فاعلية اليوريا والفايلكس ومساحيق بعض النباتات الطبية في تثبيط نمو نوعين من الفطر اسبرجلس في الأوساط الزرعية.

منير سعيد محسن البلداوي حليمة زغير حسين خالد محمد العـادل

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغـداد

المستخلص

اجريت هذه الدراسة في مختبر المبيدات والسموم الفطرية / قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد لعام 2006. هدفت إلى اختبار فاعلية مركب اليوريا والفايلكس ومسحوق قلف نبات الدارسين ومسحوق أوراق وقشور النارنج في قابليتها على تثبيط الفطر *Aspergillus ochraceus* والمعزول من بعض الحبوب وعلائق الدواجن وتحطيم سم الأوكراتوكسين A وتقليل آثاره السلبية وتحديد أفضل النسب الفاعلة منها مختبريا، كذلك تم اختبار مسحوقي الدارسين وأوراق وقشور النارنج في تثبيط الفطر *A. flavus* ومنعه من انتاج الافلاتوكسين B1 في الوسط الغذائي . بينت نتائج العزل والتشخيص للفطريات في عليقة الدواجن مرافقة عدد من الفطريات ، اذ تصدرتها انواع الاجناس *Aspergillus,spp Mucor, spp, cladosporium,spp, Fusariums, ssp, penicillim, ssp,* , وبنسب تكرار بلغت 37% و 34% و 20% و 7% و 1% و 1% بالتتابع . وكانت نسبة تواجد وتكرار الفطر *A. ochraceus* قد بلغ 8% من مجموع الفطريات المعزولة من النبات، اظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي باستخدام الصفائح الكروموتوكرافية الرقيقة Thin Layer Chromatography مقدرة العزلات المختلفة للفطر *A.ochraceus* على إنتاج سم الاوكراتوكسين A والمعزولة من العلائق ومكوناتها (الحنطة والذرة الصفراء)، وكان عدد العزلات المنتجة للسم 7 عزلات من اصل 20 عزلة أي بنسبة (35%). أظهرت النتائج ان إضافة اليوريا الى وسط آكَر البطاطا والدكستروز PDA (Potato Dextrose Agar) بتركيز 4 % و 5 % سبب ثبيطا كاملا لنمو وتجرثم الفطر *A. ochraceus* . في حين أظهر مستحضر الفايلكس التجاري (مجموعة من الأحماض) تركيز 0.1 % تثبيطا للفطر بلغ 73.61 % في حين وصلت نسبة التثبيط الى 100% عند التركيز 0.2 % . أما مسحوق نبات الدارسين فقد أختبر بثلاثة تراكيز في تثبيط نمو الفطرين *A. ochraceus* و *A. flavus* فكانت نسبة التثبيط عند التراكيز 2% و 3% و 5% (64.50% و 62.22%) و (80.65% و 79.445) و (96.50% و 95.25%) للفطرين والتراكيزبالتتابع . ولم يظهر مسحوق اوراق وقشور النارنج بتركيز 2% و 3% قيمة تثبيطية معنوية في حين بلغت نسبة التثبيط في التركيز 5% ،كان 49.5% و 45.60% للفطرين *A. ochraceus* و *A. flavus* بالتتابع .

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 40 (2) :82-92 (2009) Al-Baldawy et al.

CTIVITY OF UREA, FYLAX, AND POWDER OF SOME MEDICAL PLANT TO INHIBIT GROWTH. OF TWO SPP. OF ASPERGILLUS IN ARTIFICIAL MEDIA.

M. S. Al-Baldawy H. Z. Hussein K. M. Al-Adil

Dept. Plant Protection, College of Agriculture – University of Baghdad

ABSTRACT

The experiment was carried in the laboratory of pestcides and mycotoxin. In Dept. Plant Protection. College of Agriculture, University of Baghdad during 2006. The aim of the study was to test the effect of Fylax and Urea and powder of Cinnamon bark and powder of the peels and leaves of sour orange for inhibition *Aspergillus ochraceus* and detoxification of Ochratoxin A.and to powder of Cinnamon bark and powder the peels and leaves of sour orange in the inhibition of growth *Aspergillus flavus* and preven of production of Aflatoxin B1 in media. Results of the isolation and idenitification showed that brofler chicks were accompanied with several fungi *Aspergillus spp,Penicillium spp, Fusariums, ssp, Rhizopus spp, Mucor spp., Cladosporium spp*. In percentage reached 37%, 34%,20%,7%, 1% and 1% respectively,The most dominanate fungus was *A. ochraceus* which reached 8%.Thin Layer chromatography (TLC) showed that about 35% of *A. ochraceus* isolates produced Ochratoxin A on isolated from brofler chicks, and some grain. The number of isolates produced this toxin were (7) from (20) isolates. The results revealed that the addition of Urea or Fylax to PDA (Potato Dextrose Agar) had caused 100% inhibition the growth of fungus growth and sporolation when concentration of 5%, 0.2% was used. Cinnamon bark powder at concentration of 5% has caused inhibition around 95% to both *A. ochraceus* and *A. flavus*. However , the peels and leaves powder of sour orange at 5% concentration have caused 49.5% and 45.6% inhibition to both *A. ochraceus* and *A. flavus* respectively

---

مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

Part of M.Sc. thesis of the first author

المقدمة

تقسم الفطريات التي تصيب الحبوب المخزونة إلى قسمين اعتمادا على طبيعة إصابتها، وهي فطريات الحقل وفطريات المخزن ،.من بين أشهر فطريات المخزن هي الاسبرجلس بنوعية *A.flavur* و *A . ochraceus*

