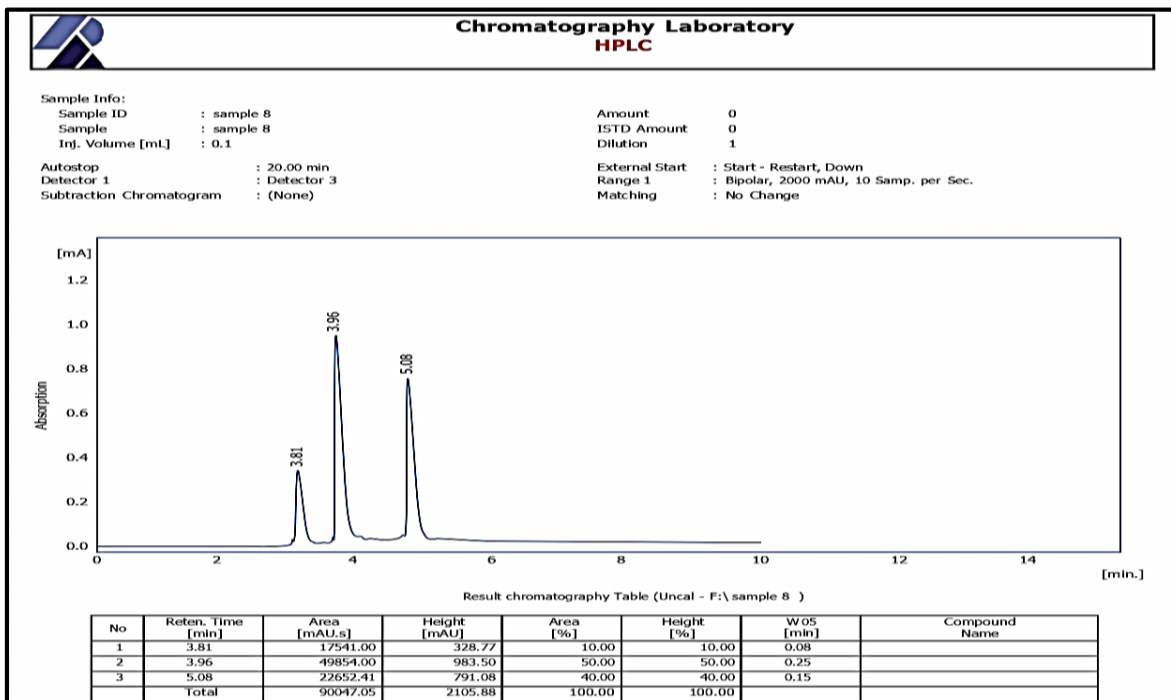
شكل ( 46-4 ) المخطط الكروماتوگرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.tubigensis* + المستحضر الحيوي البكتيري



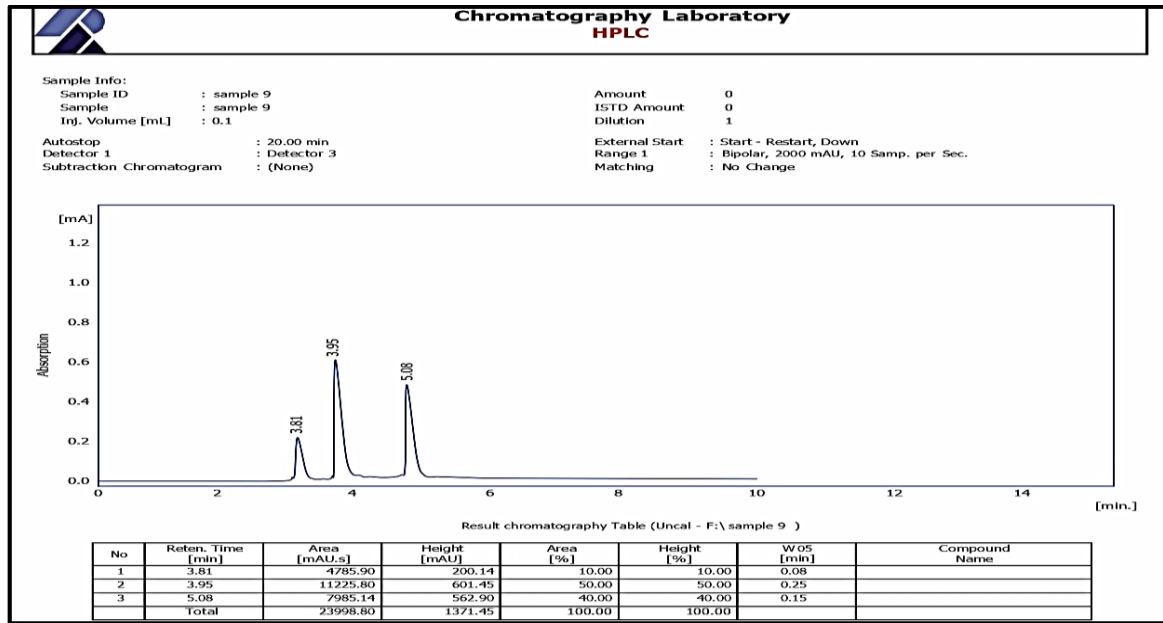
شكل (4-47) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.terrus* + المستحضر الحيوي البكتيري

بينت النتائج ان حبوب الحنطة الملوثة بلقاح العزله الفطرية *A.niger* كانت منتجة للافلاتوكسين B1 اذ بلغ تركيز السم هو (142.9) PPb شكل(4-48) ، في حين الحبوب الملوثة بنفس الفطر مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري فقد كان تركيز السم المسجل يقدر بـ(41.0) PPb الشكل (49-)

(4)

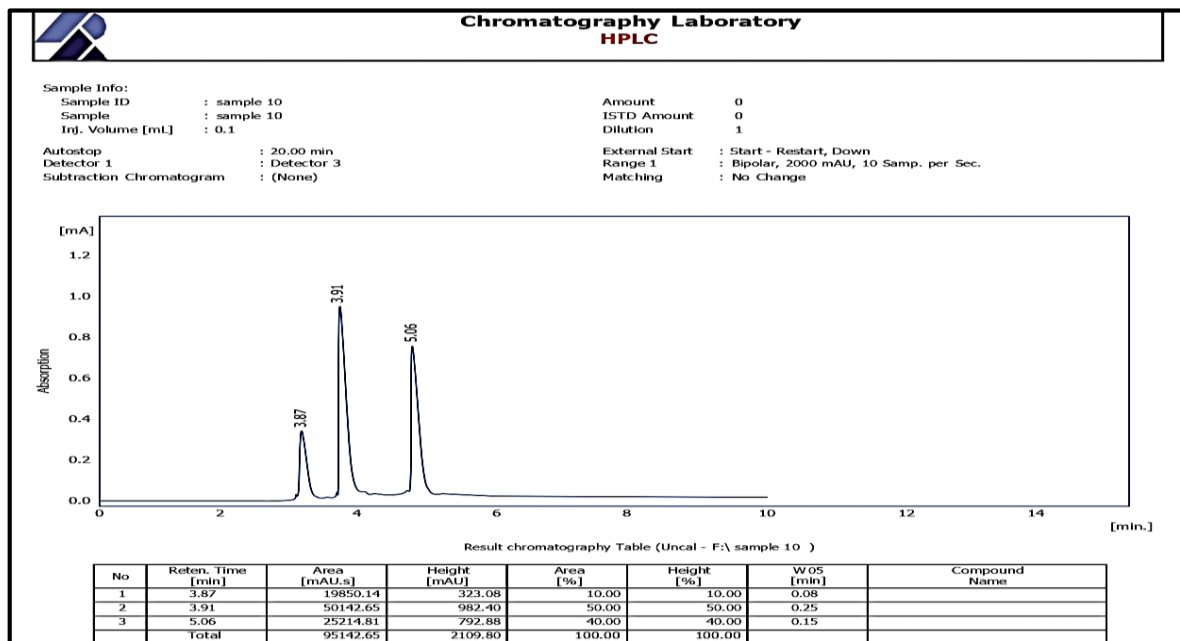


شكل (48-4) المخطط الكروماتوجرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.niger2* فقط

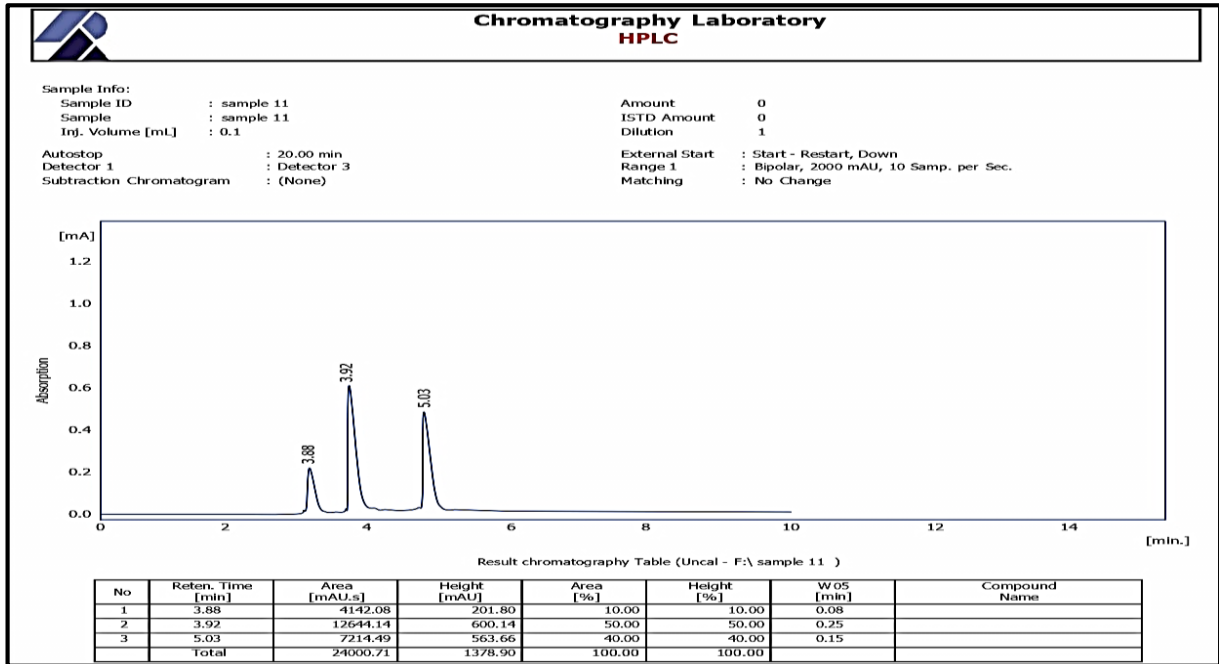


شكل (49-4) المخطط الكروماتوجرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A.niger2* + المستحضر الحيوي البكتيري

أما في الحبوب المعاملة بالفطر *F. equiseti* فقد بلغ تركيز سم الافلا B1 الناتج يقدر بـ (166.9) PPb الشكل (4-50)، بينما كان تركيز سم الافلا B1 الناتج من حبوب ملوثة بالفطر نفسه مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري يقدر بـ (27.9) PPb الشكل (4-51).

