Effect Some Environmental Factors and Vitamins on Growth of *Aspergillus flavus* and Production Efficiency of Aflatoxin B_1 and B_2

تأثير بعض العوامل البيئية والفيتامينات في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وكفاءة إنتاجه سم الافلا B_1 و B_2 *

بان طٰه محمد عقيل عبد نعمة

جامعة كربلاء

* مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني .

المستخلص

أجريت تجارب مختبريه في مختبر الدراسات العليا بكلية التربية – قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء . لدراسة تأثير بعض العوامل البيئية مثل درجة الحرارة والأس الهيدروجيني و الرطوبة النسبية وكذلك كل من فيتامين A وE و C اتجاه الفطر *A. flavus* وإنتاجه سم الافلا B_1 وB_2.

و قد أظهرت النتائج إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ 4.83 سم عند الدرجات الحرارية المختلفة ، و 4.89 سم عند مستويات pH المختلفة ، وبلغ 5.88 سم عند مستويات رطوبية مختلفة ، إن الدرجة الحرارية 55 ºم عند pH يساوي 6.5 و pH 3.5 عند درجة حرارة 25 ºم أعطى نسبة تثبيط 100% للفطر ، في حين المستويات الأخرى للعوامل الثلاثة أعطت معدلات نمو مختلفة للفطر . وانعدم ظهور سم الافلا B_1 وB_2 عند معاملة الفطر بمستوى حراري 35 ºم و55 ºم ، في حين انعدم ظهور سم الافلا B_2 عند المستويين الحراريين 25 ºم و45 ºم ، لكن ظهر كلا النوعين من سم الافلا عند مستوى حراري 15 ºم ، وفيما يخص pH ظهر سم الافلا B_1 وB_2 عند مستوى pH يتراوح بين (6.5 – 9.5) ، لكن عند مستوى pH يساوي 3.5 انعدم ظهور كلا النوعين من سم الافلا ، إما pH يساوي 5 فقد ظهر النوع B_1 وكانت درجة الحرارة عند جميع المستويات 25 ºم ، إما الرطوبة النسبية فقد ظهر سم الافلا B_1 عند مستوى RH يساوي 20 و65 و80 %، في حين انعدم النوعان عند مستوى RH يساوي 50 %، ولكن مستوى RH يساوي 35 % ظهر النوع B_2 فقط .

استعملت الفيتامينات بتراكيز (1 و2 و3) ملغم/مل لدراسة تأثيرها في نمو الفطر *A.flavus* في الوسط الزرعي آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) الحاوي على هذه الفيتامينات ، فقد اظهر فيتامين A تفوقاً على بقية الفيتامينات في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *A. flavus* ، فأعطى أقل معدل نمو للفطر و هو 3.05 سم ، و يأتي فيتامين E بالمرتبة الثانية بين الفيتامينات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو 4.52 سم ، و جاء فيتامين C بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو 5.48 سم ، فوجد زيادة تركيز أي نوع من الفيتامينات يزيد من تثبيط الفطر ، إذ إن التركيز 3ملغم/مل من فيتامين A ثبط نمو الفطر بنسبة 100% ، إما التراكيز الأخرى لهذا الفيتامين والفيتامينات الأخرى ثبطت نمو الفطر لكن بدرجة اقل . و ظهر فيتامين E تفوقاً على باقي الفيتامينات إذ ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند جميع التراكيز ، إما فيتامين A فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند تركيز (3 و2) ملغم/مل ، وجاء فيتامين C في المرتبة الأخيرة فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 عند تركيز 3ملغم/مل.

Abstract

Laboratory experiments were carried out in the postgraduate laboratories, Biology Department – College of Education / Kerbala University . The Study aimed to assess the effect of some environmental factors such as temperature, pH and relative humidity, and the vitamins A , E and C on the fungus *A. flavus* and production aflatoxin B_1 and B_2 .

Results showed that, the rate of growth of fungus *A. flavus* was 4.83 cm at different temperatures, and 4.89 cm at different levels of pH and 5.88 cm at different levels of relative humidity . The temperature 55ºC at the pH equals to 6.5 and pH 3.5 at a temperature of 25ºC gave 100% of the inhibition of the fungus , while other levels of the three factors gave different rates of growth of the fungus. Aflatoxin B_1 and B_2 disappeared at the treatment of fungus at the

temperatures 35 ºC and 55 ºC , while aflatoxin B_2 disappeared at temperatures 25ºC and 45ºC , but both types of aflatoxin appeared at temperature 15ºC . Concerning pH , aflatoxin B_1 and B_2 appeared at pH ranged (5.6 to 5.9) , but at the level of pH 3.5 both types of aflatoxin disappeared when pH was equal to 5 , type B_1 appeared with the temperature at all levels of 25 ºC . Concerning relative humidity, aflatoxin B_1 appeared at RH equals to 20, 65 and 80, while both types disappeared at the level of RH equals to 50, but at the level of RH equals to 35, only type B_2 appeared .

Vitamins were used in concentrations (1, 2 and 3) mg / ml to study their impact on the growth of fungus *A.flavus* in the Potato Dextrose Agar (PDA) containing these vitamins. vitamin A showed an impaction on the other vitamins in the impact of inhibitory of growth of fungus *A. flavus* , the lowest growth of the fungus was 3.05 cm .vitamin E came in the second rank among the vitamins in the impact of inhibitory as it gave the growth rate of 4.52 cm , then vitamin C came in the last rank , which gave a growth rate of 5.48 cm. It was found that the increase concentrations of any type of vitamins increased the inhibition of fungus as the focus of 3 mg / ml of vitamin A inhibit fungus growth by 100% , while the other concentrations of vitamin A and other vitamins inhibited the growth of fungus, but to a lesser extent . Vitamin E exceeded the rest of the vitamins as it inhibited the production of aflatoxin B_2 at all concentrations, while vitamin A inhibited the production of aflatoxin B_2 at a concentration of (3 and 2) mg / ml , and vitamin C came in the last rank, as it inhibited the production of aflatoxin B_2 at a concentration of 3 mg / ml .