(8 ، 12، 24) وأغلب هذه الفطريات تنتج السموم ، وهي بشكل عام مسببات مرضية غير عدائية لكن غالبا ماتثبت في الاوساط الغذائية مع زيادة الرطوبة، و هذه المجاميع من الأنواع المنتجة للسموم التي تعود إلى ستة أجناس رئيسة وهي الاكثر انتشارا :- *Aspergillus* و*Penicillium* و *Fusarium* و *Claviceps* و *Stachybotrys*و *Neotyphodium*. هذه الاجناس اختيرت بسبب مقدرتها على انتاج السموم الفطرية بتراكيز عالية وبسبب امكانيتها على العيش في بيئات متنوعة ومختلفة. السموم الفطرية هي عبارة عن مجاميع مختلفة من المركبات السامة نواتج لعمليات الايض الثانوي للفطريات ،في الغالب بعض هذه الفطريات يستطيع ان يغزو ويستعمر الانسجة النباتية قبل الحصاد وفي المخزن (25).تعد الانواع *A. fumigatus* , *A. flavus* , *A . niger* وانواع اخرى مسببات مرضية للانسان والحيوان اذ تسبب هذه الفطريات امراض تسمى Aspergilloses وهي أمراض معروفة من بدايات القرن الماضي وتؤثر على الجهاز التنفسي وبعضها يسبب ذات الرئة (21 ، 40 ، 50). اشارت الدراسات ان 25% من محاصيل الغذاء العالمي تتلوث سنويا بمستويات متغيرة من السموم الفطرية (36) هذه النسبة تتطابق مع تقديرات منظمة الغذاء والزراعة (FAO) في نسبة المحصول العالمي الملوث بالسموم الفطرية ، مما يؤدي الى تأثير اقتصادي كبير في المحاصيل فضلا عن الطعام ومنتجات الأغذية وحسب التقديرات فانه في سنة 2003 فان الخسائر الاقتصادية التي تسببها السموم الفطرية تقدر بمئات الملايين من الدولارات (26).لاتوجد في الوقت الحاضر منطقة في العالم خالية من التلوث بالسموم الفطرية وتاثيراتها السلبية على صحة الانسان (26) فضلاً عن *A. flavus* والمجموعة المرتبطة به التي تنتج الافلاتوكسينات (20) . توجد مجموعة انواع اخرى من *Aspergillus* والأكثر شيوعاً من هذه المجموعة هو *A. ochraceus* ولعل هذا الفطر يمتاز بمقدرته العالية على انتاج الاوكراتوكسين A اكثرمن بقية الأنواع الاخرى (25) اذ ان اكثر من 50 % من الاوكراتوكسينات سجلت في الحبوب وبنسبة اكثر من 1 ملغم / كغم (39)اكتشف الاوكراتوكسين في جنوب افريقيا عام 1965 من قبل Scott (46) ووجد طبيعا على سطوح لحم الخنزير عام 1968 وترجع تسميته الى اول فطر عزل منه *A. ochraceus* وهو يسبب تسمم الكلى في الإنسان والحيوان على حد سواء . (15) ويسبب السم مرضاً يدعى Nephropathy Balkan مميتاً للإنسان ،كما يعمل على حدوث أمراض خبيثة (34 و 15) ينتج الاوكراتوكسين A من قبل العديد من الفطريات لكن يبقى الفطر *A. ochraceus* هوالوحيد المهم في حالات اصابة الحبوب المخزونة (33) للاوكراتوكسين تأثيرات مختلفة شوهدت في أنواع كثيرة من الكائنات الحية فهو بالدرجة الأولى سم كلوي ويؤثر على الكبد ويشابه في تأثيره الافلاتوكسينB1 ويسبب كذلك حالات تشوه الأجنة وهو عامل مسرطن ويقوم بتثبيط جهاز المناعة (35 و 50 و 42). استعمل بروميد البوتاسيوم ويوديد البوتاسيوم وفلوريد البوتاسيوم لتثبيط الفطر *A. ochraceus* وإنتاجه للاوكراتوكسين A (51). وهيدروكسيد الكالسيوم احادي اثيل امين (34). وبيكاربونات الامونيوم والفوسفات(11). والصوديوم المتناظر وأملاح الكالسيوم البوتاسيوم (36). أستعمل العديد من الحوامض لإزالة السموم الفطرية من الحبوب وأدت الى تحطيمها كيميائيا مثل حامض الفورميك و البروبيونيك و السوربك والخليك والفورميك والبنزويك(31 و 55 ,11 و 36) واستعملت بعض القواعد مثل هيدروكسيد الأمونيوم أو غاز الأمونيا في خفض مستوى الافلاتوكسينB1 والاوكراتوكسينِ A (31) وفي العراق استعملت اليوريا في البلوكات العلفية والحبوب المخزونة وكسبة زهرة الشمس والقطن المضافة الى علائق الدواجن لتحطيم السموم الفطرية (16 و 12 و 3) أما المساحيق النباتية فقد استعملت كمواد حافظة بدلاً أو مع التجفيف أو التبريد وهي تثبط من نمو الفطريات وإنتاج سمومها ، وثبت أن لبذور الحبة السوداء *Nigella sativa* فعلا مضادا لبعض الفطريات والخمائر (2و15). لمسحوق البراعم الزهرية لنبات القرنفل فاعلية تثبيطية عالية ضد 13 نوعاً من *Aspergillus* (53). إذ تحوي أزهار وأوراق وجذور وبراعم وسيقان كثير من النباتات على مواد كيميائية وهي مركبات أيضية ثانوية فعالة ضد الممرضات النباتية وغيرها ، (30 و 24و 5) . وشخصت الكثير منها مثل مادة d-limonene الموجودة في زيت البرتقال (21) ومادة Cinnamic aldehyde في زيت الدراسين كمادة فعالة وسامة للفطريات التي تصيب الجهاز التنفسي وان بخار هذا الزيت كان فعال ضد هذه الفطريات (48). وفي السنوات الاخيرة اخذ سم الاوكراتوكسينA يلوث الحبوب في المخازن بدرجة لاتقل خطورة عن الافلاتوكسينB1 ولذا هدفت الدراسة إلى : اختباره قدرة بعض عزلات الفطر *A. ochraceus* والمعزولة من الحبوب وعلائق الدواجن على انتاج السم اوكراتوكسين A . واختبار العزلة الاكثر انتاجا للاوكراتوكسين A وتنميتها باستعمال اوساط غذائية مختلفة . واختبار بعض المساحيق النباتية ومركب اليوريا والحوامض في مقدرتها على تحطيم السم وتقليل آثاره وتحديد افضل النسب الفاعلة منها مختبرياً .اختبار مسحوقي نبات الدارسين وأوراق وقشور النارنج في مقدرتها على تثبيط الفطر *A. flavus* وتقليل آثار التسمم بالافلاتوكسين B1 .

المواد وطرائق العمل

عزل الفطر *A. ochraceus* من الحبوب وعلائق الدواجن

جمعت عينات الحبوب ومكونات العلائق من الذرة الصفراء والحنطة والشعير وفول الصويا وكذلك الرز من عدة محافظات (بغداد ، صلاح الدين ، بابل ، الموصل) اما علائق الدواجن فجمعت من حقل الإنتاج الحيواني في كلية الزراعة – جامعة بغداد، وعزلت الفطريات المستهدفة

وشخصت باعتماد المفاتيح التصنيفية (44 و38) بعد عزل وتشخيص الفطريات نقيت عزلات الفطر *A. ochraceus* على وسط PSA .

استعمال وسطي الرز ومستخلص الخميرة لتنمية عزلات الفطر *A. ochraceus*

استعمل وسط الرز لتنمية عزلات الفطر *A. ochraceus* وانتاج الاوكراتوكسين A إذّ اختبرت 20 عزلة من الفطر معزولة من الحبوب والعلائق وبحسب طريقة (47) و استعمل وسط مستخلص الخميرة والسكروز السائل (YES) Yeast Extract Sucrose (20 غرام مستخلص خميرة 200 غرام سكروز للتر الواحد) أيضا لتنمية العزلات المنقاة على وسط الـ PSA . وذلك لان الفطر *A. ochraceus* له القدرة على انتاج مستويات عالية من الاوكراتوكسين A على هذا الوسط (28و 19) .