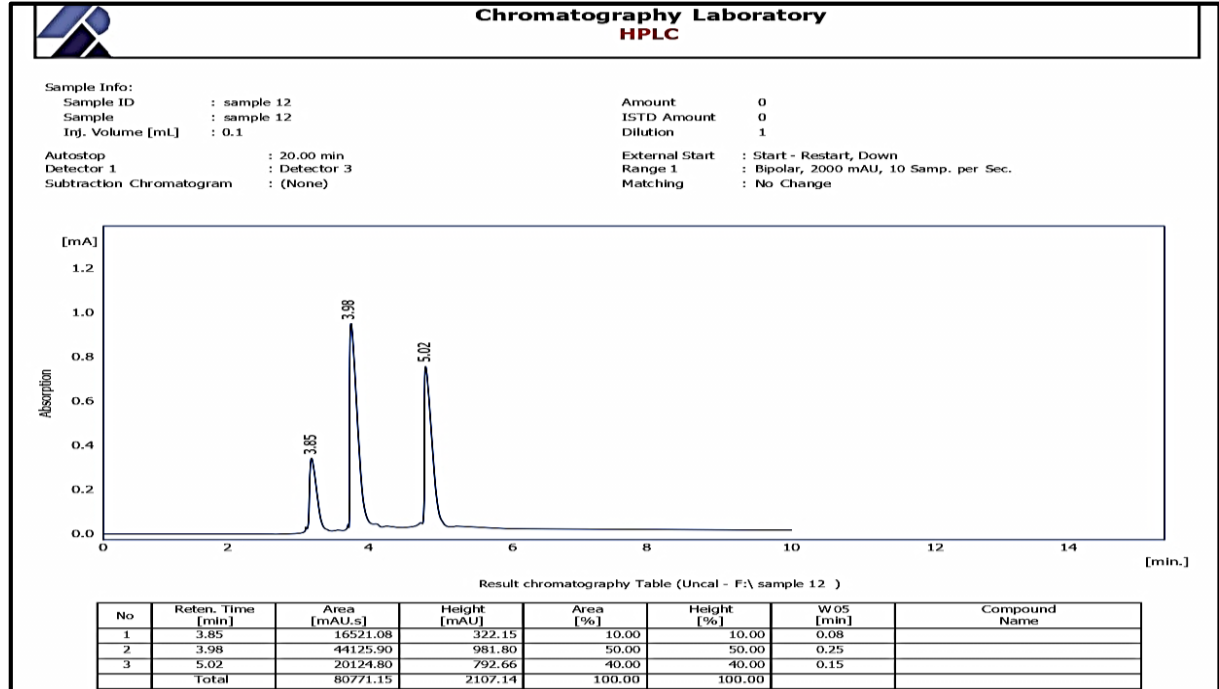


شكل (50-4) المخطط الكروماتوجرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *F. equiseti* فقط

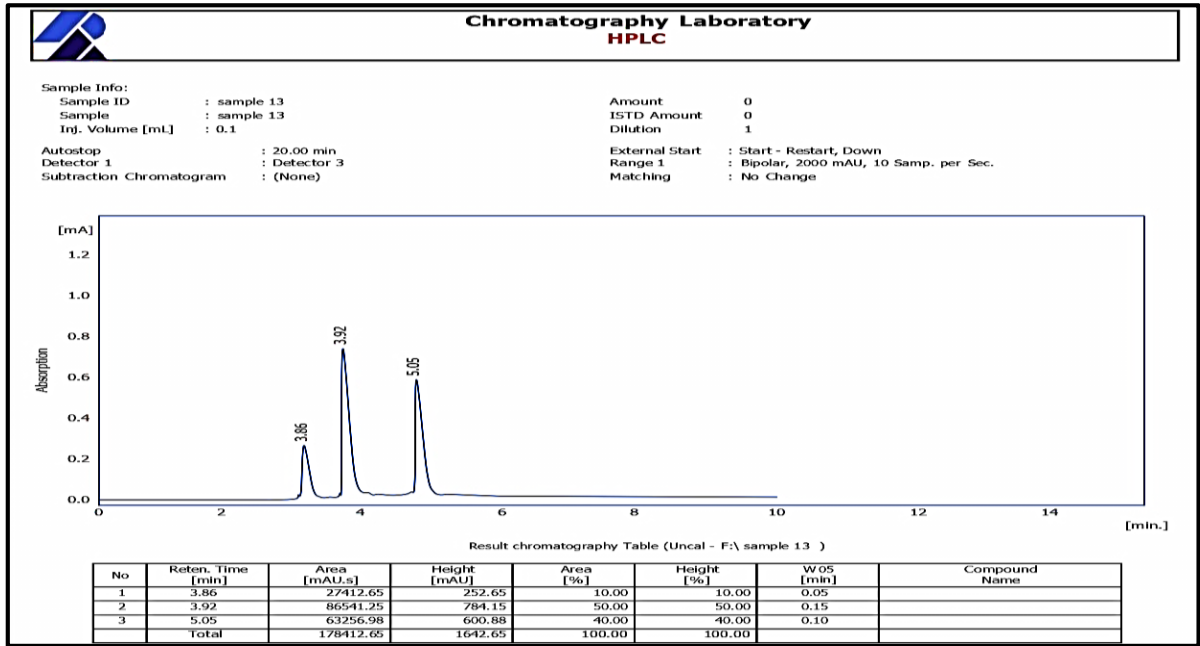


**شكل ( 51-4 ) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *F. equiseti* + المستحضر الحيوي البكتيري**

في حين كان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطر *A. niger* 3 يقدر بـ (4-174) PPb الشكل (4-52)، بينما كان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب ملوثة بالفطر نفسه مع اضافة المستحضر الحيوي البكتيري يقدر بـ (25.6) PPb الشكل (4-53) .

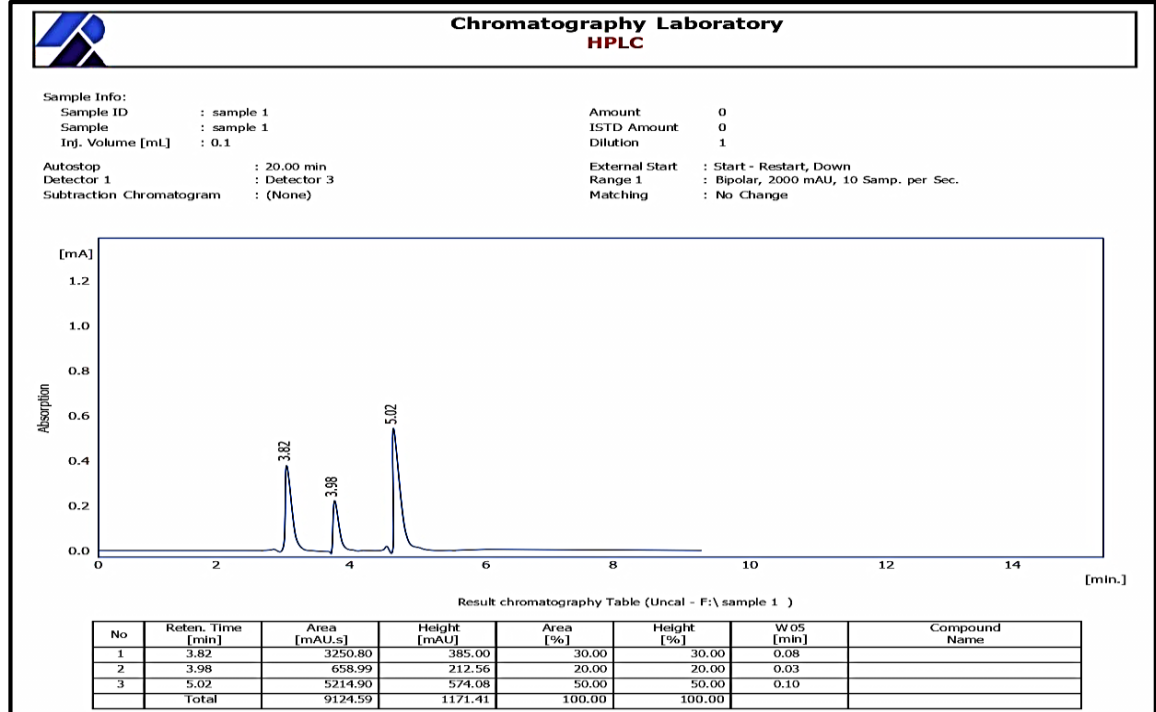


**شكل ( 52-4 ) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *A. niger* فقط**

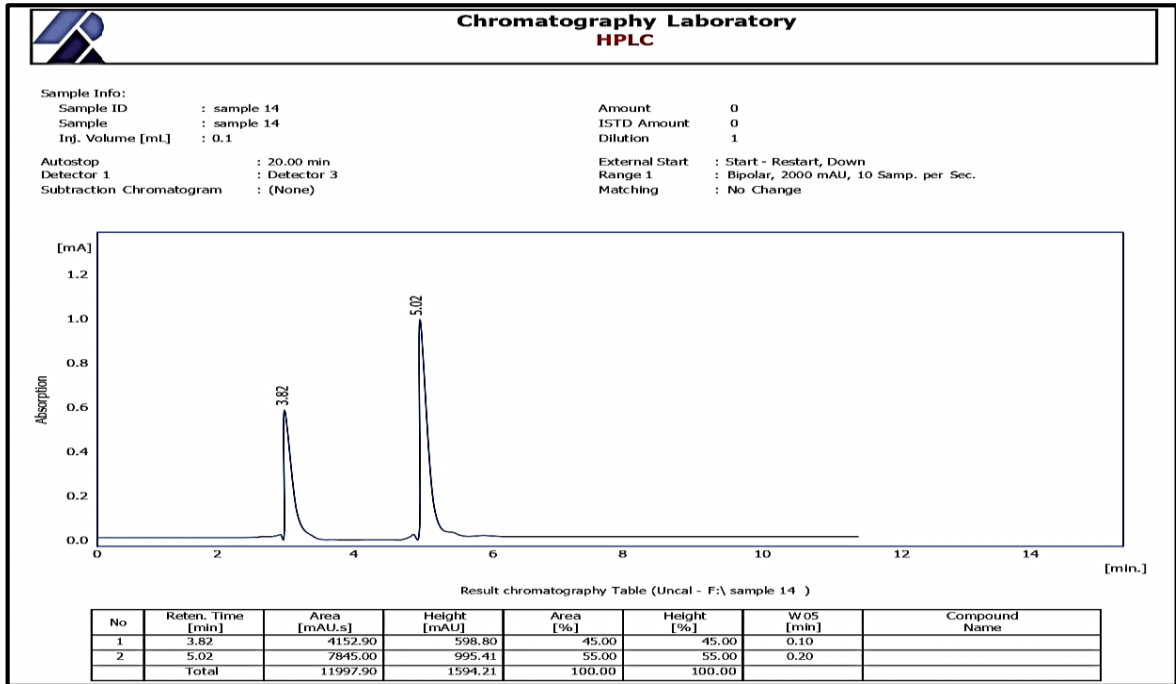


**شكل (4-53) المخطط الكروماتوجرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالفطر *niger3* + المستحضر الحيوي البكتيري**

اظهرت نتائج التقدير الكمي بتقنية HPLC ايضا ان حبوب الحنطة دون اي معاملة (Control) كان تركيز الافلاتوكسين الناتجة يقدر بـ(4.1) PPb الشكل (4-54)بينما كان تركيز الافلاتوكسين الناتج من حبوب الحنطة المعاملة بالمستحضر البكتيري فقط يقدر بـ(0.25) PPb الشكل (4-55) .



**شكل (4-54) المخطط الكروماتوجرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من الحبوب دون اي معاملة (Control)**



### شكل (4-55) المخطط الكروماتوغرافي لتركيز الافلاتوكسين B1 المنتج من حبوب ملوثة بالبكتريا فقط

يتضح بوساطة هذه النتائج ان الفطريات تمتلك ضراوة عالية تمثلت بأحداث نسب عالية من الإصابة في حبوب الحنطة ، في حين كانت في معاملة السيطرة (بذور غير ملوثة باللقاح الفطري) بنسبة ضئيلة بعد مرور ستة اشهر من الخزن ، كما ان بعض الاجناس الفطرية وخاصة جنس *Aspergillus* تمتلك القدرة على النمو في ظروف مختلفة وقدرتها على المقاومة العالية للتنافس والانتشار السريع وذلك بسبب افرازها منتجات افضية ثانوية مثل السموم الفطرية (Al-saraireh واخرون،2015) . توافقت النتائج مع دراسة الراوي (2017) حيث اثبتت قدرة الفطر *Aspergillus spp.* على انتاج الافلاتوكسين وبتراكيز عالية على الرغم من معاملته بمعاملات تثبيطية حيوية ، فيزيائية و كيميائية .

أشارت العديد من الدراسات إلى قدرة أنواع الفطر *Aspergillus spp.* على إصابة حبوب الحنطة فقد وجد Alzwei و آخرون (2006) ان الجنس *Aspergillus spp.* هو السائد بنسبة عالية في أصناف مختلفة من الحنطة المستخدمة في صناعة الغذاء ويستطيع النمو و انتاج السموم الفطرية في وجود محتوى رطوبي منخفض . أيضاً اشارت دراسة Riba واخرون (2008) ان اغلب الاجناس الفطرية التي تصيب الحنطة اثناء الخزن هي *Aspergillus*، *Penicillium* ، *Fusarium* و *Alternaria*. كما اشار سرحان (1995) الى أنواع تابعة للجنس *Aspergillus* مرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء في سايوات مختلفة لمحافظة القادسية . في حين وجد Joshaghani و آخرون (2013) أن اغلب الفطريات المعزولة من حبوب الحنطة المخزونة في ايران كانت *A. flavus* ، *Fusarium spp.* ، *A.niger* ، *Alternaria spp.* ، *Rhizopus spp.* و *Cladosporium spp.* و *Penicillium spp.*

أظهرت نتائج المستحضر الحيوي البكتيري المصنع من بكتريا *A. chroococcum* فعالية عالية في حماية حبوب الحنطة من الإصابة بالفطريات. كما إن المستحضر الحيوي البكتيري وفر حماية لحبوب الحنطة المعاملة به من الإصابة الطبيعية مقارنة مع الحبوب دون اي معاملة (Control). تعود فعالية المستحضر الحيوي البكتيري في اختزال نسب الإصابة في حبوب الحنطة إلى امتلاك البكتريا *A. chroococcum* لآليات عديدة تمكنها من تثبيط نمو الفطريات الممرضة ومن أهم هذه الآليات إنتاج مركبات عضوية ومواد ايضية واندول حامض الخليك وبعض الأنزيمات التي تمتلك القدرة على تحلل جدران الخلايا الفطرية وبالتالي تثبيط نمو الفطريات ومن هذه الأنزيمات Glucanase، Chitinase و laminarinase (Sarhan و Omar، 2012، El-Tarabily و Sivasithamparam، 2006).