Introduction المقدمة

يعد سم الافلا Aflatoxin المنتج بشكل نواتج ايضية ثانوية بواسطة بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* مثل *A. flavus* و*A. parasiticus* و*A. nomius* واحد من أهم السموم الفطرية والذي يظهر في المواد الغذائية ومن أهم أنواعه سم الافلا :B_1 وB_2 وG_1 وG_2 ، وله القابلية على تسبب الطفرة Mutagenic والسرطان Carcinogenic والتشوه الجنيني Teratogenic وتسمم الكبد Hepatotoxic والنقص المناعي Immunosuppressive و تثبيط العديد من الأنظمة الايضة **[1]**.

تنمو الفطريات بصورة عامة ضمن مدى حراري يتراوح بين (12 – 48) °م ، ولكل فطر منها درجة حرارة مثلى للنمو أو لإحداث الإصابة أو المرض أو لإنتاج السموم **[2]** ، ينمو النوعان *A. flavus* و *A. parasiticus* بدرجات حرارية متماثلة تتراوح بين (12-41) °م ، لكن الدرجة الحرارية المثلى تتراوح بين (25 – 32) °م**[3]** . إما الإنتاج الأمثل للسموم فيقع ضمن مدى حراري يتراوح بين (24 – 28) °م ويشذ عن ذلك سم T – 2 إذ يبلغ أنتاجه الأعظم عند درجة حرارة 15 °م **[4]**، في حين بناء سم الافلا يزداد عند درجة حرارة أكثر من 27 °م ، ويتغير إنتاج سموم الافلا بتغير درجات الحرارة ففي مدى درجة الحرارة يتراوح بين (24 – 28) °م يزداد إنتاج سم الافلا B ، أما درجة حرارة 23 °م هي الدرجة الحرارية المثلى لإنتاج سم الافلا G ، في حين المدى الحراري المنخفض المتراوح (8 – 10) °م ينتج كل من سم الافلا G و B بكميات متساوية تقريبا ، لكن كمية الإنتاج الكلي لهما تكون قليلة وتتطلب وقتا أكثر **[3]**.

يزداد معدل نمو كل من *A.flavus* و *A.parasiticus* عند رطوبة نسبية تتراوح بين (78 – 100) % وبهذا المدى يغزو الفطران سطح الثمرة أو يمتد إلى لبها ، إما المدى المثالي لنمو الفطرين عند رطوبة نسبية تتراوح بين (98 – 100) % **[5]** . وفي تجربة أجراها **[6]** لدراسة نمو الفطر *A. parasiticus* على حبوب الرز فقد وجدا الرطوبة النسبية عند مستوى (100 و 80) % هما المستويين الأفضل لغزو جميع حبوب الرز ، إما إنتاج سم الافلا فقد بلغ أقصاه عند نفس المستوى الرطوبي .

يوجد العديد من الدراسات التي تبين تأثير pH على أنتاج سم الافلا لكنها مجربة في الأوساط السائلة وعلى المواد الغذائية مثل الذرة و الرز . ففي الوسط السائل اكار مستخلص الخميرة (AMY) فأن المستوى pH المتراوح بين (3 – 6) ملائم لإنتاج سم الافلا B ، إما المستوى pH المتراوح بين (6 – 8) ملائم لإنتاج سم الافلاG **[7]**، وفي دراسة أجراها **[8]** على تأثير مستوى pH على معدل إنتاج سم الافلا من نوع B1 في حبوب الذرة فقد وجد مستوى pH المتراوح بين (2 – 3) يثبط إنتاجه بصورة تامة ، إما مستوى pH المتراوح بين (3 – 7) يزيد من إنتاج سم الافلا B1 وبشكل طردي مع مستوى pH .

تعد الفيتامينات من المركبات العضوية والمتواجد بكميات قليلة في الأغذية وهي ضرورية في النمو والحفاظ على الصحة **[9]**. ويعمل فيتامين A كعامل مضاد للأكسدة وله القابلية على اختزال مرض التسمم بسم الافلا aflatoxicosis في الكبد والكلى لطيور *Coturnix coturnix* Japonica بعد إن جرعت بالسم مسبقاً**[10]**. ووجد**[11]** بأن بيتا – كاروتين -β Carotene له القابلية على تثبيط إنتاج كل من المركب الوسطي Norsolorinic acid وسم الافلا , وكذلك اختبرت فعالية بيتا – كاروتين ضد الفطر *A. flavus* والذي اختزل نمو الفطر بنسبة (89 – 96) % عند إضافة 50 مايكروغرام منه لكل مل من الوسط الصلب . ويعد فيتامين E كعامل مضاد للأكسدة في الجسم **[12]**. ولاحظ **[13]** بأن لفيتامين E القدرة على اختزال سم الافلا B_1 المجرع للدجاج عن طريق منع ارتباط السم بالحامض النووي لخلايا الكبد وبالتالي منع حدوث السرطان . ووجد كذلك**[14]**في تجربة على ذكور الفئران البيض في قابلية فيتامين E المجرع مع زيت الزيتون على اختزال سم الافلا ومنع حدوث التغيرات النسيجية غير الطبيعيه في البربخ . ويعمل فيتامين C كعامل مختزل Reducing agent فعالاً في الأنسجة , وكذلك يساعد على زيادة امتصاص عنصر الحديد من الأمعاء , ووجد إن لفيتامين C القابلية على زيادة فعالية بعض الإنزيمات (عامل مرافق للإنزيم) خارج الجسم *in vitro* **[12]**. وذكر**[15]** عند إضافة 3 مليغرام من سم الافلا إلى كيلو واحد من غذاء اسماك *Oreochromis niloticus* هي الكمية الكافية لإحداث التسمم لها , ويمكن اختزال هذه السمية عند إضافة 500 مليغرام من فيتامين C إلى الغذاء المعامل بالسم .

