

التأثير التثبيطي لحمض ألكليك في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وإنتاج حامض الكوجك وسم الأفلا B₁ في الذرة المخزنة

رضوان علي قاسم¹ وصلاح عمر أحمد

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق

الخلاصة

كان هدف الدراسة في محاولة التعرف على تأثير حامض ألكليك في نمو عزلة محلية للفطر *Aspergillus flavus* الملوثة للذرة الصفراء وإنتاج كل من حامض الكوجك وسم الأفلا B₁ إذ أضيف الحامض بتركيز 0.5 و 1 و 3 و 5 % الى الوسط جريش عينات الذرة فيما خلت معاملة المقارنة من الحامض أعلاه وجرى التخزين لمدة ثلاث أشهر في غرفة مغلقة وبدرجة حرارة الجو الاعتيادي وتم قياس معدل درجات الحرارة لكل شهر من أشهر الخزن وقدرت النسب المئوية للرطوبة والرقم الهيدروجيني والعدد الكلي للفطر وتركيز كل من حامض الكوجك وسم الأفلا B₁ في المعاملات المختلفة في بداية الخزن وعند نهاية كل شهر منه. بينت النتائج أن المحتوى الرطوبي للذرة الصفراء لم يختلف معنوياً بين المعاملات المختلفة سواء بإضافة تراكيز مختلفة من الحامض أو خلال مدد الخزن الثلاث ، فقد تراوحت نسب الرطوبة المعاملة إلى ادنى حدوده وبلغ 3.64 انخفضت أعداد الفطر *A.flavus* معنوياً بعد المعاملة بالحامض بالقياس مع معاملة المقارنة إذ تراوح العدد الكلي ما بين $0.75 - 0.95 \times 10^4$ و. ت. م / غم عند إضافة حامض ألكليك بتركيز 0.5 % وهو يقل عن معاملة المقارنة فيما ثبت نمو الفطر السابق بنسبة 100 % عند استعمال التراكيز 1 و 3 و 5 % من الحامض . حصل تثبيط لإنتاج كل من حامض الكوجك وسم الأفلا B₁ بواسطة الفطر السابق في الذرة المخزنة والمعاملة بحامض ألكليك فقد تراوحت تراكيزهما على التوالي ، 11.6 – 13.3 غم / كغم و 29.5 – 47.5 مايكرو غرام / كغم عند استعمال التركيز 0.5 % من حامض ألكليك وهو يقل عما حصل في معاملة المقارنة ، في حين أن زيادة تركيز الحامض المضاف إلى أكثر من 1 % أدى إلى إحداث تثبيط تام لإنتاج المادتين من قبل الفطر أعلاه.

الكلمات المفتاحية:

التأثير التثبيطي، حامض

ألكليك، الفطر *Aspergillus*

flavus، حامض الكوجك، سم

الأفلا.

للمراسلة:

رضوان علي قاسم

قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة

والغابات / جامعة الموصل /

العراق.

الاستلام: 2014/2/14

القبول: 2018/2/26

Inhibitory Effect of Acetic Acid on *Aspergillus flavus* Growth and Kojic Acid and Aflatoxin B₁ Production in Stored Corn

Radwan Ali Qassim and Salah Omar Ahmad

Food Sciences Dept.- College of Agric. & Forestry- Mosul University

ABSTRACT

Key words:

Aspergillus flavus ,
Acetic acid , Kojic
acid , Aflatoxin B₁
,Corn .

Corresponding Author:

Radwan A. Qassim

Food Sciences Dept.-
College of Agric. &
Forestry- Mosul
University- IRAQ.