تنتج بكتريا *A. chroococcum* بعض المضادات الحيوية مثل Herbicolin ، Phenazin و Pyoluteorin ، ان هذه المضادات الحيوية تعمل على تثبط نمو وإنبات الابواغ الفطرية مما يؤدي إلى منع او تقليل حدوث الإصابات الفطرية للحبوب ومنها الحنطة وخاصة في المخازن التي تتعدم فيها شروط الخزن الجيدة ، إذ ترتفع الرطوبة النسبية اثناء فصلي الخريف والشتاء عن مستوياتها في فصل الصيف وهذا سوف يساعد البكتريا الموجودة على أسطح الحبوب بالنمو السريع نتيجة حصولها على الغذاء من نواضح الحبوب وبالتالي تقوم بإنتاج المضادات الفطرية والإنزيمات المحللة ، وايضا تنتج مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة تعمل على مقاومة الفطريات ( Muslim و اخرون ، 2021). وتعمل على منع وصول المسبب المرضي وذلك بمنافستها على المكان والمواد الغذائية وحماية النبات من الاصابة بالأحياء الممرضة (Jensen، 2021).

تساهم كربونات الكالسيوم (الحاملة للقاح بكتيريا *A. chroococcum*) بشكل كبير في فعالية المستحضر الحيوي في تثبيط نمو الفطريات عن طريق خفض محتوى الرطوبة في الحبوب إلى مستوى يمنع إنبات وتطور جراثيم الفطريات حيث تعمل هذه المادة على امتصاص الرطوبة من خلال اختلاف سعة الرطوبة بينها وبين الحبوب، حيث لا ترطب بسرعة (الكبيسي 1989).

توافقت نتائج الدراسة مع نتائج الباحث Kumar و اخرون (2020) إذ وجد ان استخدام كربونات الكالسيوم كحامل لـ *A. chroococcum* يؤدي إلى تقليل أعداد الفطريات في التربة، وبالتالي تحسين صحة النبات، ايضا اشارت دراسة Khan و Zaidi (2006) ودراسة Rashid و اخرون (2020). ان كربونات الكالسيوم تعزز قابلية بقاء البكتريا *A. chroococcum*، والتي يمكن أن تتفوق على أو تمنع نمو الفطريات عبر آليات مختلفة، مثل إنتاج مستقلبات مضادة للفطريات وبالتالي حماية الحبوب المخزنة مثل القمح من مسببات الأمراض الفطرية . كما ان تطبيق *A. chroococcum* مع كربونات الكالسيوم يقلل من الإصابة الفطرية في الحبوب المخزنة، ويحسن جودتها ومدة صلاحيتها (Khan و اخرون، 2017).

تعمل غالبية العوامل البيولوجية المستعملة في برنامج مكافحة البيولوجية على تقييد نمو الفطريات المسببة للأمراض والتي تنتج السموم داخل الغذاء، ولكنها لا تقضي عليها حيث تظل بعض الخلايا الفطرية قابلة للنمو، فعند زراعة المادة الغذائية المصابة بالفطريات (الحبوب ، البذور والمواد الغذائية المصنعة) على وسط نمو مثل PDA يظهر نمو للفطر على المواد الغذائية مع انخفاض او عدم انتاج السموم الفطرية ، وهذا يعني ان الفطر يبقى موجودا في مناطق محدودة صغيرة دون ان ينتشر (Martín واخرون، 2022) .

## الاستنتاجات Conclusions

- 1- كشفت نتائج العزل عن تلوث الحبوب المخزونة في السايلوات قيد الدراسة بالعديد من الفطريات وسمومها الفطرية
- 2- انتشار وسيادة الفطر *Aspergillus spp.* حيث سيطر بنسبة 100% من جميع حبوب الحنطة المحلية والمأخوذة من سايلوات مختلفة .
- 3- أشار التحديد الجزيئي باستعمال تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR إلى أن العزلات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسين B1 كانت متوافقة مع العزلات العالمية في بنك المعلومات الجيني.
- 4- ان استعمال تقنية التعبير الجيني Real-Time PCR في دراسة إنتاج الأفلاتوكسين B1 يسمح بالكشف المبكر عن الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين في الحبوب، مما يسهل اتخاذ التدابير الوقائية . كما يساعد في فهم الجينات التي تلعب دوراً رئيساً في هذه العملية .
- 5- يعمل المستحضر الحيوي البكتيري بشكل فعال على تثبيط نمو الفطريات وإنتاج الأفلاتوكسين B1 للحبوب المعاملة بالمستحضر البكتيري .

## التوصيات Recommendation

- 1- دراسة الجينات الأخرى التي لها علاقة وثيقة بتكوين الافلاتوكسين ، ومن هذه الجينات aflR و aflP.
- 2- تطبيق المستحضر الحيوي البكتيري على الحبوب المخزنة في المخازن التجارية لتجنب التلوث والعدوى الفطرية، حيث يعمل كمواد حافظة بشكل فعال.
- 3- دراسة تأثير المستحضر الحيوي البكتيري على أنواع إضافية من الفطريات الممرضة.
- 4- اختبار السلامة الصحية للمستحضر الحيوي لتحديد مدى سلامته على الأنظمة البيولوجية للحيوانات المختبرية ، مما سيكون بمثابة مؤشر على سلامته للإنسان .
- 5- إعادة النظر في ظروف وطرائق وتقنيات تخزين الحنطة بما يجنب اصابتها بالفطريات وسمومها .

## المصادر العربية ARABIC REFERENCES

- ✚ ابو عرقوب ، محمود موسى. (2000) . المقاومة الحيوية لمرض النبات . المكتبة الأكاديمية ، القاهرة . 684 ص .
- ✚ الاسدي، دعاء فائق (2023) . التوصيف المظهري والجزيئي لعزلات الفطريات المرافقة للمكسرات والحبوب المنتجة لسم الافلاتوكسين B1 وامكانية توظيف بكتريا *Bacillus subtilis* في اختزال سميته . اطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء
- ✚ الاسدي، دعاء فائق علي محمد. (2013). التوظيف الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* في السيطرة على إصابة حبوب بعض المحاصيل الاقتصادية بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* . رسالة ماجستير. كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء.
- ✚ اسماعيل ، عدي نجم .(2014) . السموم الفطرية النظرية والمفهوم العام . دار الكتب و الوثائق .العراق – بغداد :248 ص .
- ✚ اسماعيل خليل ابراهيم .(2007) . السموم الفطرية او سموم الاعفان . دار الكتب العلمية ، بيروت . الطبعة الاولى ، صفحة 208 .
- ✚ الجميلي ،سامي عبد الرضا .(1996) .المقاومة المتكاملة ضد الاصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل .اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة – جامعة بغداد .ص 87.
- ✚ الجميلي ، سامي عبد الرضا علي.(2014) . السموم الفطرية (Mycotoxins) دار الكتب للطباعة والنشر – العراق.
- ✚ الحميري، كمال عبد الكريم عباس ظاهر .(2020).التحري عن الفطر *Aspergillus flavus* المرافق لحبوب الارز المحلية والمستوردة في السوق العراقية وامكانية اختزال سم Aflatoxin B1 بمواد نانوية وطرق فيزيائية.رسالة ماجستير. كلية الهندسة الزراعية،جامعة بغداد.
- ✚ الراوي ،علي عبد علي ورمضان ، نديم احمد والعراقي ، رياض احمد (2010) . عزل الفطريات المصاحبة لحبوب الذرة وتحديد الأنواع المنتجة للأفلاتوكسينات، مجلة علوم الرافدين، المجلد 22 ، العدد 1 ، ص13-22 .
- ✚ الراوي، خاشع و خلف الله ، عبد العزيز. (1980). تصميم وتحليل التجارب الزراعية. دار الكتب للطباعة والنشر ،جامعة الموصل. ص 488.

- ✚ الراوي، خاشع محمود (2000) . مدخل الى الاحصاء ، الطبعة الثانية ، كلية الزراعة والغابات ، جامعة الموصل .
- ✚ الراوي، منى عبد الرحمن،(2017).تشخيص الجين المسؤول عن انتاج سم الافلا B1 في الفطر *Aspergillus flavus* واختبار الفضة النانوية في اختزاله .رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد . ص50 .
- ✚ الساعدي، ابتسام بشير كاظم (2012). توصيف عزلات الفطر *Aspergillus spp.* الحاملة لجين aflR وإمكانية الحد من إصابتها لبعض الأغذية في أسواق النجف الأشرف . رسالة ماجستير، كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- ✚ الساعدي، هادي علوان محمد شكير(2004). تقويم كيميائي واحيائي لفعالية اليوريا في معالجة كسبتي زهرة الشمس والقطن الملوثة بالافلاتوكسين B1 . اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة. جامعة بغداد.
- ✚ العاشور ، علي جابر جاسم .(2005) . إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- ✚ العامري ،علاء طالب سالم .(2021) . التشخيص الجزيئي للبكتريا المسببة لمرض التعفن الطري على البطاطا في محافظتي كربلاء وبابل ومقاومتها باستعمال بعض العوامل الأحيائية و المركبات النانوية . رسالة ماجستير، كلية الزراعة- جامعة كربلاء .
- ✚ العاني، فانز (1998) . الاحياء الدقيقة في الاغذية والتقنيات الحديثة في الكشف عنها .قسم علوم الحياة ،كلية العلوم، جامعة اهل البيت ، الطبعة الاولى .
- ✚ العروسي ، حسين وسمير ميخائيل ومحمد علي عبد ال-رحيم (2001) . أمراض النبات، منشأة المعارف الإسكندرية.
- ✚ الفيتوري، نجاح عمر؛ الزوي، طاهر عمر والجري، عمي مختار(2015). عزل و تعريف أجناس الفطريات المصاحبة لحبوب القمح المستورد لبعض المصانع الليبية . *Annals of Agric. Sci., Moshtohor* .Vol. 53(2) .363–372.
- ✚ الفيصل ، هبه قاسم حميد .(2005) . التحري عن سموم الافلا B1 وB2 و الاوكراتوكسين A و السترينين في الحبيبة والبرغل والجريش . رسالة ماجستير / كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- ✚ الكبيسي، نوري حمد ارزيك (1989). تأثير كربونات الكالسيوم على بعض صفات التربة الفيزيائية والمعدنية. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بغداد. ص94.

- ✚ الكعبي، حوراء نعمة حسين. (2013). فعالية عوامل احيائية وكيميائية ضد الفطر *Fusarium solani* المسبب لمرض تعفن جذور الشليك . رسالة ماجستير .الكلية التقنية المسيب .
- ✚ المرعاوي، عدنان عبدالله و الجراح، نيران سالم و اسماعيل، عدي نجم.(2013). مكافحة مرض التعفن الفحمي على الباقلاء ببيكتريا *Azospirillum brasilense* . مجلة العلوم الزراعية العراقية(44):4: 472-479.
- ✚ النزال ، أحمد إسماعيل أحمد . (1996) . التحري عن الافلاتوكسينات في الرز المحلي والمستورد وتقويم بعوض طورق إزالة سميتها . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة بغداد 121 صفحة.
- ✚ الهاشمي .هدى عبد الرضا عبد الله . (2014) . المعالجة الاحيائية لبعض السموم البيئية باستخدام بعض انواع البكتريا . اطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة كربلاء.
- ✚ بلكرامي .ك. س. و. و فيرما. ن. ر (1988).فسلجه الفطريات (ترجمة سرحان، عبد الرضا طه وفياض محمد شريف). دار الكتب لطباعة والنشر مطبعة جامعة البصرة.595 صفحہ.
- ✚ حميد ، سميرة كاظم . (2001). تقنية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة *Pseudomonas fluorescens* CHAO . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- ✚ دخيل، فيد عباس . (2021) . التكامل بين العوامل الأحيائية والمبيدات الكيميائية في السيطرة على مسببات امراض جذور نباتات الزينة في مشاتل محافظتي كربلاء وبابل، رسالة ماجستير، كلية الزراعة/جامعة كربلاء/العراق.
- ✚ دخيل، فيد عباس. (2021) . التكامل بين العوامل الأحيائية والمبيدات الكيميائية في السيطرة على مسببات امراض جذور نباتات الزينة في مشاتل محافظتي كربلاء وبابل ، رسالة ماجستير، كلية الزراعة/جامعة كربلاء/العراق.
- ✚ سرحان، عبد الرضا طه. (1995). الفطريات المصاحبة للحبوب المخزونة في سايلو محافظة القادسية، مجلة القادسية، المجلد، العدد 1: 19: 24.
- ✚ شيحان ،صفا جميل . (2022) . فاعلية مكافحة المتكاملة في السيطرة على بعض مسببات مرض تعفن جذور نبات عرف الديك *Celosia argentea* . رسالة ماجستير. كلية الزراعة - جامعة كربلاء .
- ✚ عبد الحميد، عبد الحميد محمد(2000). الفطريات والسموم الفطرية .كلية الزراعة- جامعة المنصورة.313 صفحة .
- ✚ علي، صادق محمد (2017).تقييم كفاءة المبيد الحيوي Baiarovin في تثبيط نمو عزلة الفطر *Aspergillus flavus* والقدرة على انتاج سم Aflatoxin B<sub>1</sub>.مجلة الكوفة للعلوم الزراعية. قسم وقاية النبات. كلية الزراعة. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.9(3):155-138.