ونظراً للأهمية الاقتصادية التي يمتلكها الفطر *Aspergillus flavus* وتماسه المباشر مع المواد الغذائية لما يسبب لها من إتلاف ، لذا بات علية من إيجاد سبل السيطرة على الفطر من خلال معرفة تأثير بعض الظروف البيئية السائدة في الخزن لمعدل نمو الفطر *Aspergillus flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2 أو من خلال تأثير بعض الفيتامينات .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

تم الحصول على عزلة الفطرAFZ_3 Aspergillus flavus المنتجة لسم الافلا B_1 و B_2 من مختبر الدراسات العليا – قسم علوم الحياة – كلية التربية / جامعة كربلاء . نتيجة لتجارب سابقة لنفس الباحثين وتم التأكد من ذلك باستخلاص سم الافلا B_1 و B_2 بإتباع طريقة **[16]** وكشف عنه بإتباع طريقة **[17]** .

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

تأثير الـpH

استعملت خمس مستويات من pH (3.5, 5, 6.5, 8, 9.5) من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N ، أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى 40°م وفي ظروف معقمة باستعمال جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter و بمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى **[18]** ، و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام ، بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة (27±2) °م و لمدة عشرة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو من خلال حساب نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية :

معدل نمو الفطر = 100 – نسبة التثبيط

ومن ثم تم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 .

تأثير درجة الحرارة

استعملت خمس مستويات من درجات الحرارة (15 ،25 ،35 ،45 ،55) , وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى ، بعد إن عدل وسط PDA إلى 6.5 pH من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N , أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى 40°م وفي ظروف معقمة باستعمال جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter , بعدها صب الوسط في إطباق بتري و بعد تصلبه ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام , بعدها حضنت الأطباق جميعها لمدة عشرة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، و حسب معدل النمو للفطر , ومن ثم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2 .

تأثير الرطوبة النسبية RH

استعملت خمس مستويات من RH (20 ،35 ،50 ،65, 80) , وبمعدل ثلاثة مكررات لكل مستوى ، بعد إن عدل وسط PDA إلى 6.5 pH من خلال إضافة بضع قطرات من القاعدة NaOH بتركيز 2N , أو بضع قطرات من HCl بتركيز 12N إلى وسط PDA بعد إن برد إلى 40°م وفي ظروف معقمة باستخدام جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH meter , بعدها صب الوسط في إطباق بتري و بعد تصلبه ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PDA و بعمر 5 أيام . بعدها حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة (27±2) °م لمدة عشرة أيام في وحدة النمو Growth Cabinet . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسب معدل النمو للفطر, ومن ثم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2.

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

اتبعت طريقة**[19]**، إذ تم مزج كل من الفيتامينات كل على حده مع الوسط ألزرعي آكار دكستروز البطاطا (PDA) بعد إن برد إلى 40 °م ، و بثلاثة تراكيز (1 ، 2 ، 3) % ، و بمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز , و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PAD و بعمر 5 أيام . وتم استعمال مجموعتي سيطرة الأولى بدون إضافة إي مادة للوسط ألزرعي , والثانية بإضافة Clotrimazole بتركيز2 ملغم / مل إلى الوسط , حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة (27±2) °م و لمدة سبعة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسبت نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية**[18]**:

نسبة التثبيط = [(السيطرة – المعاملة) / السيطرة] X 100

ثم تم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2.

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع الفيتامين الأكثر فعالية في نمو الفطر تم اختبار التراكيز0.5 ، 1 ، 1.5 ، 2 ، 2.5 ، 3 ملغم/مل من الفيتامينات المؤثرة لغرض تحديد أدنى تركيز مثبط MIC لها في نمو الفطر و بالاعتماد على طريقة الانتشارdiffusion method إذ نشر معلق سبور الفطر *A. flavus* بقدر 4-210 x سبور/مل بواسطة ناشرة spreader على وسط (PDA) بعد تصلبه ، ثم عملت الحفر بوساطة الثاقب الفليني قطر 0.5 سم ووضع كل تركيز من الفيتامين في حفره بقدر 0.5 مل ، مع الأخذ بنظر الاعتبار بان هناك سيطر موجبة في ماء مقطر وسيطرة سالبة بإضافة Clotrimazole بتركيز2 ملم / مل من الماء المقطر إلى الوسط ، وحسب بعد ذلك التركيز المثبط الأدنى للفيتامينات**[20]** .

التحليل الإحصائي

تم تحليل تجربة تأثير كل من العوامل pH والرطوبة و درجة الحرارة بوصفها تجربة عاملية ، و باستعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD) و بثلاثة مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية 0.05 ، إما الفيتامينات فتم تحليل التجربة على أنها تجربة عاملية ايضا (5x3) لنوع الفيتامين والتركيز و باستعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD) و بثلاثة مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال الـ LSD و على مستوى احتمالية 0.05 ، وشمل هذا التحليل تجربة تأثير نوع الفيتامين وتركيزه والتداخل بينهما في معدل قطر المستعمرة (سم) **[21]** .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