Received: 14/2/2014

Accepted: 26/2/2018

The aim of this work was to study the effect of acetic acid on growing of local isolate of *Aspergillus flavus* which contaminated stored corn and on produced the kojic acid and aflatoxin B₁ , The acid were added with 0.5 , 1 , 3 , and 5 % compared with other control treatment of no added acids to stored corn . Samples were stored in closed room and the temperature was measured each month. Moisture percent , pH value, total count of fungus and concentration of kojic acid and Aflatoxin B₁ in all treatments at the beginning and at the end of the month were measured . Results indicated that moisture content did not significantly change through different treatments with different concentration added of acid and at three different period of storage, The moisture percent in corn was ranged between 17.0 to 18.25 % . pH values were decreased in corn with added of acid, The value was decreased from 6.7 at the beginning of the storage to lowest level (3.64).

Growth of *A.flavus* was inhibited and its count was decreased in corn of treatment with the above acid comparing with control treatment , The total count was ranged between $0.75 - 0.95 \times 10^4$ CFU / g when acid added with 0.5 % and this less than the number which found in control treatment , The growth of fungus decreased by 100% in case of addition of 1 , 3 and 5 % of acetic acid . Production of kojic acid and

¹ البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الاول

aflatoxin B₁ by *A.flavus* in stored corn inhibited with addition of acetic acid , The concentration of the two substances ranged between 11.6 – 13.3 g / Kg and 29.5 – 47.5 µg / kg , respectively after using the acid with 0.5% , and this less than the levels in control treatment. Addition of acetic acid with 1% or above inhibited the production kojic acid and aflatoxin B₁ by *A.flavus* complete .

المقدمة:

تعد المحاصيل الزراعية وخاصة الحبوب والبذور الزيتية كالحنطة والذرة والرز والشعير وفستق الحقل وفول الصويا وغيرها من المحاصيل الأساسية في حياة البشر إذ ترتبط هذه المحاصيل بصورة مباشرة بغذاء الإنسان وصحته وديمومة حياته . إن الذرة الصفراء من المحاصيل الزراعية المهمة في العالم بصورة عامة وفي العراق بصورة خاصة حيث ازداد الاهتمام بزراعتها من قبل المزارع العراقي وذلك لأهمية الاقتصادية الزراعية لهذا المحصول وللحاجة الماسة إليها في الاستخدامات المختلفة ، فهي تعد من المحاصيل التي لها مردود اقتصادي عالي كونها تستخدم كغذاء مباشر للإنسان أو تدخل في صناعة أغذية الإفطار الحبوبية كما أنها مصدر مهم للزيت وتتميز الذرة بارتفاع قيمتها الغذائية وخاصة محتواها العالي من حامض اللايسين الأساسي والنشا (MC Williams) . بالإضافة إلى أنها تدخل في تحضير الأعلاف الحيوانية (shanum وآخرون ، 2007) تتعرض المحاصيل الزراعية للتلوث بالفطريات خلال عمليات الإنتاج والحصاد والخزن (الطحلي وآخرون ، 2005) ، للأجناس المنتجة للسموم ومن ذلك التلوث بالأنواع التابعة للأجناس المنتجة للسموم خاصة *Aspergillus sp.* و *Trichoderma sp.* و *Penicillium Sp.* و *Alternaria sp.* وغيرها وأن عددا من انواع الفطريات التابعة للجنس *Aspergillus* وجدت ملوثة للمحاصيل الزراعية المخزنة خاصة *A.flavus* و *A.parasiticus* ، وتعد هذه من الانواع المنتجة للسموم خاصة سموم الافلا *B₁* ، *B₂* ، *G₁* ، *G₂* (Lugauskas وآخرون ، 2006) .