✚ عواد، كاظم مشحوت. (1986). مبادئ كيمياء التربة. دار الكتب للطباعة والنشر-جامعة الموصل. 296 صفحة .

✚ منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة ( FAO) Food and Agriculture

Organization Of the united Nations (2013). موجز منظمة الأغذية

والزراعة عن امدادات الحبوب والطلب عليها .

✚ نخيلان، عبد العزيز مجيد.(2011). السموم الفطرية Mycotoxin . دار دجلة .المملكة

الاردنية الهاشمية –عمان :320ص.

✚ نعمة، عبد عقيل(2011). التحري عن بعض الفطريات المنتجة للافلاتوكسين في بعض

الاغذية ومحاولة تقليل اضرارها باستخدام بعض المستخلصات النباتية والفيتامينات. رسالة

ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة كربلاء.

✚ وحيد، اياد قحطان ووحيد رشيد حسن، وبالسّم احمد عباس ، وحيد حميد نوار. ( 2014 ) .

تقييم السلالات البكتيرية المحفزة لنمو النبات ضد الفطر *Rhizoctonia solani* على نباتات

الباذنجان . Solanummelongena L.J.of Bio.Res.. عدد خاص .

## المصادر الاجنبية FOREIGN REFERENCES

- ✚ -Aasfar, A.; Bargaz, A.; Yaakoubi, K.; Hilali, A.; BY.; and Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing Azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. Frontiers in microbiology, 12, 354.
- ✚ Aba alkail,A.(2005).Antifugal activity of som extract against some plant pathogenic fungi,pakistan Journal of Biological science.8:413-417.
- ✚ Ababutain, M.I. (2011). Aeromycoflora of some eastern provinces of Saudi Arabia. Indoor Built Environ .
- ✚ Abbas, A. and Dobson, A. D. W. (2011). Encyclopedia of Dairy Sciences. Second edition. Academic Press. Chapter: Yeasts and Molds. pp: 776-779.

- ✚ **Abdel Hafez , S.I.I. (1981)** . Halophilic fungi of desert soils in Saudi Arabia . Mycopathologia 80 : 914.
- ✚ **Abdel-Hadi, A.; David, C. and Naresh, M. (2011)**. Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* group contaminating Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques World Mycotoxin Journal .Vol 4, 69-77.
- ✚ **Abdel-Kader, M. M., El-Mougy, N. S., Khali, M. S. A., and ElGama, N. G. (2021)**. Biocontrol Agents for Controlling Wheat Root Rot Disease under Greenhouse Conditions. Indian Journal of Agricultural Research, 55(2).
- ✚ **Abdel-Motaal, M. I., et al. (2021)**. Microscopic characteristics of *Aspergillus tubingensis*: A comprehensive study on conidiation and hyphal morphology. Fungal Biology Reviews, 39(2), 81-92 .
- ✚ **Abdullah , S.K. and ALBader , S.M. (1990)** . On the thermophilic and Thermotolerant Mycoflora of Iraqi soils . Sydowia, 42:17.
- ✚ **Agrios, George N. (2005)**. Plant Pathology: Fifth Edition. Elsevier Academic Press. p. 922. ISBN 978-0-12-044565-3 .
- ✚ **Al -Saraireh, H., Al -Zereini, W. A., and Tarawneh, K. A. (2015)**. Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from South Al-Karak, Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences, 8 (2).162-173 .
- ✚ **AL-azawy ,A.Q.W. (2010)**. Efficiency of interaction between *Azotobacter* sp. and *arbuscular mycorrhizal* fungi for their potential to stimulate tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant resistance to root rot disease .Diss.College of Science- Baghdad Univ .112pp.
- ✚ **Al-Doory, Y., Tolba, M.K. and Al-Ani , H . (1959)**. On the fungal flora of Iraqi soils .II. Central Iraq .Mycologia ,51 ,429-439.
- ✚ **Al-Garni, S.M.; Kabli ,S.; Al-Shehrei, F. and Al- Ganawi, Z. ( 2007)**. Mycoflora associated with some textiles in Jeddah City. JKAU, 19: 93-113.

- ✚ **Ali, R. ; Hameed ,Z. H. ; Hussain, A. F. and Hamu, A. H .(2019)** .Evaluation effectiveness of fluconazole and Mirabilis jalapa extract against some pathological fungi. *Biochem. Cell. Arch.* 19, 2467-2473.
- ✚ **Almeida, A. P., Corrêa, B., Mallozzi, M. A., Sawazaki, E., and Soares, L. M. V. (2000).** Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 321-326.
- ✚ **Alsudani,A.A.;Al-Awsi,G.R.L.( 2020).** Biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Kühn) and *Fusarium solani* (Marti) causing damping-off disease in tomato with *Azotobacter chroococcum* and *Pseudomonas fluorescens*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*,( 23): 1456-1461.
- ✚ **Alwakeel, S.S. (2008).** Indoor fungal and bacterial contaminations on household environment in riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.*, 15: 113-119.
- ✚ **Alwan, S. L., and Hussein, H. N. (2019).** Efficacy of ecofriendly biocontrol *Azotobacter chroococcum* and *Lactobacillus rhamnosus* for enhancing plant growth and reducing infection by *Neoscytalidium* spp. in fig (*Ficus carica* L.) saplings. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*, 6(1), 16-25.
- ✚ **Alzwei, A. O. ; Aidoo, K. E. and Candlish, A. A. (2006).** Studies on the mycoflora and formation of mycotoxins in different cultivars of local wheat used in food fermentation. *Journal of Sebha University Pure and Applied Sciences*, 5:33-41.
- ✚ **Anderson, B and Thrane, U. (2006).** "Food-borne fungi in fruit and cereals and their production of mycotoxins". *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 571.* pp. 137–152 .

- ✚ **Arakawa M, Someno T, Kawada M, Ikeda D. (2008).** A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J Antibiot* 61:442–448. 10.1038/ja.2008.60.
- ✚ **Arias, R. S., Dang, P. M., & Sobolev, V. S. (2015).** RNAi-mediated control of aflatoxins in peanut: method to analyze mycotoxin production and transgene expression in the peanut/*Aspergillus* pathosystem. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (106), 53398.
- ✚ **Arseculeratne, S. N.; Desiva, L. M.; Wijesundera, S. and Bandunatha, C. H. S.(1969).** Coconut as a medium for the experimental production of laryoxin. *J. Appl. Microbiol.*, 18:88-94 .
- ✚ **Arukwe, A., Nordtug, T., Kortner, T. M., Mortensen, A. S., and Brakstad, O. G. (2008).** Modulation of steroidogenesis and xenobiotic biotransformation responses in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to water-soluble fraction of crude oil. *Environmental Research*, 107(3), 362–370.
- ✚ **Asaoa, T . ; Buchi , G . ; Abdel Kader , M . ; Chang , S . B . ; Wick , E . L. and Wogan , G.N. (1963).** Aflatoxin B and G. *Chem.Soc.*, 85:1706-1707.
- ✚ **Aydi-Ben-Abdallah, R.; Jabnoun-Khiareddine, H.; and Daami-Remadi, M. (2020).** *Fusarium* wilt biocontrol and tomato growth stimulation, using endophytic bacteria naturally associated with *Solanum sodomaeum* and *S. bonariense* plants. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-13.
- ✚ **Ayalign and De Saeger S.(2020)** .Mycotoxins in Ethiopia: Current status, implications to food safety and mitigation strategies. *Food Control.*;113:107163.
- ✚ **Balajee, S. (2009).** *Aspergillus terreus* complex. *Medical Mycology*. 47 (Supplement 1), S42-S46 .
- ✚ **Balina A, Kebede A, Tamiru Y, (2018).** Review on Afltoxin and its Impacts on Livestock. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences*.6(2).

- ✚ **Bangratz, M.; Wonni, I.; Kini, K.; Sondo, M.; Brugidou, C.; Béna, G. and Tollenaere, C. (2020).** Design of a new multiplex PCR assay for rice pathogenic bacteria detection and its application to infer disease incidence and detect co-infection in rice fields in Burkina Faso. *Plos one*, 15(4):1-13.
- ✚ **Baquião AC, Rodrigues AG, Lopes EL, Tralamazza SM, Zorzete P and Correa B. (2016).** Expression of genes by aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil Nuts. *Foodborne Pathog Dis.* 13(8):434-40.
- ✚ **Bars, J. Le (1979).** "Cyclopiazonic acid production by *Penicillium camemberti* Thom and natural occurrence of this mycotoxin in cheese". *American Society for Microbiology.* 38 (6): 1052–1055 .
- ✚ **Bayman, P., et al. (2002).** "Ecology of Aflatoxins." *Food Research International*, 35(4), 361-368.
- ✚ **Benjamin CR. (1955).** "Ascocarps of *Aspergillus* and *Penicillium*". *Mycologia.* 47 (5): 669–87 .
- ✚ **Bennett, JW (2010).** "An overview of genus . *Aspergillus*". In Masayuki Machida; Katsuya Gomi (eds.). *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics.* Horizon Scientific Press. ISBN 978-1-904455-53.
- ✚ **Bennett, J. and Klich, M. C. (2003).** Mycotoxins. *clinical microbiology Reviews.* 16: 497-516.
- ✚ **Bhatnagar, D. ; Yu, J. and Ehrlich, K. C. (2002)** .Toxins of filamentous fungi . *Chem. Immunol.*, 81:167-206 .
- ✚ **Bhatnagar, D.; Miller, J.D.; Schaafsma, A.W.;; Bondy, G.; Carbone, I.; Harris, L.J.; Harrison, G.; Munkvold, G.P.; Oswald, I.P.; Pestka, J.J. and Sharpe, L. (2014).** Mycotoxins that affect the North American agri-food sector: state of the art and directions for the future. *World Mycotoxin Journal*, 7(1): 63-82.

- ✚ **Black,C.A. (1965).** Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological properties. Am. Soc. Agron., Inc. Madison, Wisconsin,USA .
- ✚ **Booth T.;Gorrie,S and Muhsin ,T.M.(1988).** Life strategies among fungal,assemblages on salicornia europaca agg.Mycologia,80:176-191.
- ✚ **Booth, C. (1971).** The Genus *Fusarium*. Kew: Commonwealth Mycological Institute.
- ✚ **Botana, L. and Sainz, M. (2015).** Climate change and mycotoxins. Berlin, Boston: Walter de Gruyter .
- ✚ **Bottalico, A., and Perrone, G. (2002).** *Alternaria* spp.: A review of the main mycotoxins and their effects on human health. Mycotoxin Research, 18(4), 150-156 .
- ✚ **Bullerman , L. B. ( 1981 ) .** Public health significant moulds and mycotoxin in fermented dairy products . *J . Dairy Sci. , 64 : 2439 – 245.*
- ✚ **Campagnollo, F.B.; Ganev, K.C.; Khaneghah, A.M.; Portela, J.B.; Cruz, A.G.; Granato, D.; Corassin, C.H.; Oliveira, C.A.F.; Sant'Ana, A.S. (2016) .**The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. Food Control . 68, 310–329.
- ✚ **Cappelli .A. ; Oliva. N. and Cini; E. (2020) .** Stone milling versus roller milling: A systematic review of the effects on wheat flour quality, dough rheology, and bread characteristics. Trends in Food Sci. Tech. 97, 147-155.
- ✚ **Cary, J. W., Rajasekaran, K., Jaynes, J. M., and Cleveland, T. E. (2015).** "Biology of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin contamination," In Foodborne Fungal Pathogens: Toxicology, Ecology, and Control, Elsevier .

- ✚ **Cary, J. W., et al. (2005).** \*Regulation of Aflatoxin Biosynthesis in Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus\*. \*Mycopathologia\*, 159(3), 265–277. DOI: [10.1007/s11046-005-3048-3] .
  
- ✚ **Case, R.J., Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W. F. Doolittle and S. Kjelleberg, (2007).** Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. Appl. Environ. Microbiol. 73(1): 278–288 .
  
- ✚ **CAST (Council for Agricultural Science and Technology).(2003).** Mycotoxins:Risks in Plant, Animal and Human Systems . Task Force Report No. 139 .
  
- ✚ **Cappelli A, Oliva N and Cini E (2020).** Stone milling versus roller milling: A systematic review of the effects on wheat flour quality, dough rheology, and bread characteristics. Trends in Food Sci. Tech. 97, 147-155.
  
- ✚ **Cellier, G.; Redondo, C.; Cubero, J.; Roselló, M.; de Andrade, E.; Cruz, L. and Yaseen, T. (2020).** Comparison of the performance of the main real-time and conventional PCR detection tests for ‘Candidatus Liberibacter’ spp.. European Journal of Plant Pathology volume, 157:919–941 .
  