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

أظهرت النتائج في الجدول (1) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين المستويات . و قد أظهرت النتائج إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ 4.83 سم عند الدرجات الحرارية المختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى 0 سم عند مستوى حراري 55 °م ، إما المستويان الحراريان (25 و35) °م فقد أعطى معدل نمو 9 سم للفطر ، في حين اعطى المستويان الحراريان (15 و 45) °م نسبة متقاربة وصلت إلى (3.2 و 2.93) سم وعلى التوالي الشكل (2) ، إذ أشار **[2]** إن الفطر *A.*

flavus ينمو في مدى حراري يتراوح بين (12 – 48) ºم لكن الدرجة الحرارية المثلى للنمو هي 37 ºم ، وتتفق مع ما وجده **[22]**إن الدرجة الحرارية المنخفضة والمرتفعة تقلل من الوزن الجاف للفطر *A. flavus* فالدرجة الحرارية 4 ºم تعطي نمو 1.4 ملغم/مل من الوسط ، إما درجة الحرارة 28 ºم أعطت 13.3 ملغم/مل، في حين الدرجة الحرارية 38 ºم بلغ فيها وزن الفطر 5.4 ملغم/مل ، ولا تتفق مع ما توصل إلية **[23]** إذ وجد الدرجة الحرارية 45 º م تعطي أعلى معدلا للنمو بقدر 721 ملغم / 100 مل من الوسط ، إما الدرجة الحرارية 30 º م أعطت 540 ملغم / 100مل ، في حين الدرجة الحرارية 55 º م قد أعطت نمو 138 ملغم / 100مل .

وضح الجدول نفسه إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ 4.89 سم عند مستويات pH المختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى 0 سم عند مستوى pH يساوي 3.5 ، إما مستوى pH يساوي 6.5 فقد أعطى أعلى معدل نمو للفطر الذي وصل إلى 9 سم ، في حين جاء مستوى pH يساوي 8 بالمرتبة الثانية فقد وصل معدل نمو الفطر إلى 6.5 سم ، إما في pH يساوي9.5 بالمرتبة الثالثة فقد وصل معدل نمو الفطر إلى 5.77 سم ، ووصل نمو الفطر إلى 3.2 سم عند pH يساوي5 كما في الشكل (1) ، إذ أشار **[24]** إن الفطر *A. flavus* ينمو بين مدى pH يتراوح بين (4.5 – 6.5) ، لا تتفق هذه النتيجة مع ما توصل إلية **[25]** إن الفطر *A. flavus* يصل إلى أقصى نمو عند pH يساوي 5 ودرجة حرارة 33 ºم . لكنها تتفق مع **[23]** إذ وجد معدل نمو الفطر يزداد بزيادة pH حتى pH يساوي 7 ثم يبدأ معدل النمو بالانخفاض نحو pH تساوي 10 ، فعند pH يساوي 4 معدل نمو الفطر قليلة لقد بلغ 460 ملغم/ 100 مل من الوسط ، لكن pH تساوي فان معدل نمو الفطر يصل إلى أقصاه فقد بلغ 721 ملغم/ 100مل ، في حين pH تساوي 10 فقد بلغ معدل نمو الفطر 504 ملغم/ 100مل

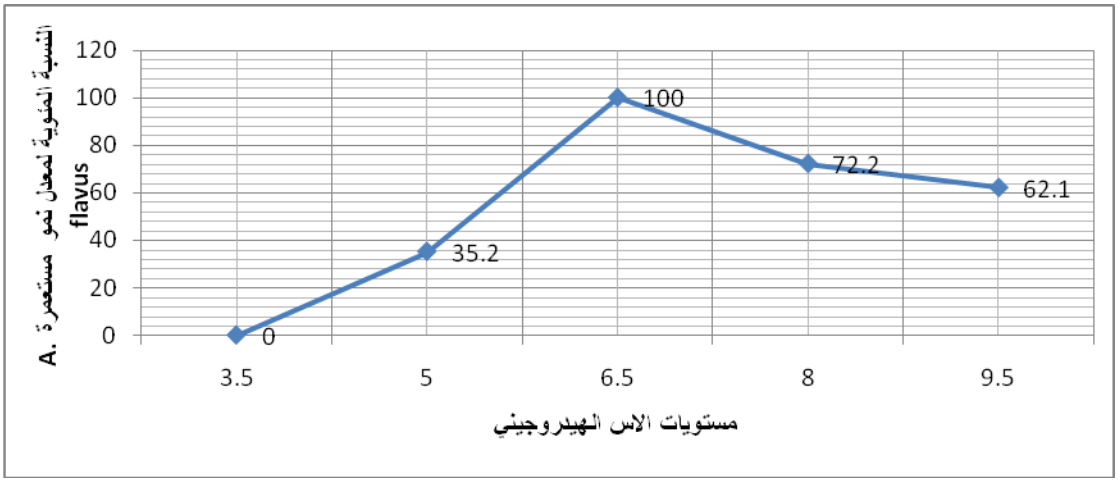
وبين الجدول كذلك إن معدل نمو الفطر *A. flavus* بلغ 5.88 سم عند مستويات رطوبية مختلفة ، إذ وصلت نمو المستعمرة إلى أدنى حد بلغ 3.27 سم عند مستوى RH يساوي35 ، إما مستويين RH (65 و50) فقد أعطى معدل نمو (4.77 و 4.70) سم للفطر ، في حين أعطى مستوى RH يساوي80 أعلى معدل لنمو الفطر وهو 9 سم ، ووصلت نمو مستعمرة الفطر إلى 7.67 سم عند مستوى RH يساوي20 الشكل (3) . إذ أشار **[26]** إن الفطر *A. flavus* يزداد معدل نموه بزيادة الرطوبة النسبية وصولا إلى 100 % ، وتتفق هذه النتيجة مع **[27]** إذ وجد إن الرطوبة النسبية من 80 % فما فوق تزيد من إصابة حبوب الذرة مختبرياً بالفطر *A.flavus* . وكذلك تتفق هذه النتيجة مع **[6]** إذ وجدا تزداد إصابة حبو ب الرز عند مستوى رطوبة نسبية تساوي 80 % ودرجة حرارة تتراوح بين (25 – 35) º م .