بينت الدراسات أن الذرة وجدت ملوثة بتراكيز عالية من سموم الافلا هذه تعد مسببة للسرطان ومثبطة للجهاز المناعي وذات تأثيرات خطيرة في صحة الانسان عند استهلاك الأغذية الملوثة بها (Petchkongtaew ، 2008) .أضافة الى سموم الافلا فان الفطريات الملوثة للذرة قد تفرز متايبضات اخرى خاصة حامض الكوجك (Kojic acid) اذ يفرز هذا المركب بواسطة انواعا من الفطريات مثل *A.oryzea* و *A.flavus* و *A.parasiticus* وغيرها (Ana Paula وآخرون ، 2011) ، ويحصل ذلك عند نمو هذه الفطريات في الذرة المخزنة عند توفر درجات الحرارة والرطوبة والظروف البيئية المناسبة ، ولهذا المركب تأثيرات مختلفة اذ صنف من قبل بعض الباحثين على انه احد انواع السموم الفطرية ولوحظ انه سبب تثبيط لأنزيم التايروسينيز ومن جهة اخرى ان حامض الكوجك عد من المضافات الغذائية ومضاد للأكسدة والاورام والاحياء المجهرية وان تأثيره الحيوي اعتمد على تركيزه المضاف او المتواجد في الاغذية (Blumenthal ، 2004 و Moto وآخرون ، 2006 و Chang ، 2009) .

للعديد من المركبات تأثير مثبط لنمو الفطريات خاصة الأحماض العضوية وهي بذلك تعد مواد حافظة للأغذية خاصة المخزنة ، في دراسة قام بها Higgins و Briankhus (1999) لاحظا أن عدد من الاحماض العضوية كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطريات ووجدا أن التراكيز العالية من حامض ألكليك تثبط نمو الفطر *A.flavus* ، وبصورة عامة حصل تثبيط لفطريات الجنس *Aspergillus* بحامض الخليك بنسبة 100% عند المعاملة بالحامض بتركيز 0.35 % .

هدف الدراسة الحالية هو التعرف على تأثير عدة تراكيز من حامض ألكليك في نمو الفطر *A.flavus* وإفراز كل من حامض الكوجك وسم الأفلا B₁ في الذرة الصفراء المخزنة لمدة ثلاث أشهر .

مواد البحث وطرائقه:

الذرة الصفراء:- الذرة الصفراء *Zea mays* المستخدمة في الدراسة صنف (بحوث تربي 5018) مصدرها الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور فرع كركوك ، وعند الاختبار تم التأكد من خلوها من كل من حامض الكوجك وسموم الأفلا.

الفطر :- تم الحصول على عدة عزلات محلية للفطر *Aspergillus flavus* من مصادر مختلفة إذ شخصت العزلات وفق ما ذكره Klick و Pitt (1988) وتم الفحص والتشخيص في كلية الزراعة والغابات بجامعة الموصل - قسم وقاية النبات ، بعدئذ جرت عمليات إعادة زرعها وتنشيطها لغرض اختبارها للتبين من قدرة كل عذلة على إنتاج حامض الكوجك وسم الافلا B1 فقد نميت عزلات الفطر *A.flavus* في وسط أجار البطاطا - دكستروز (Potato Dextrose Agar) (PDA) هندي المنشأ المائل في دوارق زجاجية سعة 250 مل معقمة وبعد تلقيح الدوق بالعذلة تم التحضين بدرجة حرارة 28م⁵ لمدة 7 أيام ، ثم حضر معلق السبورات (الابواغ) وجمع المعلق السبوري لكل عذلة بعدئذ جرى عد السبورات بطريقة الإطباق المصبوبة وفق ما ذكره (Harrigan وآخرون ، 1976).

اختبار قدرة العزلات على إنتاج حامض الكوجك وسم الافلا B1 :- جرى اختبار عذلة للفطر السابق على إنتاج كل من حامض الكوجك وسم الافلا B1 وذلك بتحضير دوارق زجاجية سعة 250 مل تحوي 25 غم جريش الذرة وبعد الترطيب لمدة 1 ساعة جرى التخلص من الماء الزائد ومن ثم عقمت الدوارق وبردت ولقحت بـ 1 مل من المعلق السبوري لكل عذلة (أحتوى تقريبا 10×10^6 سبورة / مل) ، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 28 م⁵ لمدة 7 أيام وجرى تقدير كل من حامض الكوجك وسم الافلا B1 .

اعداد العينات :- حضرت عينات جريش الذرة ووزعت في دوارق زجاجية سعة 250 مل بواقع 100 غم / دوق ، وعدلت نسبة الرطوبة لتصبح 18% تقريبا .