- ✚ **Chang , S . B . ; Abdel-Kader , M . M ; Wick , E.L. and Wagon , G . N . (1963) .** Aflatoxin B2 : Chemical identity and biological activity . Science .,142:1191-1192.
  
- ✚ **Charles thom .(1945) .** A MANUAL OF ASPERGILLUS . THE WILLIAMS and WILKINS COMPANY Baltimore, Md., U. S. A. 373 pages .
  
- ✚ **Chattha, S. H, Hasfalina C .M, Mirani, B. N, Mahadi, M. R. and Lee, T. S .(2016) .** Food grain losses associated with indigenous storage methods and development of storage facilities for food security. Int. Food Res. J. 23.

- ✚ **Chauhan .N. M.; Washe. A .P. and Minota. T. (2016) .** Fungal infection and aflatoxin contamination in maize collected from Gedee zone, Ethiopia. SpringerPlus. Springer Plus 5(1), 753.<https://doi.org/10.1186/s40064-016-2485-x>.
- ✚ **Cheeseman, K.; Ropars, J.; Renault, P.; Dupont, J.; Gouzy, J.; Branca, A. and Brygoo, Y. (2014).** Multiple recent horizontal transfers of a large genomic region in cheese making fungi. Nature communications, 5(1), 2876.
- ✚ **Chen. YC, ;Wong. CL, Muzzi F.; Vlaardingerbroek I; Kidd BN, Schenk PM. (2014).** Root defense analysis against *Fusarium oxysporum* reveals new regulators to confer resistance. Scientific Reports 4, 5584.
- ✚ **Christensen , C . M . (1965) .** Fungi in cereal grains and their products in Food stuffs . Press . Cambridge . Massachusetts .
- ✚ **Ciegler , A ., Burmeister , H. R., Vesconder , R . F . D and Hesseltine , C . W., (1981) .** Mycotoxins and Nitoso compound : Environmental risks. CRC press Vol 1:1 – 51.
- ✚ **Clark, F. E., (1965).** Agar-plates method for total microbial count. C. F: Black, 1965. Method of soil analysis part. 2. Publisher Madison Wisconsin U.S.A. PP. 1572.
- ✚ **Clear, R.M., Patrick, S.K., Gaba, D. Abramson, D. and Smith, D.M. (2005 ).** Prevalence of fungi and fusariotoxins on hard red spring and amber durum wheat seed from western Canada, 2000 to 2002. Can. J. Plant Pathol. 27: 528–540.
- ✚
- ✚ **Cocker, R.D. ; Jones, B.D.; Nagler,M.J. and inpart, Gillman, G.A., Walbridge, G.A. and Pangrahi,A.J. (1984).** Mycotoxin training manual. Tropical development and Research Institute Overseas development administration.  
35 pp.

- ✚ **Collee, J.G, Fraser, A.G.; Marmion, B.P.and Simmons, A. (1996).** Practical Medical Microbiology.14th ed. Churchill Livingstone, London.pp.:106-716.
- ✚ **Cotty, P.J. and Bayman, P. (1993).** Competitive exclusion of a toxigenic strain of *A. flavus* by an atoxigenic strain.Phytopathology, 83, 1283. (Abstract) .
- ✚ **Creppy, E. E. (2002).** Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127(1-3), 19-28.
- ✚ **Cruz, R. (2014).** Guía para el diagnóstico de laboratorio de enfermedad fúngica invasora por hongos filamentosos. Rev. Chilena Infectol. 31:173-179 .
- ✚ **Curtis, T.Y.; Muttucumaru, N.; Shewry, P.R.; Parry, M.A.J.; Powers, S.J.;Elmore, J.S.; Mottram, D.S.; Hook, S. and Halford, N.G. (2009).**Effects of genotype and environment on free amino acid levels in Wheat grain: implications for acrylamide formation during processing. J. Agric.Food Chem. 57:1013–1021.
- ✚ **Davis , N.D ; Dinner, U.L. and Eldridge, D.W .(1966) .** Production of aflatoxin B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in semi synthetic medium . Appl. Microbiol. 14: 378 -380 .
- ✚ **Dehghan P, Zaini F, Rezaei S, Jebali A, Kordbacheh P and Mahmoudi M.( 2008) .** Detection of Aflr gene and toxigenicity of *Aspergillus flavus* group isolated from patients with fungal sinusitis. Iran J Public Health. 37(3):134-41.
- ✚ **Deniel, P.; Rey, M.; cherif, A.; Guillou, and . Y. Tirilly. (2004).** Indige – nous description of *Bacillus subtilis* subsp. inaquosorum subsp. nov.
- ✚ **Dileep, K. V., and Shukla, M. (2019).** Interaction of soil pH and nutrient availability with *Azotobacter* species. Journal of Microbial and Biochemical Technology, 11(4), 256-263 .
- ✚ **Dijksterhuis, J. (2007).** Heat-resistant ascospores. In *Food Mycology* (pp. 115-132). CRC press.

- ✚ **Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. (1980).** Compendium of Soil Fungi (Vol. I and II). Academic Press .
- ✚ **Dox, Arthur Wayland (1910).** *The Intracellular Enzymes of Penicillium and Aspergillus.* U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Animal Industry. p. 70.
- ✚ **Dyer, P. S., et al. (2022).** "Evolution of antifungal resistance in Aspergillus species." *Fungal Genetics and Biology*, 148, 1-10 .
- ✚ **Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., and Arora, N. K. (2019).** Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in microbiology*, 10, 2791.
- ✚ **El Khoury, A. and Atoui, A. (2010).** Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular. Status. *Toxins*, 2:461-493.
- ✚ **Elad, D., and Segal, E. (2018).** Diagnostic aspects of veterinary and human aspergillosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1303.
- ✚ **Ehrlich, K. C., & Cotty, P. J. (2004).** \*Molecular Biology of Mycotoxin Biosynthesis\*. *FEMS Microbiology Letters\**, 235(2), 317–323. DOI: [10.1016/j.femsle.2004.05.004].
  
- ✚ **El-Tarabily, K. A., and Sivasithamparam, K. (2006).** Antagonistic effect of some bacterial species, including Azotobacter, against plant pathogenic fungi. *Australian Journal of Agricultural Research*, 57(7), 779-785.
- ✚ **European Commission EC. Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February .(2010).** amending regulation (EC) no 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union.* 50, 8–12.
- ✚ **Evans , E.G.V. and Richardson ,M.D. (1989).** *Medical mycology : a practical approach .* IRL press , oxford university ,Oxford , England

- ✚ **FAO. (2018).** Crop production statistics. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> .
- ✚ **Fakhrunnisa, Hashmi, M. H. and Ghaffar, A. (2006).** Seedborne mycoflora of wheat, sorghum and barley. *Pak. J. Bot.* 38: 185–192.
- ✚ **Felicia, W. U. (2004).** Mycotoxin risk assessment for the purpose of setting international regulatory standards .*Environ. Sci. technol.*,38(15):4049-4055.
- ✚ **Feng, Y., et al. (2021).** "Genetic diversity of *Aspergillus flavus* isolates and the role of mutations in aflatoxin biosynthesis," *Fungal Diversity*, 110(1), 105-118 .
- ✚ **Fenn, L., and Hinton, J. (2013).** Effects of soil pH and calcium carbonate on nitrogen-fixing bacteria. *Microbial Ecology*, 66(2), 265-273 .
- ✚ **Fleurat-Lessard F. (2017)** . Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins—An update. *J. Stored Prod. Res.* 71, 22-40.
- ✚ **Forbish, R. A.; Bradley, B.D.; Wagner, D. D; Long-Bardly, P. E. and Hairston, H. (1986).** Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally Contaminated grain. *J. Food Prot.*, 44: 781-785.
- ✚ **Fuchs, J., et al. (2017).** "Carotenoid biosynthesis in *Azotobacter chroococcum* and its impacts for biotechnology." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(18), 6967-6980
- ✚ **Gabler , F. M. , Mansour , M.F. , Smilanick , J. L . , and Mackey , B . E . ( 2004).**Survival of spores of *Rhizopus stolonifer* , *Aspergillus niger* , *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternate* after exposure to ethanol solutions at various temperatures. *Journal of Application Microbiology.* 96(6) :1354-1360.

- ✚ **Garnier, L., Valence, F., Mounier, J. ( 2017).** Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update. *Microorganisms*.5,42 .
- ✚ **Garrity , G. M. (2005).** " Part B. The Gammaproteobacteria " . *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The proteobacteria (2ed) . Springer . New York . PP 1108.*
- ✚ **Gangurde, S. S., Korani, W., Bajaj, P., Wang, H., Fountain, J. C., Agarwal, G., ... & Guo, B. (2024).** *Aspergillus flavus* pangenome (AflaPan) uncovers novel aflatoxin and secondary metabolite associated gene clusters. *BMC Plant Biology, 24(1), 354*
- ✚ **Geiser, D. M., et al. (2020).** "Genetic changes and adaptive strategies of *Aspergillus* species in agriculture," *Mycological Progress, 19(9), 781-795 .*
- ✚ **Gizachew, D.; Chang, C.H.; Szonyi, B.; De La Torre, S. and Ting, W.T.E. (2019).** Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. *Int. J. food microbial. , 296:8-13 .*
- ✚ **Goldblatt, L.A. (1969).** Aflatoxin: Scientific background control and implication. *Food Science and Technology, a series of monographs, Academic press, New York and London. 472 pp.*
- ✚ **Goswami, R.S.; Dong, Y.; Punja, Z.K. (2008).** "Host range and mycotoxin production by '*Fusarium equiseti* isolates originating from ginseng fields". *Can. J. Plant Path. 30 (1): 155–160 .*
- ✚ .
- ✚ **Graaff, L. K., Van den Broeck, H. C., Van Ooijen, A. J., and Visser, J. (1994).** Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigenis*. *Molecular microbiology, 12(3), 479-490.*
- ✚ **Guan, Y.; Chen, J.;Nepovimova,E.; Long, M.;Wu,W.;Kuca, K. (2021) .** Aflatoxin Detoxification Using Microorganisms and Enzymes. *Toxins, 13, 46.*

- ✚ **Haggag, W., Abd-El-Kareem, F. and Saleh, A.E. (2014).** Management of Aflatoxin B1 Producing *Aspergillus flavus* on Walnuts and Pistachio Seeds. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.7(9):100-170.
- ✚ Hazzat, N. E., Adnani, M., Msairi, S., Alaoui, M. A. E., Mouden, N., Chliyah, M., ... & Douira, A. (2023). *Fusarium equiseti* as one of the main fusarium species causing wilt and root rot of chickpeas in Morocco. *Acta Mycologica*, 58.
- ✚ **Hartley, R. D.; Nesbitt, B.F. and O'Kelly, J. (1963).** Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature.*, 198: 1056-1058.
- ✚ **Harvey, R. B. ; Edrington, T. S. ; Kubena, L. F. ; Elissalde, M. H. ; Corrier, D. E. and Rottinghaus, G. E. (1995).** Effect of aflatoxin and diacetoxyscirpenol in ewe lambs. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 54(3): 325-330 .
- ✚ **Hazzat, N. E.; Adnani, M.; Msairi, S.; Alaoui, M. A. E.; Mouden, N.; Chliyah, M. and Douira, A. (2023).** *Fusarium equiseti* as one of the main *fusarium* species causing wilt and root rot of chickpeas in Morocco. *Acta Mycologica*, 58.
- ✚ **Heggo, A. and Bock, A. (1996).** The role of *Azotobacter chroococcum* in soil nitrogen dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(12), 1717-1724 .
- ✚ **Hestbjerg, H.; Nielsen, K.F.; Thrane , U. and Elmholt, S. (2002).** Production of trichothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation. *J. Agric. Food Chem.* 50: 7593–7599.
- ✚ **Hillel, D. (2005).** *Plant Growth Promoting Bacteria*. Elsevier, Oxford, U. K.,:103-115.
- ✚ **Hocking, A.D. (1990).** Responses of fungi to modified atmospheres. In *Fumigation and Controlled Atmosphere Storage of Grain*, eds B.R. Champ, E. Highley and H.J. Banks. *ACIAR Proceedings No. 25*.

Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research. pp 70–82 .