الجدول (1) تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد عشرة أيام من الحضن

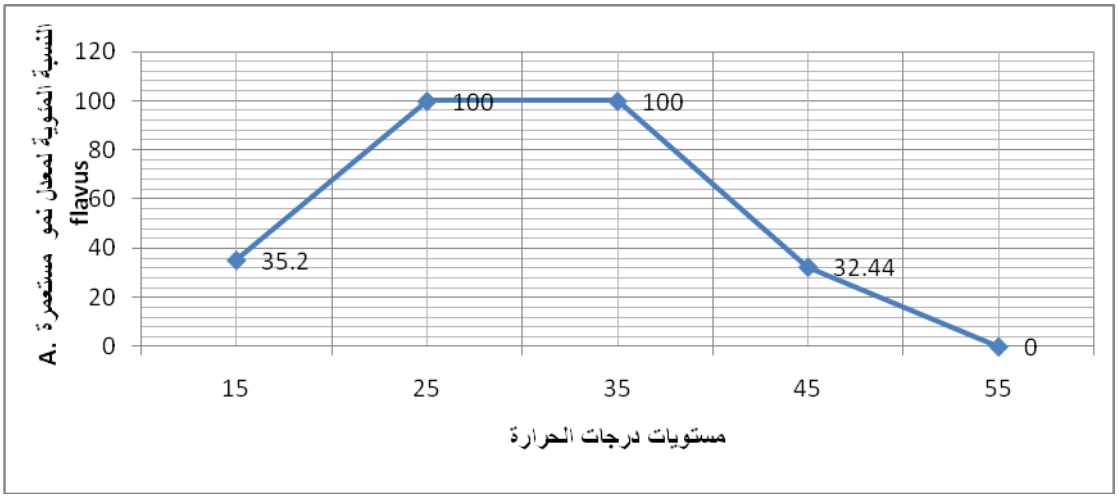
درجة الحرارة	معدل نمو الفطر	الأس الهيدروجيني	معدل نمو الفطر	الرطوبة النسبية	معدل نمو الفطر
15	3.20	**3.5**	0.00	**20**	7.67
25	9.00	**5**	3.20	**35**	3.27
35	9.00	**6.5**	9.00	**50**	4.70
45	2.93	**8**	6.50	**65**	4.77
55	0.00	**9.5**	5.77	**80**	9.00
المعدل	4.83	**المعدل**	4.89	**المعدل**	5.88

العامل	PH	ºC	RH
LSD $_{0.05}$	1.06	1.00	2.25

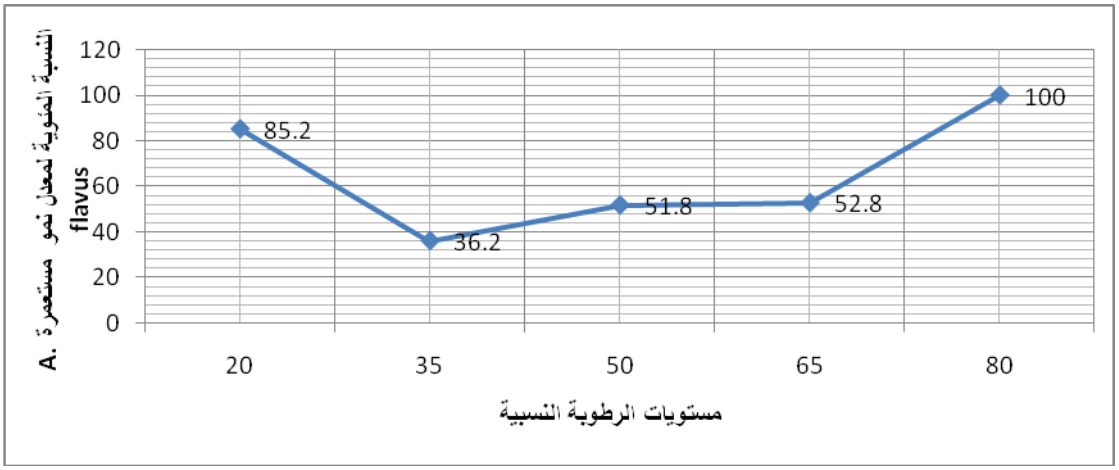
- التجربة أجريت بثلاث مكررات .



الشكل (1) تأثير الأس الهيدروجيني في معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA.



الشكل (2) تأثير درجات الحرارة في معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA



الشكل (3) تأثير الرطوبة النسبية في معدل نمو الفطر *A. flavus* في وسط PDA

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

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط (PDA) عند مستويات مختلفة من درجات الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية بعد تنمية العزلة فيه لمدة 10 أيام ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي.

اظهر الجدول (2) انعدام ظهور سم الافلا B_1 وB_2 عند معاملة الفطر بمستوى حراري 35 مº و55 مº ، في حين انعدم ظهور سم الافلا B_2 عند المستويين الحراريين 25 مº و45 مº ، لكن ظهر كلا النوعين من سم الافلا عند مستوى حراري 15 مº ، وكانت جميع المستويات عند pH تساوي 6.5 ، وربما يعود إفراز سم الافلا B_1 وB_2 عند درجة حرارة 15مº م هو إلى عامل الإجهاد الذي يتعرض اليه الفطر لان هذه الدرجة الحرارية لا تمثل النمو الأمثل للفطر ، إما درجة الحرارة 55مº م منعت نمو الفطر بصورة تامة وبالتالي عدم إنتاج سم الافلا ، ولا تتفق هذه النتيجة مع توصل اليه **[28]** فقد وجده الدرجة الحرارية 35º م تنتج سم الافلا B_1 ، وكذلك لا تتفق مع **[29]** إذ وجدة إن فستق الحقل يزداد بالتلوث بسم الافلا عند درجة حرارة أكثر من 29.6 º م .