اضافة حامض الخليك :- تم اضافة حامض الخليك الى الدوارق الحاوية على جريش الذرة الصفراء وبتراكيز (0.5 و 1 و 3 و 5 %) فيما خلت معاملة المقارنة من الحامض وقد خففت الكميات المحسوبة من الحامض وبتراكيز المدروسة بماء مقطر معقم ساخن وقد أخذ بنظر الاعتبار كمية الماء المضافة مع الحامض كمحلول الى العينات اذ حسب مع نسبة الرطوبة التي جرى ضبط الذرة عليها حسابيا .

اضافة معلق العذلة والخزن :- لقحت الدوارق الزجاجية الحاوية على جريش الذرة بالمعلق السبوري للفطر (بواقع 10×10^4 و.ت.م / غم ذرة) رجت الدوارق وخزنت لمدة 1 و 2 و 3 أشهر ، بدرجة حرارة الجو الاعتيادية وجرى تقدير كل من النسبة المئوية للرطوبة وأعداد الفطر والرقم الهيدروجيني وتركيز حامض الكوجك وسم الافلا B1 في كافة المعاملات وذلك في بداية التجربة وبعد كل مدة من مدد الخزن علما ان بداية التجربة (بداية الخزن) كانت في 20/2/2014 ، وتم قياس درجة حرارة المخزن يوميا وحسب معدل درجات الحرارة لكل شهر من الخزن .

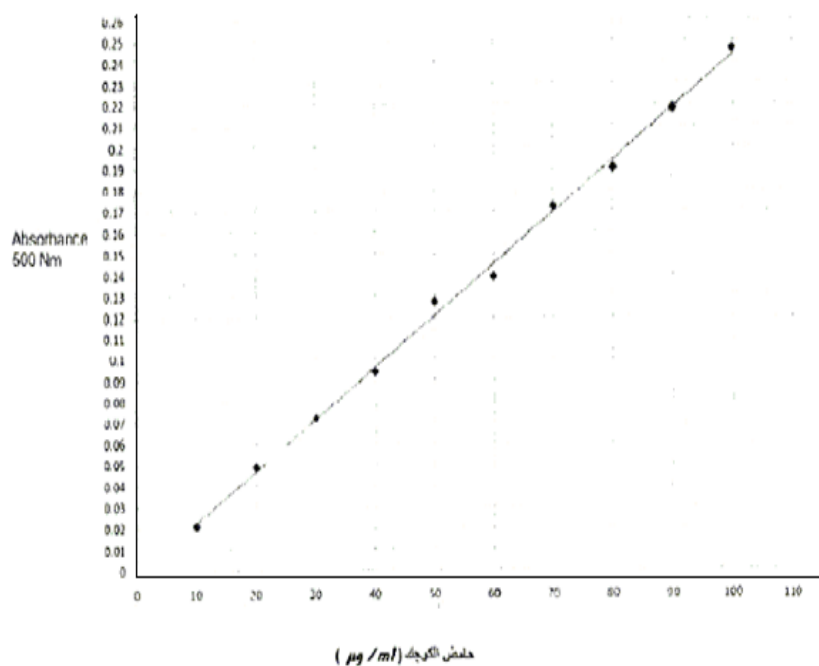
الاختبارات:

تقدير الرطوبة :- قدرت النسبة المئوية للرطوبة وفق ما جاء في (AOAC ، 1980).

تقدير الرقم الهيدروجيني : تم قياس الرقم الهيدروجيني وفق ما جاء في (AOAC ، 1980).