- ✚ **Hocking, A.D. and Andrews, S. (1987).** Dichloran chloramphenicol peptone agar as an identification medium for *Fusarium* species and some dematiaceous Hyphomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 89: 239–244.
- ✚ **Holt, J., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. (1994).** *Bergey's manual determinative bacteriology*. 9<sup>th</sup> Ed . Williams and Wilkins, USA.
- ✚ **Horn, B. W., and Greene, R. L. (2018).** "Aspergillus flavus and Aflatoxin," In "Fungal Biology in the Origins of Agriculture, Elsevier.
- ✚ **Houbraken .J.; de Vries; R.P. and Samson; R.A.(2014) .** Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species . *Adv Appl Microbiol.* 2014;86:199-249. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4.
- ✚ **Hubka. V, A. and Nováková, A.S.W. (2016) .** Peterson A reappraisal of *Aspergillus* section *nidulantes* with descriptions of two new sterigmatocystin-producing species *Plant Syst. Evol.*, 302, pp. 1267-1299 .
- ✚ **Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J.L.; Barbier, G.; Coton, E. .( 2014) .** Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*, 13, 437-456
- ✚ **Intaparn, P.; Noireung, P.; Maumoon, R.; Poti, T.; Wongwan, T.; McGovern, R. J. and To-Anun, C. (2020).** First record of *Phytophthora* sp. causing root and stem rot on *Catharanthus roseus* in Thailand. *Plant Pathology and Quarantine*, 10(1), 10-20 .
- ✚ **Jacobson, E.S. (2000).** Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 708- 717.
- ✚ **Jallow, E.A. (2015).** Determination of aflatoxin-producing fungi strains and levels of aflatoxin B1 in some selected local grains. Thesis

Submitted to the Department of Biochemistry and Biotechnology,  
Kwame Nkrumah.

- ✚ **Jamali, M., Karimipour, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Amani, A., and Razzaghi-Abyaneh, M. (2013).** Expression of aflatoxin genes aflO (omtB) and aflQ (ordA) differentiates levels of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains from soils of pistachio orchards. *Research in microbiology*, 164(4), 293-299.
- ✚ **Janda, J. M., and Abbott, S. L. (2007).** "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory." *Clinical Microbiology Newsletter*, 29(3), 25-31.
- ✚ **Jensen, H. L.(2021).** The Azotobacteriaceae. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 8:195-213.
- ✚ **Jnawali, A. D.; Ojha, R.B. and Marahatta, S. (2015).** Role of Azotobacter in Soil Fertility and Sustainability—A Review. *Adv Plants Agric Res* 2(6): 00069.
- ✚ **Johanson E, Branlard G, Cuniberti M, Flagella Z, Hüsken A, Nurit E, Peña R J, Sissons M and Vazquez D. (2020) .** Genotypic and environmental effects on wheat technological and nutritional quality. In : *Wheat quality for improving processing and human health* (pp. 171-204). Springer, Cham.
- ✚ **Joshaghani, H.; Namjoo, M.; Rostami, M.; Kohsar, F. and Niknejad, F. (2013).** Mycoflora of Fungal Contamination in Wheat Storage (Silos) in Golestan Province, North of Iran . *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(4):e6334.
- ✚ **Joshaghani, H.; Namjoo, M.; Rostami, M.; Kohsar, F. and Niknejad, F. (2013).** Mycoflora of Fungal Contamination in Wheat Storage (Silos) in Golestan Province, North of Iran . *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(4):e6334.
- ✚ **Jurick, W. M., Vico, II, I., McEvoy, J. L., Whitaker, B. D., Janisiewicz, W. and Conway, W. S. (2009).** Isolation, Purification, and Characterization of a Polygalacturonase Produced in *Penicillium*

solitum-Decayed 'Golden Delicious' Apple Fruit. *Phytopathology* . 99 (6) : 636-641.

- ✚ **Jurjević.Z. and Peterson.S.W.(2017)** . *Mycologia* 109: 552. [MB818004] — type: BPI-910150 (holotype). ex-type: NRRL 62264.
- ✚ **Kamle, M.; Mahato, D.K.; Gupta, A.; Pandhi, S.; Sharma, N.; Sharma, B.; Mishra, S.; Arora, S.; Selvakumar, R.; Saurabh, V. (2022)** .Citrinin Mycotoxin Contamination in Food and Feed: Impact on Agriculture, Human Health, and Detection and Management Strategies. *Toxins* .14, 85.
- ✚ **Khan, M. S., and Zaidi, A. (2006)**. "Biological control of root pathogens by *Azotobacter chroococcum* in the presence of calcium carbonate." *Journal of Phytopathology*, 154(2), 78-84.
- ✚ **Khan, M. S., et al. (2017)**. "Application of *Azotobacter chroococcum* in grain storage: Effects on fungal pathogens." *Food Control*, 73, 232-239 .
- ✚ **Khanna, R., Pawar, J., Gupta, S., Verma, H., Trivedi, H., Kumar, P., and Kumar, R. (2019)**. Efficiency of biofertilizers in increasing the production potential of cereals and pulses: A. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(2), 183-188.
- ✚ **Khosravi,H.; and Dolatabad, H. K.(2020 )**. Identification and molecular characterization of *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter salinestris* using Ardra, rep, eric, and box. *Molecular Biology Reports*, 47( 1):307–316 .
- ✚ **Kimura, N. ; Tsuge, T. (1993)**. Genecluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *J. Bacteriol.*, 175, 4427-4435 .
- ✚ **Kirk .P.M; Cannon. PF; Minter .D.W and Stalpers JA (2008)**. *Dictionary of the Fungi* (10th ed.). Wallingford, UK: CAB International. p. 677. ISBN 978-0-85199-826-8 .
- ✚ **Klich, M.A. and Pitt, J.I. (1985)**. The theory and practice of distinguishing species of the *Aspergillus flavus* group. In *Advances*

in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics, eds R.A. Samson and J.I. Pitt. New York: Plenum Press. pp. 211–220.

- ✚ **Koh, H.L. and Tseng, T.C. (1975)**. Isolation and Identification of an aflatoxin production strains of *Aspergillus flavus* group from stored Rice. *Bot. Bull. Academia Sinica* 16: 115-125.
- ✚ **Kosiak, B.; Torp, M.; Skjerve, E. and Andersen, B. (2004)**. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality: a matched pair sample study. *Int. J. Food Microbiol*, 93:51-62.
- ✚ **Kozakiewicz Z. (1989)**. *Aspergillus* species on stored products. *Mycol Papers* 161:1–188.
- ✚ **Kumar, A., et al. (2020)**. "Role of calcium carbonate in enhancing the efficacy of *Azotobacter chroococcum* against fungal pathogens in soil." *Agricultural Sciences*, 11(5), 412-421.
- ✚ **Kumar, R.; Ansari, K. M.; Saxena, N.; Dwivedi, P. D.; Jain, S. K. and Das, M. (2012)**. Detection of Ochratoxin A in wheat samples in different regions of India. *Food Control*, 26: 63-67
- ✚ **Kumar, S.; Shekhar, M.; Ali, K.A. and Sharma, P. (2007)**. A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain. *Ind. Phytopathol.* 1: 31-34.
- ✚ **Larone, D. H. (1996)**. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (3rd ed.). ASM Press, Washington, D.C.
- ✚ **Lass-Flörl, C., Rath, P.-M., Niederwieser, D., Kofler, G., Würzner, R., Krezy, A., and Dierich, M. P. (2000)**. *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *Journal of Hospital Infection*, 46(1), 31–35.
- ✚ **Lass-Flörl, C. (2018)**. Treatment of Infections Due to *Aspergillus terreus* Species Complex. *Journal of Fungi*. 4 (83): 2-9.
- ✚ **Li, Xuqing, Dingyi Li, Jianli Yan, Ya Zhang, Hong Wang, Jingze Zhang, Temoor Ahmed, and Bin Li. (2021)**. "Effect of Plant-

Growth-Promoting Fungi on Eggplant (*Solanum Melongena* L.) in New Reclamation Land." *Agriculture (Switzerland)* 11(11).F

- ✚ **Lin, V. A. and Dianese, P. R. (1976).** Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages. *J. food sci.* 47: 1773-1775.
- ✚ **Lina, Liu, Jin, H., Sun, L., Ma, S., and Lin, R. (2012).** Determination of aflatoxins in medicinal herbs by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Phytochemical analysis*, 23(5), 469-476.
- ✚ **Liu, X., Huang, X., Chu, C., Xu, H., Wang, L., Xue, Y., and Liu, C. (2022).** "Mechanisms of DNA mutations and evolution in fungal species," *Journal of Molecular Evolution*, 89(5), 377-387.
- ✚ **Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.
- ✚ **Logrieco, A.; Moretti, A. and Solfrizzo, M. (2003).** *Alternaria* toxins and their impact on food safety. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1681-1690
- ✚ **Louis, B.; Roy, P.; Sayanika, D. W. and Talukdar, N. C. (2013).** *Aspergillus terreus* Thom a new pathogen that causes foliar blight of potato. *Plant Pathology and Quarantine*, 3(1), 29-33.
- ✚ **Mahato, D.K.; Lee, K.E.; Kamle, M.; Devi, S.; Dewangan, K.N.; Kumar, P.; Kang, S.G.( 2019) .** Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Front. Microbiol.* 10, 2266.
- ✚ **Mahdi, S.; Mukhtar, H.; Bashir, H. and Ali Nawaz.(2018).** Optimization of growth conditions for *Azotobacter* species and their use as biofertilizer. *jbmoa*, 6(5):274-278.
- ✚ **Mahmoud, M. A. (2015).** Detection of *Aspergillus flavus* in stored peanuts using real-time PCR and the expression of aflatoxin genes

in toxigenic and atoxigenic *A. flavus* isolates. Foodborne pathogens and disease, 12(4), 289-296 .

- ✚ **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 .
- ✚ **Makum, H. A., S. T. Anjorin, B. Moronfoye, F. O. Adejo, O. A. Afolabi<sup>1</sup>, 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 .
- ✚ **Mali, G. V. and Bodhankar, M. G. (2009).** Antifungal and phytohormone production potential of *Azotobacter chroococcum* isolates from groundnut (*Arach hypogea* L.). *Asian J. Exp. Sci.* 23:293-297.
- ✚ **Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M. R., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A. and Woo, S. L. (2018).** Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Frontiers in microbiology*, 9, 1966.
- ✚ **Marciano, B.E., Wesley, R., De Carlo, E.S., Anderson, V.L., Barnhart, L.A., Darnell, D., Malech, H.L., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (2005).** Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39: 692–699.
- ✚ **Maresca, M., R. Mahfoud, N.Garmy, and J.Fantini. (2002).** The mycotoxinDeoxynivalevel in human intestinal epithial cells. *Journal of Nutriation* 132 : 2723-2731.
- ✚ **Martín, I., Gálvez, L., Guasch, L., and Palmero, D. (2022).** Fungal pathogens and seed storage in the dry state. *Plants*, 11(22), 3167.

- ✚ **Marin,S.; Sanchis, V.; Saenz, R.; Ramos, A.J.; Vinas, I. and Magan, N. (1998).** Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. From maize grain. *Jouranal of Applied Microbiology*.,84 : 25 – 36 .
- ✚ **Massa, F.; Defez, R.; and Bianco, C. (2022).** Exploitation of Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture: Hierarchical Approach to Link Laboratory and Field Experiments. *Microorganisms*, 10(5), 865.
- ✚ **Magan, N., and Olsen, M. (Eds.). (2004).** *Mycotoxins in food: detection and control*. Woodhead Publishing.
- ✚ **Matny, G., and Jackson, J. L. (2017).** Research projects and secondary mathematics pre-service teachers' sense of efficacy. *Investigations in Mathematics Learning*, 9(4), 171-186.
- ✚ **Matny, O.( 2020).** Mycotoxin: Global Risk and Silent Killer in Our Food. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 8 (1): 26-32.
- ✚ **Mayer, Z.; Färber, P. and Geisen, R. (2003).** Monitoring the production of Aflatoxin B1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(2): 1154-1158.
- ✚ **Meerdink, G. L. (2004).** Aflatoxins . In: Plumlee, K. H. (ed.). *Clinical veterinary toxicology* . Little Rock, Arkansas, USA.pp:231-235.
- ✚ **Mehl L and Cotty PJ (2010).** Variation in Competitive Ability Among Isolates of *Aspergillus flavus* from Different Vegetative Compatibility Groups During Maize Infection. *Phytopathology*. 100(2):150-159 .
- ✚ **Meyer, W., Kubicek, C. P., Varga, J., and van der Walt, J. P. (2008).** Molecular approaches to the diagnosis of fungal infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 351-371.
- ✚ **Miller, J.D.; Schaafsma, A.W.; Bhatnagar, D.; Bondy, G.; Carbone, I.; Harris, L.J.; Harrison, G.; Munkvold, G.P.; Oswald, I.P.; Pestka, J.J. and Sharpe, L. (2014).** Mycotoxins that affect the

North American agri-food sector: state of the art and directions for the future. *World Mycotoxin Journal*, 7(1): 63-82 .