استخلاص الاوكراتوكسين A من وسط الرز

اخذ 25 غرام من العينة بعد طحنها بمطحنة نوع Wiley mill Standard Model No.3 Arther Co. ووضعت في دورق زجاجي سعة 300 مل (23). اضيف 100 مل من محلول الاستخلاص المتكون من اسيتونايترل - ماء (90 : 10) وأغلقت فتحة الوعاء بإحكام وخلطت محتوياته باستعمال هزاز الدوارق الكهربائي لمدة 30 دقيقة . ثم رشح المستخلص خلال دورق ترشيح بأمرار المزيج خلال ورق ترشيح من نوع Whatman No. 4 ،و وضع الراشح في قمع فصل سعة 250 مل ثم أضيفت أليه 25 مل مكسان لغرض التخلص من الدهون بعدها رج القمع برفق لمدة 30 ثانية مع طرد الغازات المتجمعة كلما دعت الحاجة إلى ذلك (مرتين على الأ قل) وبعدها ترك على الحامل لمدة دقيقة واحدة تنفصل الطبقتان ، أ هملت الطبقة العليا وكررت العملية لثلاث مرات لضمان التخلص من الدهون .و أضيفت إلى الطبقة السفلى 25 مل من الماء المقطر و8 مل من محلول بيكاربونات الصوديوم المشبعة و25 مل من الكلوروفورم ، وبعد ثلاث دقائق تم انفصال طبقتين عليا وسفلى أحتفظ بالطبقة العليا . كررت العملية مرتين .ثم نقل المستخلص الى قمع فصل سعة 100 مل وسكب فوقه 15 مل من حامض الهيدروكلوريك 1 عياري والمحضر آنيا و 20 مل من الكلورو فورم ورج جيدا وترك القمع على الحامل دقيقة واحدة . اخذت الطبقة السفلى واضيف للطبقة العليا 20 مل كلوروفورم واعيد استخلاصها مرة اخرى ، جمعت الطبقتان السفليتان معاً ثم مررت خلال ورق ترشيح حاوية على طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية Na2SO4 لأجل التخلص من الماء المتبقي ،و بخر الراشح باستعمال المبخر الدوار Rotary Evaporator وعلى درجه حرارة 70° م حتى الجفاف ، بعدها أذيب في 1 مل من مزيج أسيتونايترل : بنزين (2 : 98) ونقل إلى أنابيب صغيرة vials وحفظت في المجمدة لحين الكشف .

أستخلاص الأوكراتوكسين A من وسط الخميرة السائل

استخلص الأوكراتوكسين A من وسط الخميرة السائل المحورة من قبل (1 ، 37): وذلك بخلط مكونات الدورقين لكل عزلة وتم ترشيح المستخلص بورق الترشيح أخذ 25 مل ووضع في قمع فصل سعة 250 مل .و أضيف الى قمع الفصل الكلوروفورم بنسبة 100 مل ويرج المزيج مع طرد الغازات المتجمعة في قمع الفصل كلما دعت الحاجة لذلك (مرتين في ألأقل) ويترك القمع الحامل لمدة 15 دقيقة حتى تنفصل طبقتان و تؤخذ الطبقة السفلى طبقة الكلوروفورم وتمرر خلال ورق ترشيح يوضع في قمع وفيه كمية من كبريتات الصوديوم اللامائية Na2SO4 لأجل التخلص من الماء ويضاف 10 مل أخرى من الكلوروفورم الى الطبقة العليا في قمع الفصل ويرج جيدا مع طرد الغازات المتجمعة ويترك القمع على الحامل حتى تنفصل طبقتان .ثم تؤخذ الطبقة السفلى وتمرر على ورقة ترشيح تحتوي كبريتات الصوديوم اللامائية.وتجمع طبقتا الكلوروفورم المتحصلتان وتبخر في المبخر الدوار حتى الجفاف . ثم يعاد إذابة المستخلص بـ 5 مل من الكلوروفورم ويحفظ في أنابيب صغيرة Vials وتجفف مرة أخرى في حمام مائي وتغلف بورق ألمنيوم من الخارج بعد إغلاقها جيداً لمنع تعريضها للضوء وتحفظ بدرجة – 18 في المجمدة لحين الكشف .

تنقية المستخلصات والكشف عن الاوكراتوكسين A في صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة TLC .

أذيب المستخلص الجاف لكل عينة بمقدار 1 مل من الكلوروفورم من عينات الوسط السائل ورج كل انموذج جيداً لضمان الإذابة الكاملة ثم اخذت من كل عينة من عينات وسط الرز ووسط الخميرة السائل 5 مايكروليتر بأستعمال مزراق دقيق Microsyringe ثم عمل منها بقع Spots على ألواح (TLC) جاهزة مطليه بالسيلكا جيل TLC aluminium sheets silica gel 60 F254 قياس 20 x 20 وبسمك 0.25 ملم و نشطّت الصفائح في الفرن الكهربائي على درجة 110° م لمدة ساعة .كانت المسافة بين بقعة وأخرى 2 سم ،استعمل الاوكراتوكسين A القياسي والذي تم الحصول عليه من شركة Sigma Chemicals وبتركيز 10 جزء في المليون. وضعت بقع السم القياسي في بداية ونهاية كل صفيحة و استعمل نظام فصل مطور للاوكراتوكسين A في حوض زجاجي مستوي القاعدة ومحكم الغلق حاوي على محلول تظهير متكون من تولوين : كلوروفورم : خلات الاثيل : حامض الفورميك وبالنسب الحجمية (35 : 25 : 25 : 15) والمحضر آنياً والموجود في قعر حوض الفصل بعمق 1 سم وترك هذا المحلول لمدة من 1 - 2 ساعة داخل الحوض المغلق وذلك لتشبيع الحوض بابخرة المذيبات ثم وضعت الصفيحة داخل الحوض وعند وصول المذيب لمسافة 2 سم من اعلى الصفيحة أخرجت الصفائح من الحوض وتركت لتجف في الظلام وبدرجة حرارة الغرفة ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وعلى طول موجي 366 نانومتر باستعمال جهاز UV Viewing cabinet . وقيست نسبة الجريان على ضوء المعادلة التالية : R f المسافة من نقطة الاصل الى البقعة/ المسافة من نقطة الاصل الى الجبهة (4) وقورنت مستخلصات 20 عزلة واختيرت العزلة الأعلى نتاجاً للاوكراتوكسين A على ضوء شدة وحجم

التألق للبقع باللون الأزرق المخضر وأعطيت تسمية رمزية هي OTA14 . نميت هذه العزلةعلى وسط الرز لأنتاج الاوكراتوكسين A (54) واجريت عليها عملية الاستخلاص ووضعت مستخلصات العينات في أنابيب صغيرة وحفظت في المجمدة لحين التقدير الكمي للسم .

تنمية الفطرعلى وسط الرز وانتاج الافلاتوكسين B1 .