وكذلك بين الجدول نفسه وفيما يخص pH ظهر سم الافلا B_1 وB_2 عند مستوى pH يتراوح بين (6.5 – 9.5) ، لكن عند مستوى pH يساوي 3.5 انعدم ظهور كلا النوعين من سم الافلا ، إما pH يساوي 5 فقد ظهر النوع B_1 وكانت درجة الحرارة عند جميع المستويات 25 مº ، وهذا قد يعزى إلى إن الفطر يفضل الأوساط ذات الطبيعة الحامضية المعتدلة والقاعدية الضعيفة لإنتاج سم الافلا ، وتتفق هذه النتيجة مع **[8]** فقد وجد مستوى pH المتراوح بين (2 – 3) يثبط إنتاج سم الافلا بصورة تامة في حبوب الذرة الصفراء , إما مستوى pH المتراوح بين (3 – 7) يزيد من إنتاج سم الافلا B_1 وبشكل طردي مع مستوى pH .

وبين الجدول نفسه إن الرطوبة النسبية أظهرت سم الافلا B_1 عند مستوى RHيساوي 20 و65 و80 %، في حين انعدم النوعان عند مستوى RH يساوي 50% ، ولكن عند مستوى RH يساوي 35 % ظهر النوع B_2 فقط ، وكانت جميع مستويات RH عند درجة حرارة 25 مº و pH 6.5 ، وتتفق هذه النتيجة مع **[30]** فقد وجد الرطوبة النسبية عند 80 % يزيد من معدل إنتاج سم الافلا في البندق البرازيلي ، وكذلك مع ما توصل إلية **[6]** إذ وجدا الرطوبة النسبية عند 85 %تؤدي إلى إفراز سم الافلا B_1 في الرز .

الجدول (2) تأثير درجة الحرارة والأس الهيدروجيني والرطوبة النسبية في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

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

+ : إنتاج سم الافلا .

- : عدم إنتاج سم الافلا .

تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* .

أظهرت النتائج في الجدول (3) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين الفيتامينات والتركيز ، و أن هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 نتيجة التداخل بين العاملين أعلاه .

فمن حيث نوع الفيتامين فقد اظهر فيتامين A تفوقاً على بقية الفيتامينات في تأثيره التثبيطي في نمو الفطر *A. flavus* ، فأعطى أقل معدل نمو للفطر و هو 3.05 سم ، إذ بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر 0 سم عند تركيز 3 ملغم/مل ، في حين التركيز (2 و 1) ملغم/مل أعطى معدل نمو للفطر(2.58 و 3.75) سم على التوالي ، و يأتي فيتامين E بالمرتبة الثانية بين الفيتامينات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو 4.52 سم ، فقد بلغ معدل نمو مستعمرة الفطر 4.25 سم عند تركيز 3 ملغم/مل ، في حين التركيز (2 و 1) ملغم/مل أعطى معدل نمو للفطر (4.33 و 5) سم على التوالي ، و جاء فيتامين C بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو 5.48 سم ، إذ بلغ معدل نمو الفطر 5 سم عند تركيز 3 ملغم/مل ، في حين التركيز (2 و 1) ملغم/مل أعطى معدل نمو (6 و7.25) سم على التوالي . و هذا قد يعود إلى الاختلاف في طبيعة وتركيب كل فيتامين لما يحتويه من مجاميع فعاله لتثبيط السم الشكل (4).

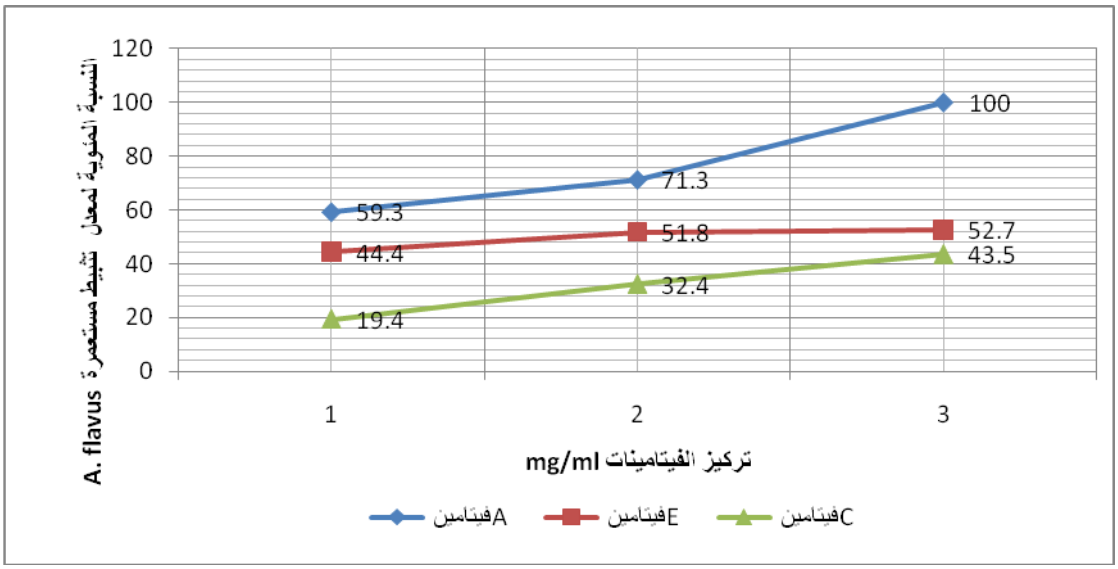
و قد أظهر التركيز 3 ملغم/مل تفوقا على التركيزين 1 ، 2 ملغم/مل في تأثيره التثبيطي و بفروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ، إذ أعطى معدل نمو للفطر 3.11 سم ، يليه التركيز 2 ملغم/مل الذي أعطى معدل نمو 4.33 سم ، و أخيرا التركيز 1 ملغم/مل إذ أعطى معدل نمو 5.31 سم ، وهذه النتيجة تتفق مع**[19]** الذي وجد ان التراكيز القليلة من مادة Methyleugenol لها فعالية تثبيطية قليلة على الفطر بالمقارنة مع التراكيز العالية أي إن معدل نمو الفطر *A. flavus* يصل إلى 3.9 سم على وسط اكار مستخلص الفستق (PMA)عند تركيز 0.1 % ، بينما يصل النمو إلى 0 سم عند تركيز 5.0 % من المادة ، وكذلك اتفقت مع**[31]**حيث وجد إن للمركبات القلوية الأربعة Piperlongumine و Piperine و Pipernonaline و Piperoctadecalidine معا ا تاثير على معدل نمو الفطر *A.flavus* فالتركيز 0.1 % من هذه القلويدات يبلغ معدل نمو الفطر إلى 50 ملم في وسط (PDA) ، في حين التركيز 0.5 % يصل معدل نمو الفطر إلى 47 ملم ، أي زادت نسبة التثبيط بزيادة تركيز المادة .