- ✚ **Moni, Z. R.; Ali, M. A.; Alam, M. S.; Rahman, M. A.; Bhuiyan, M. R.; Mian, M. S.; Iftekharuddaula, K. M.; Latif, M. A. and Khan, M. A.(2016).** Morphological and Genetical Variability among *Rhizoctonia solani* isolates causing sheath blight disease of rice. *Rice Science* 23(1): 42-50.
- ✚ **Moore, C. K., Hellreich, M. A., Coblenz, C. L., and Roggli, V. L. (1988).** *Aspergillus terreus* as a cause of invasive pulmonary aspergillosis. *Chest*, 94(4), 889–891.
- ✚ **Mosseray, R (1934).** "Les *Aspergillus* de la section Niger Thom et Church". *La Cellule*. 43: 203–285.
- ✚ **Moubasher ,A.H.(1993).**soil fungi in Qatar and other Arab conties.published by the center for scientific and Applied Research.uniresity of Qatar,Qatar.
- ✚ **Moubasher, A.H. (1993).** Soil fungi in Qatar and other arab countries. Doha, university of Qatar, center of scientific and applied research. First Published .
- ✚ **Muslim,S.N.; Aziz,R.A. and Al- Hakeem,A.M.(2021).** Biological control of *Azotobacter chroococcum* on *Fusarium solani* in tomato plant ,*Journal of phyccsis conferens series*,(2)1879-22018.
- ✚ **Nailis, H.; Kucharíková, S.; Řičicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., and Coenye, T. (2010).** Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC microbiology*, 10, 1-11.
- ✚ **Narayanasamy, P. (2011).** Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis. *Fungal Pathogens*. Springer Science and Business Media B.V. London.

- ✚ **Nawar, S.L.( 2008).** Prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia. *Saudi J. Biol. Sci.*, 15: 105-112.
- ✚ **Nelson, G.; Ochocka, J.; Griffin, K. and Lord, J. (1998).** “Nothing about me, without me”: Participatory action research with self-help/mutual aid organizations for psychiatric consumer/survivors. *American journal of community psychology*, 26, 881-912.
- ✚ **Nobel Prize. (1993).** Kary B. Mullis - Nobel Lecture. Retrieved from [nobelprize.org](<https://www.nobelprize.org>) .
- ✚ **Nia, E. (2015).** Seed yield, some yield components and morphological traits of wheat as affected by *Azotobacter* and *Pseudomonas* bacteria inoculation. *International Journal of Biosciences*. 6(2): 1-5 p.
- ✚ **Nyirahakizimana, H.; Mwamburi, L.; Wakhisi, J.; Mutegi, C.; Christie, M. and Wagacha, J. (2013).** "Occurrence of *Aspergillus* Species and Aflatoxin Contamination in Raw and Roasted Peanuts from Formal and Informal Markets in Eldoret and Kericho Towns, Kenya," *Advances in Microbiology*, Vol. 3 No. 4, 2013, pp. 333-342. doi: 10.4236/aim. 34047.
- ✚ **Oisewacz, Heinz. (2002).** *Industrial Applications*. New york: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 264–265.
- ✚ **Ozdemir, F.; Koc, N. K.; Paulitz, T.; Nicol, J. M.; Schroeder, K. L. and Poole, G. (2020).** Determination of fusarium crown rot resistance in wheat to *Fusarium culmorum* and *Fusarium pseudogramineum* using real time PCR. *Crop Protection*, 135, 105204.
- ✚ **Old, R. W., and Primrose, S. B. (1994).** \*Principles of Gene Manipulation\* (5th ed.). Blackwell Scientific.

- ✚ **Pal , M. (2017).** Are Mycotoxins Silent Killers of Humans and Animals. *Journal of Experimental Food Chemistry*. 3(4) :2472-2474.
- ✚ **Pandey, S.; Gupta,S.; and Ramawat,N. (2019).**Unravelling the potential of microbes isolated from rhizospheric soil of chickpea (*Cicer arietinum*) as plant growth promoter. *3 Biotech*, 9( 277) :1-9.
- ✚ **Pankaj, S.K.; Shi, H.; Keener, K.M. A.( 2018) .** review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends Food Sci. Technol.* 71, 73–83.
- ✚ **Parkash ,O. and Raoof,M.A. (1989).**Control of mango fruit decay with post harvest application of various chemicals against black rot ,stem and anthracose disease *J.. of plant disease* .6:99-106.
- ✚ **Parmeter, J. R. and Whitney, H. S. (1970).** Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: *Rhizoctonia solani: Biology and Pathology*.
- ✚ **Patel, S. V., Kumar, A., Bosamia, T. C., Bhalani, H. N. and Singh, P. (2015).** Aflatoxins: Causes and Effects. *A Monthly Magazine of Agricultural and Biological Sciences*. XIII (9) : 140-142 .
- ✚ **Perrone, G., Mule, G.; Susca, A.; Battilani, P.; Pietri, A. and Logrieco, A. (2006).** Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 680-685.
- ✚ **Pitt, J. I. (1988).** *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species-* 2nd ed., N. S. W. : GSIRO Division of Food Processing. North Ryde .
- ✚ **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.* Blackie Academic and Professional. *New South Wales, Australia.*

- ✚ **Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009).** Fungi and food spoilage.3rd Edition . Springer US.New York: 520 pp .
- ✚ **Prakash ,p; B .Karthikeyan . (2013) .** Isolated and Purification of Plant Growth promoting Rhizobacteria (PGPR)from The Rhizosphere of *Acorus calamus* Grown Soil .India Streams Research Journal Vol. 3, (7).1-13 pp.
- ✚ **Promega Corporation. (2021).** GoTaq® 1-Step RT-qPCR System Technical Manual. Link .
- ✚ **Pual Kumar and Kumar, R.(2021).** Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. Current Research in Microbial Sciences ‘100094.
- ✚ **Quaglia, M.; Troni, E.; D’Amato, R.; and Ederli, L. (2022).** Effect of zinc imbalance and salicylic acid co-supply on Arabidopsis response to fungal pathogens with different lifestyles. Plant Biology, 24(1), 30-40.
- ✚ **Rania, A. B. A., Jabnoun-Khiareddine, H., Nefzi, A., Mokni-Tlili, S., and Daami-Remadi, M. (2016).** Endophytic bacteria from *Datura metel* for plant growth promotion and bioprotection against *Fusarium* wilt in tomato. Biocontrol Science and Technology, 26(8), 1139-1165.
- ✚ **Raper , K.B. and Fennell , D.I. (1965).** The genus *Aspergillus*. The Williams and Wiking Co. , Battimor. 686 pp.
- ✚ **Raper KB, Thom C. (1944).** "New aspergilli from soil". Mycologia. 36 (6): 555–75.
- ✚ **Rashid, M. H. et al. (2020).** "Utilization of *Azotobacter chroococcum* in controlling fungal pathogens in stored wheat grains." Journal of Stored Products Research, 85, 101533.
- ✚ **Reddy, S. V., and Waliyar, F. (2000).** Properties of aflatoxin and its producing fungi.App. and Environ. Microb.60, 11-14.
- ✚ **Riaz, M.; Mahmood, R.; Antar, M.; Akhtar, N.; Khan, S. N.; Anjum, M. A.; and Smith, D. L. (2022).** A Bacterial Consortium and

Synthetic Fertilizer Based Biocontrol Approach Against Potato Rot Disease “Neocosmospora rubicola”.

- ✚ **Riaz, M.; Mahmood, R.; Antar, M.; Akhtar, N.; Khan, S. N.; Anjum, M. A.; and Smith, D. L. (2022).** A Bacterial Consortium and Synthetic Fertilizer Based Biocontrol Approach Against Potato Rot Disease “Neocosmospora rubicola”.
- ✚ **Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2008).** Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *Int. J. Food Microbiol.* 122:85-92.
- ✚ **Riba, A.; Bouras, N.; Mokrane, S.; Mathieu, F.; Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2010).** *Aspergillus* section Flavi and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food Chem. Toxicol.* 48:2772-2777.
- ✚ **Robledo. E. (1991).** Strategies for the prevention and control of fungi and mycotoxins in Central and South America. In: Champ BR, Highley E, Hocking AD.
- ✚ **Ryu, C. M.; Farag , M.A.; Hu , C.H.; Kloepper , J.W. and Pareg , P.W. (2004).** Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis* *Plant Physiol.*, 134:1017-1026.
- ✚ **Sadik, S.A., H.S. Mohamed, R.M. Al-Yami and A.B. Othman, (2014)** .Isolation and characterization of bacterial viruses from soil of Taif, KSA. *Wulfenia* 21(2): 173-185.
- ✚ **Saharan ,B.S. and V. Nehra. (2011).** Plant growth promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research , LSMR-21* 30 pp. †
- ✚ **Saito, M. and Machida, S. (1999)** . Arapid identification method for aflatoxin producing strains *A. flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience.*40.205-298 .
- ✚ **Sambrook, J. D. (2001).** *Molecular cloning. A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harber.

- ✚ **Samson RA, Houbraken J, Summerbell RC, Flannigan B, Miller JD (2001).** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. New York: Taylor292–287 . ISBN.
- ✚ **Samson RA, Peterson SW, Frisvad JC, Varga J. (2011).** New species in *Aspergillus* section *Terrei*. *Stud Mycol* 69:39–55. 10.3114/sim.2011.69.04 .
- ✚ **Samson, RA ;Perrone, G; Susca, A; Cozzi, G; Ehrlich, J; Varga, J; Frisvad, JC; Meijer, M; Noonim, P; Mahakarnchanakul, W. (2007).** "Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products". *Studies in Mycology*. 59: 53–66 .
- ✚ **Sarhan, M. S., and Omar, M. A. (2012).** The role of *Azotobacter chroococcum* in biocontrol of soil-borne fungal pathogens. *Egyptian Journal of Microbiology*, 47(2), 211-218.
- ✚ **Saharan ,B.S. and V. Nehra. (2011).** Plant growth promoting Rhizobacteria: A Critical Review. *Life Sciences and Medicine Research , LSMR-21* 30 pp.
- ✚ **Savić, Z., Dudaš, T., Loc, M., Grahovac, M., Budakov, D., Jajić, I., ... and Bagi, F. (2020).** Biological control of aflatoxin in maize grown in Serbia. *Toxins*, 12(3), 162.
- ✚ **Sarjono, P. R.; Hazrina, Q. H.; Saputra, A.; Mulyani, N. S.; Aminin, A. L. N., Ngadiwiyan, and Prasetya, N. B. A. (2020).** Isolation, characterization, and identification of endophytic bacteria by 16S rRNA partial sequencing technique from leaves of carica papaya and its potential as an antioxidant. In *AIP Conference Proceedings*.AIP Conference Proceedings, 2237(1):1-10.
- ✚ **Saiki, R. K., et al. (1985).** *Science*, 230(4732), 1350–1354. DOI: 10.1126/science.2999980 .

- ✚ **Scheidegger, K. A. and Payne, G. A. (2003).** Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of *Aspergillus flavus* from pathogenicity to functional genomics. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews*. 22(2-3): 423-459.
- ✚ **Scherm, B.; Palomba, M.; Serra, D.; Marcello, A.; and Migheli, Q. (2005).** Detection of transcripts of the aflatoxin genes aflD, aflO, and aflP by reverse transcription–polymerase chain reaction allows differentiation of aflatoxin-producing and non-producing isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *International journal of food microbiology*, 98(2), 201-210.
- ✚ **Schmidt, P. A.; Stielow, J. B.; Klenk, H. P.; and Ludwig, W. (2013).** Phylogenetic implications of ITS regions in fungi. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(4), 228-237.
- ✚ **Schmidt-Heydt M, Abdel-Hadi A, Magan N and Geisen R. (2009)** . Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *Int J Food Microbiol* . 135(3):231-7.
- ✚ **Schoustra SE, Slakhorst, M, Debets, AJM, Hoekstra, RF. (2005).** "Comparing artificial and natural selection in rate of adaptation to genetic stress in *Aspergillus nidulans*". *J Evol Biol*. 18 (4): 771–778 .
- ✚ **Scott J, Malloch D, Wong B, Sawa T, Straus N. (2000).** DNA heteroduplex fingerprinting in *Penicillium*. In: Samson RA, Pitt JI, eds. *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification* . Amsterdam , the Netherlands: Harwood Academic Publishers. p 225–236.
- ✚ **Senapati, N., and Semenov, M. A. (2019).** Assessing yield gap in high productive countries by designing wheat ideotypes. *Scientific Reports*, 9(1), 5516.
- ✚ **Shah, S. Z., and Nisar, M. F. (2020).** "Characterization of carotenoid producing bacterial from different environmental." *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1620-1633 .

- ✚ **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, N., et al. (2017)**. "Genetic diversity and antifungal resistance in *Aspergillus* species." *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6, 98 .
- ✚ **Shende, S. T.; Rudraksha, G. B.; Apte, R. and Raut, R. S. (1984)**. Azotobacter Inoculation: Nitrogen Economy and Response of Sorghum CSH. *Cereal Nitrogen Fixation*, 75.
- ✚ **Silva Dias, B. H., Jung, S. H., Castro Oliveira, J. V. D., and Ryu, C. M. (2021)**. C4 Bacterial Volatiles Improve Plant Health. *Pathogens*, 10(6), 682.
- ✚ **Silva, D; Batista, L; Rezende, E; Fungaro, M; Sartori, D; Alves, E (2011)**. "Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section nigri using polyphasic taxonomy". *Brazilian Journal of Microbiology*. 42 (2): 761–773 .
- ✚ **Silva, M.D., R.L. Batista, F.E. Rezende, P.M.H. Fungaro, D. Sartori, and E. Alves. (2011)**. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* Section Nigri using polyphasic taxonomy. *Braz. J. Microbiol.* 42:761-773.
- ✚ **Simmons, E.G. (2007)** . *Alternaria* .An identification manual .In :CBS biodiversity series 6 .CBS Fungal Biodiversity Centre , Utrecht , The Netherlands Webb, T.A. and Mundt, J.O. (1978). Molds on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 655–658.
- ✚ **Snowdon, A.L. (1991)**. A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables. 2. Vegetables. London: Wolfe Scientific .
- ✚ **Sobolev, V.S. and Dorner, J.W. (2002)**. Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid

chromatography .J.. of Association of Official analytical Chemists International,85:642-645.