تم الحصول على عزلة عالية الأنتاج لسم الافلاتوكسين B1 من الدكتور سالم حسن صالح الورشان – وزارة العلوم والتكنولوجيا ، نميت على وسط **PSA** لغرض استعمالها في التجربة وكذلك نميت على وسط الرز وذلك لغرض اجراء التقديرالكمي لها .

التقدير الكمي للاوكراتوكسين A والافلاتوكسين B1

تم اجراء التقدير الكمي للأنموذجات المستخلصة من العينة (وسط YES السائل والرز) وتقدير الاوكراتوكسين A فيها في قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة – جامعة بغداد باستخدام جهاز الماسح الألكتروني TLC Scanner .(وبلغ تركيز العزلة العالية الانتاج OTA14 2400 مايكروغرام / كغم . اما الافلاتوكسين B1 فتم تقديره من قبل (10) على عينات وسط الرز في مختبرات اللجنة الوطنية لفحص واعتماد المبيدات واستعمل جهاز الكروماتوغرافي السائل ذو الاداء العالي High Performans Liquid Chromatography (HPLC) موديل Spctra-physics واستعمل عمود فصل من نوع Reverse phase (18-ODS) (4.5 m mid) والطور المتحرك Mobile phase مكون من خليط من 180 مل اسيتونايترل و 820 مل ماء مقطر و 10 مل حامض خليك ثلجي خلطت بالمازج قبل الاستعمال وتم التخلص من الفقاعات الغازية بالخليط ، استعمل مذيب الحقن بمزج 100 مل اسيتونايترل و 900 مل ماء مقطر و 10 مل حامض الخليك الثلجي . وبلغ تركيز السم في العينة 2 جزء في المليون .

فاعلية اليوريا الفايلكس في تثبيط النوع *A.ochraceus* على الوسط الزرعي

استعملت اليوريا وبنسبة 40 و 50 غم /لتر ومستحضر الفايلكس وهو مستحضر تجاري سائل منتج من قبل شركة Selko الهولندية ، يحتوي على مجموعة احماض هي : البروبيونيك والفورميك واللاكتيك وارثروفسفوريك والستريك والسوربك ومواد مانعة للتبخر ومواد ناشرة وماء وامونيا ، وهو محلول بني شفاف كثافته 1.07 ودرجة الحموضة لهُ 6 ونقطة الانجماد – 35 م^{o} ودرجة اللزوجة 13.1 ودرجة الغليان 104 م$^{\circ}$ يذوب في الماء وهو مستحضر غير سام وغير قابل للاشتعال. واستعمل بحسب النسب الموصى بها من قبل الشركة المصنعة في الأعلاف وتركيز آخر أعلى قليلامن النسبة الموصى فيها من قبل الشركة في الحبوب والتركيزان كانا بحد ود 1 غم / كغم (0.1 %) والآخر 2 غم / كغم (0.2 %) تخلط هذه النسب مع الماء المعقم بنسبة 1 : 4 تقريباً أو 1 : 5 وتمت إضافة هذه التراكيز إلى الوسط الغذائي المعقم المبرد وصُبت في اطباق معقمة قُطر 9 سم واستعملت أربعة أطباق لكل معاملة من معاملات اليوريا والفايلكس فضلاً عن معاملة المقارنة ثم لقحت الأطباق بعد تصلبها بقرص (بقطر7ملم) لكل طبق من مستعمرة الفطر *A. ochraceus* وحُضنّت الأطباق في درجة حرارة 25± 1 م$^{\circ}$ وحسب نسبة التثبيط .

تحديد أفضل النسب الفاعلة لبعض المساحيق النباتية في تثبيط نمو نوعين من الاسبرجلس على الوسط الزرعي

تم اختبار 3 نسب لمعرفة التأثير الفاعل لمسحوق نبات الدارسين واوراق وقشور النارنج بثلاث نسب وهي 20 غم /لتر و 30 غم / لتر و 50 غم / لتر لكل من النباتين تم الحصول على قلف اشجار الدارسين *Cinnamomum zeyalanicum* من السوق المحلية واوراق وقشور نبات النارنج *Citrus aurantium* جمعت في شهر شباط و آذار لعام 2006 وفرشت العينات بشكل جيد على ارضية نظيفة لكي تجف مع تقليبها بصورة مستمرة لمنع التعفن والاسراع بعملية التجفيف ، طحنت العينات جيداً باستعمال مطحنة wiley mill standard model No.3 Arther Thomas co. . ثم غربلت بغربال ناعم جداً ووضعت بأكياس بولي اثيلين وحفظت في المجمدة تم اختبار مسحوق الدارسين ومسحوق أوراق وقشور النارنج وبنسبة خلط (75% أوراق +25 قشور) وباستخدام طريقة التسمم الغذائي(27) . تم إضافة التراكيز إلى الوسط الغذائي المعقم والمبرد وصُب بعد ذلك في أطباق معقمة قطر 9 سم واستعملت أربعة أطباق لكل معاملة وكذلك معاملة المقارنة ثم لقحت الأطباق بعد تصلبها في المركز بقرص (7ملم) لكل طبق من المستعمرات الفطرية.حضنت الأطباق في درجة حرارة 25 ± 1 م^{o} وأخذت النتائج بحساب متوسط قطرين متعامدين من كل مستعمرة ، بعد اكتمال نمو مستعمرة المقارنة لكامل الطبق يتم حساب النسبة المئوية للتثبيط باستعمال المعادلة التالية :

% للتثبيط = متوسط قطر مستعمرة المقارنة – متوسط قطر مستعمرة المعاملة/ متوسط قطر مستعمرة المقارنة ×100

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لعليقة الدواجن ومكوناتها .

بينت نتائج العزل المايكروبي للفطريات في عليقة الدواجن وجود عدد من الفطريات المرافقة إذ تصدرتها أنواع الجنس *Aspergillus spp* اذ بلغت نسبة تكرارها 37% ويليها أجناس الفطر *Penicillium spp* 34% والـ *Fusarium spp* 20 % و *Rhizopus spp* 7% والـ *Mucor spp* 1% والـ*Cladosporium spp* 1% وهذا يتفق مع ما ذكرهُ (6) من سيادة الجنسين *Penicillium spp* و *Aspergillus spp* في علائق الدواجن والحيوانات (14و9) . من سيادة الجنس *Aspergillus spp* في علائق الدواجن وما توصل إليه (9 و 12) من سيادة الفطر *A. flavus* في مخازن الذرة الصفراء(9 ،12). والتي تمثل المكون الرئيس للعلائق . ومع ما ذكرهُ (16) من سيادة هذا الفطر في البلوكات العلفية . وكانت نسبة تواجد وتكرار الفطر *A. ochraceus* قد بلغ 8% من مجموع الفطريات المعزولة من العينات

، حيث وجد (17) ان نسبة تكرار هذا الفطر في عينات الذرة الصفراء كان 6% . ويعزى السبب في سيادة أنواع الجنس *Apergillus spp* في العلائق ومكوناتها إلى قابلية أنواع هذا الجنس للنمو بمحتويات رطوبية منخفضة تكون متوفرة عند حصاد المحاصيل وفي المخازن (9 و 3) .