الجدول (3) تأثير الفيتامينات وتركيزها والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة 27 ± 2 °م .

التركيز / الفيتامين	مقارنة 1 ماء مقطر	مقارنة 2 Clotrimazole 2mg/ml	1 mg /ml	2 mg/ml	3 mg/ ml	المعدل للفيتامين
A	9	0	3.75	2.58	0	3.05
E	9	0	5	4.33	4.25	4.52
C	9	0	7.25	6	5	5.48
المعدل للتركيز	9	0	5.31	4.33	3.11	

العامل	الفيتامين	التركيز	التداخل
LSD $_{0.05}$	0.44	0.57	0.98

- التجربة أجريت بثلاث مكررات .



شكل (4) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من فيتامين A وE وC على وسط PDA .

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير الفيتامينات في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع الفيتامين الأكثر فعالية في نمو الفطر ، إذ يبين الجدول (4) إن فيتامين E و C كان لهما التركيز المثبط الأدنى هو 0.5 ملغم / مل ، في حين فيتامين A فتركيزه المثبط الأدنى بلغ 1 ملغم / مل .

الشكل (4) التركيز المثبط الأدنى للفيتامينات في الفطر *A. flavus* .

ت	نوع الفيتامين	التركيز المثبط الأدنى
1	A	1 mg/ml
2	E	0.5 mg/ml
3	C	0.5 mg/ml

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

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط (PDA) الحاوي على تراكيز مختلفة من الفيتامينات بعد تنمية العزلة فيه لمدة 7 أيام بدرجة 27±2°م ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي.

أظهرت النتائج في الجدول (5) تفوق فيتامين E على باقي الفيتامينات إذ ظهر سم الافلا B_1 عند معاملة الفطر بتركيز 1و2و3 ملغم/مل ، لكن ثبط إنتاج سم الافلا B_2 ، إما فيتامين A فقد ظهر النوع B_1 عند جميع التراكيز بالإضافة إلى النوع B_2 عند تركيز 1ملغم/مل ، وجاء فيتامين C في المرتبة الأخيرة في قابليته على تثبيط سم الافلا B_1 وB_2 ، إذ ظهر النوعان عند جميع التراكيز ماعدا تركيز 3ملغم/مل فقد ثبط إنتاج سم الافلا B_2 .

وقد يعود السبب في عدم ظهور سم الافلا B_1 و B_2 هو إنها تعمل على تغير التركيب الكيميائي للسم أو ترتبط بشدة معه**[32]** ، أو ربما تمنع المستخلصات تكون مركب Acetate من الايض الأولي الذي يعتبر أللبنة الأساسية في تكوين سم الافلا ، إما في حالة ظهور سم الافلا B_1 وغياب B_2 هو لربما ارتباط المستخلصات بأحد مركبات مسار تكوين سم الافلا B_2 . وقد تبين من النتائج أعلاه إن جميع تراكيز الفيتامينات ليس لها القابلية على تثبيط إنتاج سم الافلا B_1 ، وهذه النتيجة لا تتفق مع ما وجده**[4]** إذ إن جميع التراكيز α- Carotene أظهرت سم الافلا B_1 عند مستوى اقل 1 ملغم/مل ، في حين التركيز 1 ملغم/مل منع ظهور سم الافلا B_1 ، ومن جانب أخر تتفق النتائج مع **[4]**إذ وجد جميع التراكيز المنحصرة بين (0.032 – 1000) مايكروغرام/مل من β- Carotene لا تثبط إنتاج سم الافلا B_1 .

الجدول (5) تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من الفيتامينات في إنتاج سم الافلا B_1 و B_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