- ✚ **Sohrabi, N., and Taghizadeh, M. (2018).** Molecular identification of aflatoxigenic *Aspergillus* species in feedstuff samples. *Current medical mycology*, 4(2), 1.
- ✚ **Soleymanifard ,A. ,Mojaddam ,M. ,Lack ,S. ,and Alavifazel , Soleymanifard, A., Mojaddam, M., Lack, S., and Alavifazel, M. (2022).** Effect of azotobacter chroococcum and nitrogen fertilization on some morphophysiological traits, grain yield, and nitrogen use efficiency of safflower genotypes in rainfed conditions. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 53(6), 773-792.
- ✚ **Srpska, M. and Sad, N. (2013).** Molds and mycotoxins in freshly harvested maize. pp. 111–119.
- ✚ **Steinbach, William J., and Stevens, David A.(2003).** "Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis." *Clinical Infectious Diseases* 37.Supplement\_3: S157-S187.
- ✚ **Stuart, R.M.; Bastianel, M.; Azevedo, F. ;Machado, M.A. (2009).** Alternaria brown spot disease .Laranja, Cordeirópolis, 30:29-44.
- ✚ **Sun, X. D. ; Su, P., and Shan, H. (2017).** Mycotoxin contamination of rice in China. *Journal of food science*, 82(3) : 573-584.
- ✚ **Sundahakar, p.;Latha, P. ;Sreenivasulu, Y.; Bhaskar Reddy, B.V. ; Hemalatha, T. M. ; Balakrishna, M. and Raja Reddy.(2009).** Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AfB1) in peanut by methleugenol. *K. Ind. J. Exp.Biol.*,47:63-67.
- ✚ **Thalij, K. M., Sumait, S. A., Ahmed, K. N., and Badawy, A. S. (2021).** Determination of Fungi and Aflatoxin Contaminating Wheat Stored in Silos of Salah Al-Den Governorate–Iraq. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 25(6), 11715-11724.

- ✚ -Thomma, Bart PHJ.(2003). "Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite." *Molecular plant pathology* 4.4: 225-236.
- ✚ Tumbarski, Y.; Georgiev, V.; Nikolova, R. and Pavlov, A. (2020). Isolation, identification and antibiotic susceptibility of *Curtobacterium flaccumfaciens* strain PM\_YT from sea daffodil (*Pancratium maritimum* L.) shoot cultures. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 623-627.
- ✚ Udomkun,P.;Nimo,A.;Nagle,M.;Müller,J.;Vanlauwe,B.;Bandyopadhyay, R.( 2017).Innovative Technologies to Manage a FI Atoxins in Foods and Feeds and the pro Fi Tability of Application e A Review. *Food Control* ,76,127–138.
- ✚ Ulzijiargal E, Gorgo Y P and Skorochood I O. (2019). Detection of seedborne mycoflora in wheat. *IJISRT* 4(10), 532.
- ✚ Van Egmond, H.P.and Jonker, M.A. (2005). *Worldwide Regulations on Aflatoxins*; Abbas, H.K., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA,; pp. 77–93.
- ✚ Vankayalpati, V. K. (2018). Aflatoxins: properties, toxicity and detoxification, *nutrifood Sci. Int J*, 6(5), 555696. DOI: 10.19080/NFSIJ.2018.06.555696.
- ✚ Vega, S.A.; Valdés, F.L. and Rendón C.A.(2012)Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT* 128:33-42.
- ✚ Verma, S.; Kumar, V.; Narula N and Merbach W.( 2001). Studies on in vitro production of antimicrobial substances by *Azotobacter chroococcum* isolates\mutants *J. Plant Dis. Prot.* 108 1152.
- ✚ Vivek-Ananth, K. ;Mohanraj, M.; Vandanashree, A. ;Jhingran, P. James Craig and Areejit Samal .(2017).Comparative systems analysis of the secretome of the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species *Sci. Rep.* (2017), pp. 1-31.

- ✚ **Vocciante, M.; Grifoni, M.; Fusini, D.; Petruzzelli, G.; and Franchi, E. (2022).** The Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Mitigating Plant's Environmental Stresses. *Applied Sciences*, 12(3), 1231.
- ✚ **Webb, T.A. and Mundt, J.O. (1978).** Molds on vegetables at the time of harvest. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 655–658.
- ✚ **Webster, J., and Weber, R. (2007).** Introduction to fungi. Cambridge university press.
- ✚ **White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S. H.; Taylor, J. W. (1990).** "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics." *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). Academic Press .
- ✚ **WHO Department of Food Safety and Zoonoses, February .(2018).** REF. No.: /NHM Aflatoxins /FOS/RAM/18.1.
- ✚ **Woloshuk, C.P.; Cavaletto, J.R. and Cleveland, T.E. (1997).** Inducers of aflatoxin Biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from *Aspergillus flavus* . *The Am. Phytopathol. Soc.* 87 (2): 164-169.
- ✚ **World Health Organization .(2008).** Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva.
- ✚ **Woudenberg, J.H.C. ; Seid, M.F. ; Groenewald, J.Z. ; Vries, M.de ; Stielow, J.B. ; Thomma, B.P.H.J. , and Crous, P.W . (2015) .** *Alternaria* section *Alternaria* :Species , formaes peciales or pathotypes?. University of Pretoria ,Pretoria 0002, South Africa Studies , in *mycology* 82:1–21.
- ✚ **Wu, F., et al. (2023).** "Fungal diversity and mycotoxin contamination: Emerging threats in agriculture," *Environmental Microbiology*, 25(4), 1309-1324.
- ✚ **Yazdani, D.; Zainal Abidin, M. A.; Tan, Y. H. and Kamaruzaman, S.(2010).** Evaluation of the detection techniques of toxigenic

*Aspergillus* isolates African Journal of Biotechnology Vol. 9(45), pp. 7654-7659.

- ✚ **Yilmaz N, Visagie CM, Frisvad JC, Houbraken J, Jacobs K, Samson RA. (2016).** Taxonomic re-evaluation of species in *Talaromyces* section *Islandici*, using a polyphasic approach. *Persoonia* 36:37–56.
- ✚ **Yilmaz, N. Visagie, CM, Houbraken J, Frisvad JC, Samson RA.( 2014).** Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology* 78:175–341.
- ✚ **Yin, G., Zhang, Y., Guo, A., Pennerman, K. K., Bennett, J. W., Wu, G., Hua, S. S. T., Yu, J. and Jurick II, W. M. (2017).** Characterization of Blue Mold *Penicillium* Species Isolated from Stored Fruits Using Multiple Highly Conserved Loci. *J. Fungi.* 3 (12) : 10 .
- ✚ **Yu ,J. (2012) .** Current understanding on aflatoxin biosynthesis and future perspective in reducing aflatoxin contamination. *Toxins (Basel).* 4(11):1024-57.
- ✚ **Yu, J.; Chang, P.K.; Ehrlich, K.C.; Cary, J.W.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Payne, G.A.; Linz, J.E.; Woloshuk, C.P.; Bennett, J.W. (2004).** Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*70: 1253–1262.
- ✚ **Zarrin, F., M. Saleemi, M. Zia , T . Sultan, M. Aslam, R. Rehman and M.F. Chandhary .(2009) .**Antifungal activity of plant growth promoting *Rhizobacteria* isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *Africa J. of Biotechnol.* 8(2): 219-225 .
- ✚ **Zhu, Y., et al. (2023).** "Environmental and genetic factors driving mutations in fungi: Insights from *Aspergillus* species," *Fungal Ecology*, 56, 86-95 .

## SUMMARY

This study was conducted in the laboratories of the Department Biology / College of Education for Pure Sciences, University of Karbala, from 10/12/2023 to 1/22/2025. Some fungi associated with local grain species stored in silos in Kerbala Governorate were isolated. Their ability to produce aflatoxin B1 was detected using ammonia detection and thin layer chromatography (TLC). Aflatoxin B1 concentrations were measured using high-performance liquid chromatography (HPLC). The isolated fungi were identified using the traditional method and molecularly using polymerase chain reaction (PCR) technology.

Two isolates were selected, one of which was more productive of aflatoxin B1 and the other less productive of aflatoxin B1, for comparison using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR).

The effectiveness of the *Azotobacter chroococcum* isolate in inhibiting aflatoxin B1-producing fungal isolates was tested. A biological preparation of *A. chroococcum* inoculum was prepared, and the effectiveness of the biological preparation in protecting wheat grains from infection by aflatoxin B1-producing fungi was tested.

The results showed that stored wheat grains were contaminated with aflatoxin-producing fungi in varying numbers. The total number of fungal isolates reached 349, representing nine species. These species belonged to five genera of filamentous fungi: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, and *Talaromyces*. The other species were *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. caespitosus*, *P. camemberti*, *Alternaria*, *F. equiseti*, and *Talaromyces tiftonensi*. *Aspergillus* spp. was the most dominant fungal isolate, accounting for 258 isolates.

High-performance liquid chromatography (HPLC) quantitative estimation results showed that the *A. flavus1* isolate was the highest producer of aflatoxin B1, with a concentration of 215.9 ppb. This was followed by *A. niger3*, with a concentration of 184.9 ppb. *A. flavus3* came in third place with a concentration of 162.5 ppb. *A. flavus2* was then followed by *P. camembeti*, with a

concentration of 155.8 ppb. *Alternaria alternata* was then followed by *A. niger2* and *A. tubingensis*, with concentrations of 124.6 and 114.5 ppb. The aflatoxin estimation results for the *A. terrus* isolates were 90.5 ppb, *A. caespitosus*, with a concentration of 44.9 ppb, and *F. equiseti*, with a concentration of 145.9 ppb. 41.3 ppb and *Talaromyces tiftonensis* at 35.61 ppb. The isolate with the lowest aflatoxin B1 production was *A. niger1* at 30.5 ppb.

The study confirmed the diagnosis of *A. chroococcum* bacteria morphologically and microscopically. The diagnosis was confirmed by PCR technique, by determining the sequence of nitrogenous bases belonging to this bacteria, which was deposited in the GenBank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), as a special sequence code was assigned to the bacteria, which is PQ516743.1.

The study demonstrated that *A. chroococcum* bacteria are highly efficient in inhibiting the radial growth of isolated aflatoxin B1-producing fungi grown on PDA medium, particularly at a concentration of 3 ml of bacterial suspension. The fungal colony diameter reached 0.00 cm for all aflatoxin B1-producing fungi. The inhibition rate for all fungi studied reached 100%. While the 2 ml concentration of the bacterial suspension showed high efficiency in inhibiting fungi producing aflatoxin B1, the colony diameters reached 0.00 cm for the genera *A. niger1*, *A. niger2*, *A. caespitosus*, *P. cammemberti*, *Alternaria Alternaria*, and *Talaromyces tiftonensis*. Meanwhile, the colony diameters for the genera *A. flavus1*, *A. flavus2*, and *A. flavus3* reached 2.50, 0.50, and 2.05 cm, respectively. The colony diameters for the genera *A. niger3*, *A. terrus*, *A. tubingensis*, and *F. equiseti* reached 3.70, 1.25, 2.45, and 1.12 cm, respectively.

The results showed that the 1 ml concentration of bacterial suspension gave lower inhibition results against most fungi producing aflatoxin B1.

The results showed that wheat grains contaminated with fungal isolates produced aflatoxin B1 at higher concentrations than wheat grains treated with bacterial bio-infusions and contaminated with fungal inoculum after six months of storage. The aflatoxin concentration produced by wheat grains without any

treatment (control) was estimated at 4.1 PPb, while the aflatoxin concentration produced by wheat grains treated with only bacterial bio-inoculum was estimated at 0.25 PPb.



**University of Kerbala  
College of Education for Pure Sciences  
Department of Biology**

# **Biochemical diagnostic study of aflatoxin B1- producing fungi associated with stored wheat grains**

**A Thesis  
submitted to The Council of the College of Education for Pure Sciences -  
University of Kerbala, as a partial fulfillment of the requirement for the  
degree of doctor in Biology - Botany**

**Submitted by**

**Anteithar Jabar Mohammad Al-Eedany**

**Supervised by**

**Assist. Prof. Dr. Ban Musa Hassan**

**Prof. Dr. Ahmed Najm Abdallah**

**2025 / April**

**1446/Shawwal**