تقييم قابلية عزلات الفطر *A. ochraceus* على إنتاج الاوكراتوكسين A

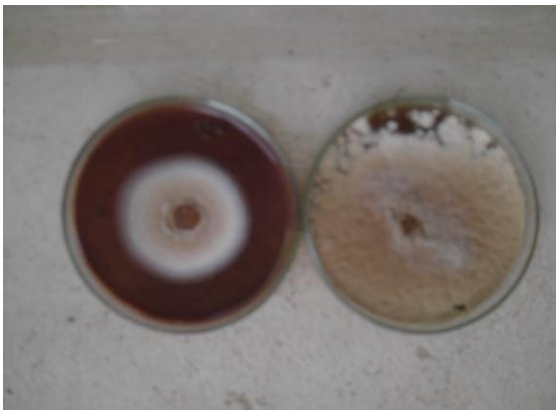
أظهرت نتائج التحليل الكروموتوكرافي على الصفائح الكروموتوكرافية الرقيقة (TLC) قدرة العزلات المختلفة للفطر *A. ochraceus* على أنتاج سم الأوكراتوكسين **A** والمعزولة من العلائق ومكوناتها وبعض الحبوب وتم التأكد من وجود السم بالفحص التأكيدي وتباينت عزلات الفطر في انتاجها للسم وكانت العزلة OTA14 أكثرها إنتاجا للسم استناداً إلى حجم البقعة وشدة تألقها وكان عدد العزلات المنتجة للسم 7 عزلات من مجموع 20 عزلة وبنسبة (35%). ويعزى تفاوت العزلات في انتاج الاكراتوكسين A على التغيرات الوراثية للعزلة .

تقييم أفضل التراكيز الفاعلة لمسحوق نبات الدارسين ومسحوق أوراق وقشور النارنج في تثبيط نمو نوعين من الاسبرجلس

أوضحت النتائج فاعلية تثبيطية عالية لمسحوق نبات الدارسين جدول 1و 2 في نمو الفطرين المختبرين اذ كان تركيز (20 غم/ لتر) 2% اعطى نسبة تثبيط للفطرين *A . ochracceus* و *A. flavus* 64.5 % و 62.22% على التوالي . وفي تركيز 3% كانت نسبة التثبيط 80.65 % و 79.44 % للفطرين على التوالي أما عند تركيز 5 % فكان النمو محدداً وضعيفاً جداً لكلا الفطرين فبلغت نسبة التثبيط 96.50 % و 95.25 % على التوالي (صورة رقم 1). وهذه النتائج تتوافق مع العديد من الدراسات التي أثبتت تأثير قلف وزيت نبات الدارسين في تثبيط العديد من الفطريات مثل *A. ochraceus* و *A. flavus* و *A . parasiticus* و *A. versicolor* و *F.moniliforme* (15 و 52). كما وجد أن لزيت الدارسين تأثير فعال في منع نمو الفطر *A. flavus* وتكوين الأفلاتوكسين في الوسط الغذائي السائل (47). أما بالنسبة لمسحوق أوراق وقشور النارنج فلم تكن النسب 2 % و 3 % مؤثرة في تثبيط نمو الفطرين فتراوحت قيم التثبيط بين 10 ـ 15 % فقط لكلا النسبتين ، أما في تركيز 5% فبلغت نسبة تثبيط الفطرين *A . ochraceus* و *A . flavus* 49.55 % و 45.60 % على التوالي (جدول 1و 2) وهذه النتيجة تتفق والتأثير الذي وجده (21) من أن 2000 ملغم/لتر من زيت الليمون و ملغم/لتر 3000 من زيت البرتقال قد منع بشكل فعال نمو الفطر *A. parasiticus* وتكوين الأفلاتوكسين في عصير العنب في حين كانت الكمية لأحداث نفس التأثير باستعمال وسط YEM هي 3000 من كليهما . ومع ما ذكره (15) من ان زيوت الحمضيات ثبطت نمو الفطر *A . parasiticus* وإنتاج الأفلاتوكسين وكان أشدها تأثيرا زيت البرتقال والليمون ، والليمونين d - limonene هو المكون الأساس لزيت البرتقال

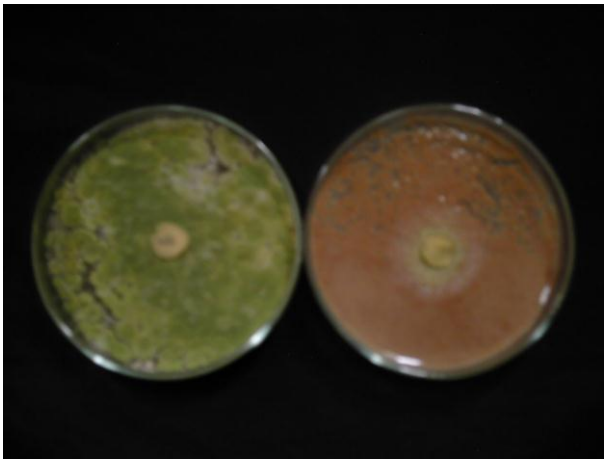
فاعلية اليوريا الفايلكس Fylax في تثبيط الفطر *A . ochraceus* على وسط PDA

أظهرت نتائج اضافة اليوريا ومحلول الفايلكس في تثبيط الفطر *A. ochraceus* على وسط PDA (جدول 1) بأن مركب اليوريا وبتركيز 4 % و 5 % سبب تثبيطاً كاملاً لنمو الفطر على الوسط الزرعي PDA عند المقارنة بالنمو الاعتيادي في معاملة السيطرة (صورة رقم 2) . وهذه النتائج تتفق مع ما توصل إليه (3 و 12 و 18 و 56) من فاعلية اليوريا في تثبيط نمو الفطريات في الأعلاف والبلوكات العلفية والذرة الصفراء . وقد تعزى هذه النتائج الى ان التأثير السام لليوريا او نواتج تحللها السامة مثل الامونيا والتي تكون سامة للفطريات (43 و 34) . إذ وجد (3) أن إضافة اليوريا إلى وسط PDA وبتركيز 4% سببت تثبيطا كاملا لنمو وتجرثم الفطر *A. flavus* كما وجدت (12) من أن اليوريا وبتراكيز أعلى من 3% سببت تثبيطا كاملا للفطر *A.flavus* وبتراكيز أعلى من 4 % سببت تثبيطا كاملا للفطر *F . moniliforme* على الوسط ألزرعي . أما بالنسبة لمستحضر الفايلكس ففي تركيز 0.1 % بلغت النسبة المئوية للتثبيط 73.61% . أما عند التركيز 0.2 % فكان ذو فعالية تثبيطية عالية فقد سبب تثبيطاً كاملاً (جدول 1) ولم يظهر أي نمو فطري خلال مدة التحضين وبعده (صورة رقم 2). وهذه النتائج تتوافق مع منشورات شركة Sellko الهولندية (13) فضلا عن الكثير من النتائج المستعملة فيها الحوامض ومركباتها لتثبيط نمو الفطريات فقد استعمل حامض الستريك وبتركيز 0.5% وحامض اللاكتيك بتركيز 0.75 % ضد الفطر *A.parasiticus* في حنطة الخبز لمنعه من إنتاج الأفلاتوكسين (45) وجد (8) بأن مادة اللبروسيل الحاوية على 99% من حامض البروبيونك ثبطت الفطريات التي تصيب الذرة الصفراء بنسب وصلت الى 100% ، كما وجد (6) استعمال 2500 – 5000 جزء في المليون من حامض البروبيونيك يثبط بشكل كبير العديد من الفطريات من أنواع الجنسين *Aspergillus spp* و *Penicillium spp* ألمعزولة من علائق الدواجن والحيوانات ومنعها من أنتاج السم . ومع ما ذكره (15) إن نسبة 0.2 % من حامض البروبيونيك . ثبطت نمو الفطر من 40 ـ 80 يوماً ومع ما توصل إليه (7 و 11 و 36) في فعالية العديد من الحوامض في تثبيط الكثير من أنواع الفطريات التي تصيب الحبوب في المخازن وكذلك علائق الدواجن وأعلاف الحيوانات .