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

\+ : أنتاج سم الافلا .
\- : عدم أنتاج سم الافلا

المصادر References

1. Alpsoy, L. (2010). Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr. J. Biotech. ,9(17):2474-2481.
2. Hedayati, M. T.; Pasqualotto, A. C.;Warn, P. A.; Bowyer, P. & Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus* : human pathogen, allergen and mycotoxin producer . Microbiol., 153: 1677-1692.
3. Agag, B. I. (2004) . Mycotoxins in foods and feeds : 1-Aflatoxins . Ass. Univ. Bull. Environ. Res., 7(1): 173-206.
4. Bhatnagar, D. ; Yu, J. & Ehrlich, K. C. (2002) .Toxins of filamentous fungi . Chem. Immunol., 81:167-206.
5. Purcell, S. L. ;Phillips, D. J. & Mackey, B. E. (1980) . Distribution of *Aspergillus flavus* and other fungi in several almond – growing areas California . phytopathol. , 70: 926 – 929.
6. Boller, R. A. & Schroeder, H. W. (1973). Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus* . phytopathol. , 64 : 283 – 286 .
7. Buchanan, R. L. & Ayres, G. C. (1975) . Effect of initial pH on aflatoxin production . Appl. Microbiol., 30(6) :1050 – 1051.
8. Horn, B. W. & Wicklow, D. T. (1983) . Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger* . Can. J. Microbiol., 29: 1087-1091.
9. Vasudevan, D. M. & Sreekumari, S. (2004). Text Book Biochemistry . 4th edn. , Jaypee Brothers : 896 pp.
10. Denli, M. ; Celik, K. & Okan, F. (2003) . Effects of vitamin a supplementary in the feed to reduce toxic effects of aflatoxin B1 on japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Int. J. Poultry Sci. ,2 (2) : 174 – 177 .
11. Norton, R. A. (1997) . Effect of carotenoids on aflatoxin B1 synthesis by *Aspergillus flavus* . Phytopathol., 87 (8) : 814 – 821 .
12. Bender,D. A & Mayes, P. A. (2003) .Vitamins & Minerals :in Murray, R. K. ; Granner, D. K. ; Mayes, P. A. & Rodwell, V. W. (2003) . Harper's Illustrated Biochemistry . 26th edn., McGraw-Hill Companies : 693 pp.
13. Chen, J ; Goetchius, M. P. ; Combs - Jr, G. F. & Campbell, T. C. (1982) . Effects of dietary selenium and vitamin e on covalent binding of aflatoxin to chick liver cell macromolecules . J. Nutr., 112: 350-355 .

14. Verma, R. J.;Nair, A. and Mathuria, N. (2008) . Vitamin E ameliorates aflatoxin-induced alterations in the epididymis of mice . Acta poloniae pharmaceutica-drug research. ,65(3):331-337.
15. Shehata, S.A.; El-Melegy, K.M. & Ebrahim M.S. (2009) . Toxicity reduction of aflatoxin B_1 by vitamin C in Fish . J. Arab. Aquaculture Soc. 4 (2) : 73 – 86 .
16. Aryantha, N. P. ; Lunggani, A. T. (2007) . Suppression on the aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by lactic acid bacterial (*Lactobacillus delbrueckii , Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus planetarium*) . Biotechl., 6(2):257-262.
17. Bokhari, F. M. (2002) . Aflatoxins production by *Aspergillus flavus* ,isolated from different food stuffs commonly used in Jeddah region , Saudi Arabia . Pak. J. Biol. Sci., 5(1):69-74.
18. Yigit, A. & Korukluoglu, M. (2007) . The effect of potassium sorbate , NaCl and pH on the growth of food spoilage fungi . Annals Microbiol., 57 (2): 209-215.
19. Sudhakar, P.;Latha, P.;Sreenivasulu, Y.;Bhaskar Reddy, B. V.;Hemalatha, T. M. ;Balakrishna, M. and Raja Reddy . (2009) . Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AfB1) in peanut by methyleugenol . K. Ind. J. Exp. Biol. ,47:63-67.
20. Thenmozhi, M. & Kannabiran, K. (2010) . Studies on isolation, classification and phylogenetic characterization of novel antifungal *Streptomyces sp*. VITSTK7 in India . Curr. Res. J. Biol. Sci., 2(5): 306-312 .
21. الإمام ، محمد محمد الطاهر (2007) . تصميم وتحليل التجارب . دار المريخ للنشر ، المملكة العربية السعودية ، ط1 : 408 صفحة .
22. Bokhari, F. & Aly, M. M. (2009) . Trials towards reduction of fungal growth and aflatoxin G_1 production in Arabic coffee using different additives . Afr. J. Food Sci., 3 (3) : 68-76.
23. Olama, Z. A. & Sabry, S. A. (1989) . Extracellular amylase synthesis by *Aspergillus flavus* and *Penicillium purpurescence* . J. Islamic Academy Sci. 2 (4) :272-276 .
24. Shafique, S ; Bajwa, R & Shafique, S. (2009). Screening of *Aspergillus niger* and *A. flavus* strains for extra cellular alpha-amylase activity . Pak. J. Bot., 41(2): 897-905.
25. Holmquist, G. U. ; Walker, H. W. & Stahr, H. M. (1983) . Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* . J. food Sci., 48 (3) : 778 – 782 , (Abstract).
26. Nawar, L. S. (2008) . Prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia . Saudi J. Biol. Sci., 15 (1): 105-112 .
27. Hettiarachchi, G. H. C. M. ; Gooneratne, J. & Hirimburegama, W. K. (2001) . Effect of initial moisture content and relative humidity on the accumulation of aflatoxin in maize grains (*Zea mays*) during storage . J. Natn. Sci. 29 (1 -2): 29 – 34 .
28. Kamil, O. M. & Lupuliasa, D . (2011). Modern aspects regarding the microbial spoilage of pharmaceutical products . Farmacia ., 59 (2) : 133 – 146 .
29. Cole, R. J. ; Sanders, T. H. ; Hill, R. A. & Blankenship, P. D. (1985) . Mean geocarposphere temperatures that induce preharvest aflatoxin contamination of peanuts under drought stress . Mycopathol. , 91 : 41 – 46 .
30. Johnsson, P. ; Lindblad, M. ; Thim, A. M. ; Jonsson, N. ; Vargas, N. L.; Medeiros, E. A. ; Brabet, C. ; de Araújo4, M. Q. & Olsen, M .(2008) . Growth of aflatoxigenic moulds and aflatoxin formation in Brazil nut . World Mycotoxin J. 1(2) : 127 – 137 . (Abstract) .
31. Sung-eun, L. ; Mahoney, N. E. & Campbell, B. C. (2002) . Inhibition of aflatoxin B_1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. J. Microbiol. Biotech., 12 (4) :679 – 682 .
32. Hajare, S. S. ; Hajare, S. N. & Sharma, A. (2005) . Aflatoxin inactivation using aqueous extract of ajowan (*Trachyspermum ammi*) seeds . J. food Sci., 70(1): 29 – 34 .