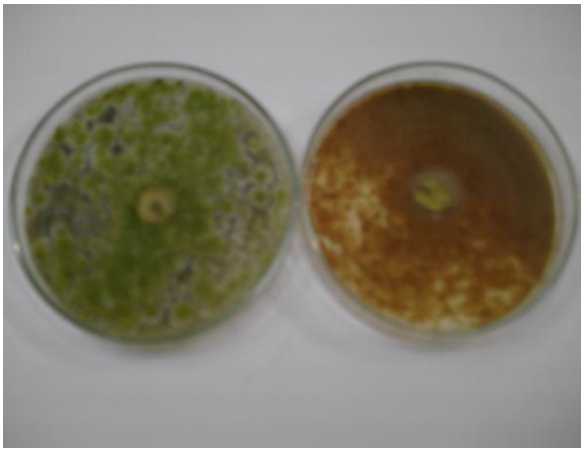


مقارنة أ معاملة

مقارنة ب معاملة



مقارنة ج معاملة



مقارنة د معاملة

مقارنة هـ معاملة

صورة (1) تأثير بعض نسب مسحوق الدارسين ومسحوق النارنج على الفطريات المختبرةالمختبرة .

أ- دارسين 2 % ب- دارسين 3 % (على الفطر *A. ochraceus*)

ج-دارسين 3 % د-دارسين 5 % (على الفطر *A. flavus*)

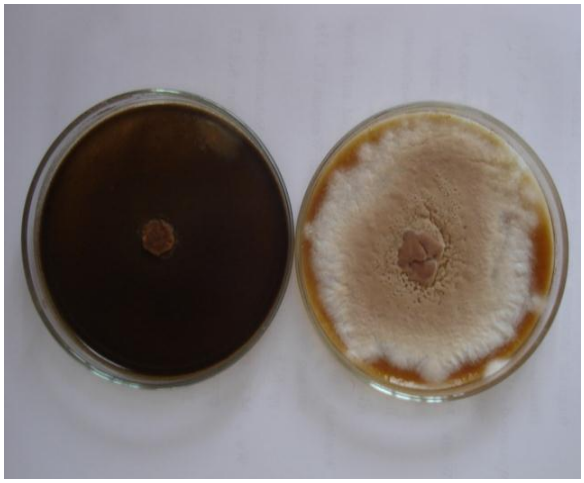
هـ - أوراق وقشور نارنج 5 % (على الفطر *A. ochraceus*)

جدول 1. نسب تثبيط المواد المختبرة للفطر *A. ochraceus*

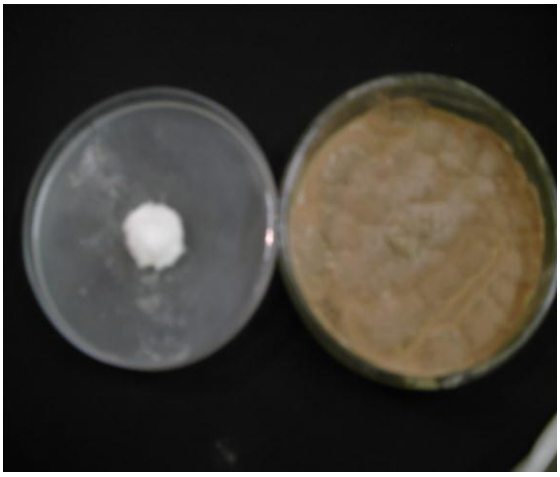
المواد المختبرة	نسب التثبيط (%)
يوريا 4%	a 100
يوريا5%	a 100
فايلكس0.1 %	bc 73.61
فايلكس 0.2 %	a 100
دارسين 2%	c 64.50
دارسين 3%	b 80.65
دارسين 5%	a 96.50
مسحوق اوراق وقشور النارنج 2%	ef 10.90
مسحوق اوراق وقشور النارنج3%	e 15.01
مسحوق اوراق وقشور النارنج5%	d 49.55
مقارنة(بدون اضافة)	f 0.00
LSD 5 %	11.752

جدول2. نسب تثبيط مسحوق الدارسين ومسحوق النارنج في الفطر *A. flavus*

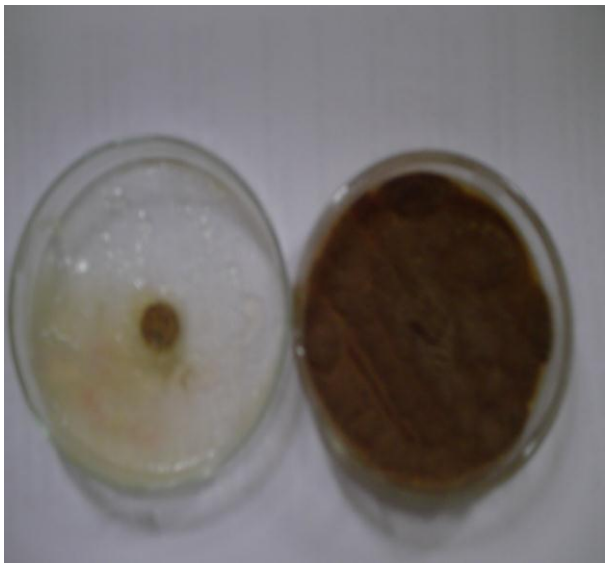
المواد المختبرة	نسب التثبيط (%)
دارسين 2%	c 62.22
دارسين3%	b 79.44
دارسين5%	a 95.25
مسحوق اوراق وقشور النارنج 2%	ef 10.00
مسحوق اوراق وقشور النارنج3%	e 14.81
مسحوق اوراق وقشور النارنج5%	d 45.60
مقارنة	f 0.00
LSD 5 %	11.042



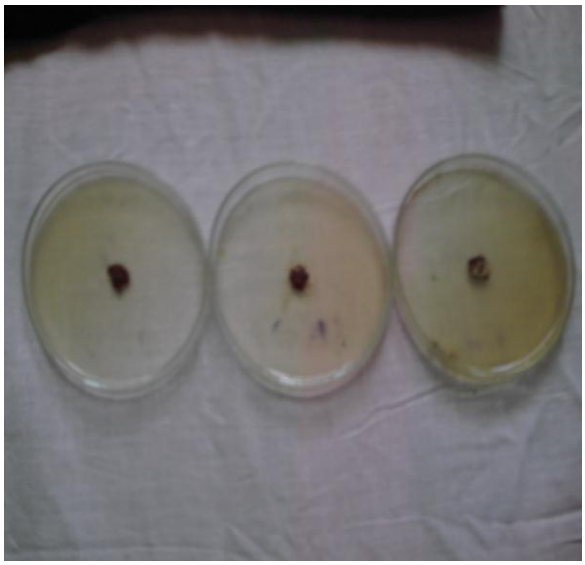
مقارنة أ معاملة



مقارنة ب معاملة



مقارنة ج معاملة



مقارنة د معاملة

صورة (2) تأثير بعض نسب اليوريا ومركب الفايلكس في الفطر *A. ochraceus* على الوسط الزرعي PDA .

أ- يوريا 5 % مقارنة ومعاملة ب- فايلكس 0.1 % مقارنة ومعاملة.

ج – د فايلكس 0.2 % (على الفطر *A. ochraceus*) مقارنة ومعاملات.

المصادر

1. **الجراح ، نيران سالم . 1988** . دراسة تعفن ثمار الكمثرى والرمان والسموم المفرزة من قبل مسببات التعفن بفترة ما بعد الجني . رسالة ماجستير–قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد . 115 ص.

2. **الزبيدي ، زهير نجيب وهدى عبد الكريم بابان وفارس كاظم فليح . 1996** . دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية . مركز طب الأعشاب – وزارة الصحة – العراق . دار الكتب والوثائق بغداد . 136 ص .

3. **الساعدي ، هادي علوان محمد شكير . 2004** . تقويم كيميائي و إحيائي لفعالية اليوريا في معالجة كسبتي زهرة الشمس والقطن الملوثة بالافلاتوكسين B1 . أطروحة دكتوراه– قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد 138 ص .

4. العـادل ، خالد محمد ومولـود كامل عبد . 1979 . المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل . 397 ص .

5.العـادل ، خالد محمد . 2006 . مبيدات الافات . مفاهيم أساسية ودورها في المجالين الزراعي والصحي . شركة الشمس للطباعة والنشر . بغداد . 422 ص.

6 . العـزاوي ، بتـول زينل . 1977 . دراسـة مدى تلوث العلائق الحيوانية بالافلاتوكسين والفطريات المنتجة له والمعزولة منها . رسالة ماجستير–قسم الاحياء– كلية العلوم – جامعة بغداد .105 ص.

7. **النـزال ، أحمد اسماعيل . 2004** . طرائق تحطيم سم الأوكرا A في الـذرة الصفراء وتأثيره على فروج اللحم . اطروحة دكتوراه–قسم الصناعات الغذائية – كلية الزراعة – جامعة بغداد . 115ص.

8. **الهـيتي ، أياد عبد الواحد . 1977** . الفطريات التي تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن تشخيصها ، تأثيراتها ، مقاومتها . رسـالة ماجسـتير– قسـم وقايـة النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد 96ص. .

9. **الورشـان ، سالم حسن صالح . 1999** . استعمال بعض الممدصـات الكيميائيـة للحد من تلوث علائق الطيور الداجنة بالافلاتوكسين B1 . رسالة ماجستير قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد 130 ص. .

10. **الورشـان ، سالم حسن صالح . 2006** . مقارنة بعض المعززات الحياتـية وممتزين في خفض الاثار السلبية للسم افلا B1 وتحسين الاداء الانتاجي لفروج اللحم . اطروحة دكتوراه قسم وقاية النبات . كلية الزراعة . جامعة بغداد 130 ص .

11. **جبـر ، كامـل سـلمان ، قائـد مسـعد عبـد الله الصـلاحي.2005** . تقـدير الكتلـة الحيويـة للفطريـات وسـم الافـلا B1 فـي بـذور الحنطـة المستوردة وإمكانيـة السيطرة عليه بالاحماض العضوية . مجلة العلوم الزراعية العراقية – 36 (2) : 127 – 134 .

12. **حسيـن ، حليمـة زغيـر . 2000** . استعمال اليوريا في مقاومة فطريات مابعد الجني وسمومها على الذرة الصفراء المخزونة . اطروحة دكتوراة قسم وقاية النبات ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد77ص .

13. **حسـين ، حليمـة زغيـر .2008.** كفـاءة مـادة الفايلكس في تحطيم تراكيز مختلفة من سم الأملا B1 على حاصل الذرة الصفراء المخزونة مجلة العلوم الزراعية العراقية 39 (3) : 104 – 112.

14. **حمـودي ، سـنبل جاسـم . 1988** . تـأثير تلـوث الأعـلاف بسـموم الأفلاتوكسـين B1 علـى بعـض الصـفات الاقتصـادية للـدجاج البيـاض . رسـالة ماجستيرقسم الثروة الحيوانية ـ كلية الزراعة ـ جامعة بغداد 98ص .

15. **عبد الحميـد ، محمد عبد الحميد . 2000** . الفطريات والسموم الفطرية . كلية الزراعة – جامعة المنصورة ، دار النشر للجامعات – جمهورية مصر العربية 322ص .

16. **مجيـد ، مجيد علي . 1997** . دراسة تأثير اليوريا على الفطر *Aspergillus flavus* والافلاتوكسين B1 في البلوكات العلفيـة . رسالة ماجستير قسم وقاية النبات – كليـة الزراعة – جامعة بغداد 40 ص .

17. **مرجان ، علي فاضل رزوقي . 2006.** المكافحة المتكاملة للمسببات الفطريـة المرافقة لبذور الذرة الصفراء . رسالة ماجستير قسم وقاية النبات – كليـة الزراعة– جامعة بغداد83 ص .

18. Anonymous 1999. Seilko, B.V correspondence p.o Box 4217, 5004 JE Tiburg, Jeilinghaus,streat 29, 5048 AZ, Tiburg, P 30.

19. Abarca , M .L ., M.R. Gastella ., G . Accensi ., and F.J Cabanes . 1997 . New ochratoxigenic species in the genus Aspergillus . Food Protection . 60 : 1580 – 1582.

20. Al-Adil , K.M., A.A.N. Basima , A.Y. Sawsan , and A.D. Kassim. 1977. Contamination by *Aspergillus flavus* group of some food stuffs in Baghdad. Bull. Biol. Res. Center . 9 : 107-115.

21. Alderman , G . G ., and E. H .Marth . 1976 . Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* by Citrus oils . Z . Lebensm . Unters . Forsch . 160 (4) : 353 – 35.

22. Alexopoulos . C .J . 1972 . Introductory Mycology .First Wiley Eastern reprint , P. 613 .

23. Balzer , I ., C . Boddanic . and S. Pepljujak . 1978. Rapid thin layer chrmatographic method for determining Aflatoxin B1, Ochratoxin A, and Zearalenon in corn . J . Assoc . off . Anal . chem. . 61: 584 – 585 .

24. Christensen , C . M . 1965 . Fungi in Cereal . grains and their products . In : mycotoxins in Food stuffs . G . N .Wogan, (ed) . M I T Press , Cambridge , MA . P : 9 – 14 .

25. Council for Agricultural Science and Technology . 2003 . Mycotoxins Risk in plant , Animal , and Human Systems .Report No.139 . Council for Agricultural Science and Technology . Ames Iowa . USA ISBNI – 887383 – 22.0 . ISSN 0194 – 4088 .

26. Devegowda , G ., K .L Arvind ., V . kumar . and C . K Girish . 2005 . Impact of Mycotoxins on poultry industry and some practical solutions .www.poulvet.co.

27. Dixit , S . N ., S . C . Tripathi . and S . w . Upadhey . 1976 . The antifungal substance of rose flowers (*Rosa indica*) . Economic Botany. 30: 371 – 0374 .

28. Doster , M . A ., T . J . Michailides and D . P .Morgan . 1996 . Aspergillus species and mycotoxins in Figs from California orchards . Plant Dis . 80: 484 – 489 .

29. Duke , O . S . 1990 . Natural Pesticides From Plant . Print in U. S. A , p : 511- 517

30. El – Yashevych , O. H. and Choch , A . M . 1972 . Some means of treatment in folk medicine of Lvov from Zh . 27 (6) : 78 – 79 . (Biological Abstr . 1973 . 56 : 56516) .

31. European Mycotoxin Awareness Network . Fact Sheet 1 Ochratoxin A . www.emanleatherheadfood.com .

32. European Mycotoxin Awareness Network. Fact Sheet 2 . Decontamination of mycotoxin contaminated Raw materials . www.emanleatherheadfood.com .

33. Frisvad , J . C . and R . A . Samson . 1991 . Mycotoxins produced by species of Penicillium and Aspergillus occurring in cereals . In : Chelkowski , J., (ed) Cereals grain . Elsevier Science Publishers , Amsterdam , P. P: 441- 476 .

34. Huwig , A., S. Freimund., O. Kappeli and H. Dulter. 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters. 122 : 179-188 .

35. IARC , 1993 . International Agency For Research on Cancer (IARC) – Summaries and Evaluation . Ochratoxin A (Group 2B) vol . 56 . p: 489 .

36. IFST ., Institute of Food Science and Technology Trust Fund . 2006. Institute of Food Science & Technology Information Statement Mycotoxins .www.ifst.org.

37. Jones , B . D . 1972 . Methods of Aflatoxin analysis . Tropical Products Institute Rep ., (G70) .

38. Klich , M . A and J. I. Pitt . 1988 . Alabo ratory Guide to the common Aspergillus species and their telomorphs . CSIRO , North Ryde , Astralia . pp: 116 .

39. Krishnamurthy, D. 2005 . poultry halchal mycotoxicoses In poultry . www.vetcareindia.com / halchal_mycotoxicoses in poultry. htm .

40. Land , C . J ., K. Hult ., R . Fuchs ., S . Hagelberg and H . Lundstrom . 1987. Tremorgenic mycotoxins from *Aspergillus fumigatus* as apossible Occupational Health Problem in sawmills . Applied Environmental microbiology. 53 (4) : 787 – 790 .

41. Marquardt , R. R and A . A . Frohlich . 1992 . Areview of recent advances in understanding Ochratoxicosis . Journal. Anim . Sci . 70 : 3968 – 3988 .

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

43. Piva ,G ., F , F P., R .D .A . Golvano ., AP. A.. Pietri . and R .D. Piva . 1995 . Detoxification method of aflatoxins . A review . Nutrition Research . 15 (5) : 767 – 776 .

44. Raper , K. B. and Fennel , D . L . 1965 . The genus Aspergillus . The Williams and Wilking Co ., Battimore , Maryland. P. 686

45. Reiss , J . 1976 . Prevention of the formation of mycotoxins in whole wheat bread by citric acid and Lactic acid . (Mycotoxins

in Food Stuffs . I X) . Experientia . 32 (2): 168 – 169 .

46. Scott . D . B . 1965 . Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products Mycopath . Mycol . Appl . 25: 213 – 222 .

47. . Shotwell ,O . L ., C . W . Hesseltine ., R . D . Stubblefield . and W. G . Sorenson . 1966 . Production of aflatoxins on rice Appl . Microbiol . 14 (3) : 425 – 428 .

48. Singh , H . B., M . Srivastave ., A . B . Singh and A . K . Srivastave . 1995 . Cinnamon bark oil , opotent Fungitoxicant Against Fungi causing respiratory tract mycoses . Allergy 50 (12): 995 – 999.

49. Sinha , K.K ., K.A .Sinha and G.Prasad . 1993 . The effect of Clove and Cinnamom oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* . Letters in Appl. Microbiol. 16 (3): 114 - 117 (Abstr).

50. Smith , J . W., C. W. Lewis., J . G .Anderson . and G . L . Solomons . 1994 . Mycotoxin in human nutrition and health . Directorate General X I I : Science , Research and Development . EVR 16048 EN . P : 111 – 117 .

51. Stander , M . A ., P. S. Steyn ., A . Lubben ., A . MiljKovic ., P . G . Mantle . and G . J . Marais . 2000 . Influence of halogen Salts on the production of the ochratoxins by *Aspergillus ochraceus* Wilh .Journal of Agr. and Food Ch. 48: 1865 – 1871 .

52. Soliman , K . M . and R . I . Badeaa . 2002 . Effect of oil extracted from some medicinal Plants on different Mycotoxigenic Fungi .Food and chemical Toxicology. 40 : 1669 – 1675 .

53. Soytong , K . and C . K . Annathakun . 1986 . Inhibition of fungal growth of *Aspergillus* spp . by Clove tree (*Syzygium aromaticum* L .) extracts . J . Thai . Phytopathological . Soc . 6 (1 - 2) : 1 – 6 (Abstr) .

54. Trenk , H.L., M.E. Butz and F.S. Chu. 1971. Production of ochratoxins in different cereal products by *Aspergillus ochraceus* . Applied . Microbiology ., 21 (6) : 1032-1035.

55. Waldroup , P . W . 1997 . Managing molds and mycotoxins in poultry Feeds . American soybean Association , 33 : 44 .

56. Zaman , M.S . and Owen , E .1990 . Effect of calcium hydroxide or urea treatment of barley straw on intak and digestibility in sheep . Small – Ruminant – Research , 3 , El – Sevier Science Publishers B.V., Amsterdam. 3 : 237 - 248 .