العدد الكلي للفطر *A. flavus* :- قدر العدد الكلي للفطر في المعاملات وفق ما ذكره (Suleiman و Tiaga ، 2009) باستخدام وسط أجار البطاطا - دكستروز (PDA) مضافا اليه Chloramphenicol بواقع 200 ملغم / لتر وحسب ما ذكر (Pitt و Hocking ، 1997) والكلورومفينيكول مصدره شركة BROWN الهندية . اذا حضر تخفيف لحد 10^{-3} ثم نقل 1مل من التخفيف الاخير الى طبق بتري معقمة بواقع مكررين لكل نموذج ومن ثم التحضين بدرجة حرارة 28 م⁵ لمدة 4 أيام اذ جرى عد المستعمرات النامية ثم ضربت في مقلوب التخفيف.

تقدير حامض الكوجك : بعد مزج عينات الذرة الصفراء التي نمت عليها الفطر *A.flavus* وضع 5 غم منها في دورق زجاجي سعة 250 مل وأضيف إليها 45 مل ماء مقطر ساخن للحصول على تخفيف 10 / 1 ورجت جيدا لمدة 30 دقيقة ورشحت من خلال ورق ترشيح Whatman رقم 40 ، تم استخدام الطريقة اللونية لغرض تقدير حامض الكوجك (Bently ، 1957) أذ اخذ 1 مل من التخفيف أعلاه ومزج مع 2,5 مل حامض الهيدروكلوريك 0,1 مولاري وأضيف إليه 0,2 مل من كلوريد الحديدك $FeCl_3$ (0,2 مولاري) في أنابيب اختبار رجت جيدا وقرأت بجهاز Spectrometer من نوع APEL ألماني المنشأ وعلى طول موجي 500 نانوميتر وقدرت كمية حامض الكوجك باستخدام طريقة المنحى القياسي لهذا الحامض ووفق ما موضح في الشكل رقم (1) .



الشكل (1) يوضح المنحى القياسي لحامض الكوجك

تقدير سم الافلا B₁ : جرى استخلاص سم الافلا B₁ من كل من عينات الذرة الصفراء وفستق الحقل وفق الطريقة الذي ذكرها Samarajeewa (1984). اذ جرى استخلاص سم الافلا B₁ من المعاملات باستخدام الاسيتون المائي (70%) ثم رسبت المواد غير الذائبة والبروتينات باستخدام محلول 10% خلات الرصاص ، بعدها ازيل الدهن باستعمال الايثر الكحولي ومن ثم استخلص السم في قمع فصل سعة 250 مل باستخدام الكلوروفورم ولمرتين اذ جمعت طبقة الكلوروفورم السفلية في دورق زجاجي سعة 250 غم يحوي كربونات النحاس لقصر اللون العينة اذ رج الدورق جيدا ثم رشح من خلال ورقة ترشيح Whatman رقم 40 وجمع الراشح في بيكر سعة 100 مل ثم جففت طبقة الكلوروفورم تماما بتركها في مكان مظلم الى اليوم التالي جرى فصل سم الافلا B₁ باستخدام الكروماتوغرافي الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography) (TLC). بسمك 0.25 ملم مطلية بهلام السليكا وتم الفصل والتطوير باستخدام محلول تطوير كلوروفورم : ميثانول 97:3 (Jones ، 1972). بعد ذلك جففت طبقة ال TLC وشخص سم الافلا B₁ بالمقارنة مع السم القياسي مصدره شركة Veratox الامريكية وذلك تحت الاشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز Chromato. Vue C.75 Uv/ Visible مصدره شركة UVP الامريكية . تم قشط بقع سم الافلا B₁ واذابتها في الميثانول وتمت

القراءة الامتصاص بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer مصدره شركة Apple اليابانية عند طول موجي 362 و 420 نانوميتر وفق الطريقة التي ذكرها Nabney و Nisibitt (1965).

$$\text{Aflatoxin Mg / 5 ml} = \frac{D.M.10^6}{E.200.(0.5).L}$$

D = الامتصاص لقراءة المطياف على طول موجي 362 نانوميتر - القراءة على طول موجي 420 نانوميتر

M = الوزن الجزئي للسم ويساوي لسم الافلا B₁ 312

E = معامل امتصاص السم ولسم الافلا B₁ 22000

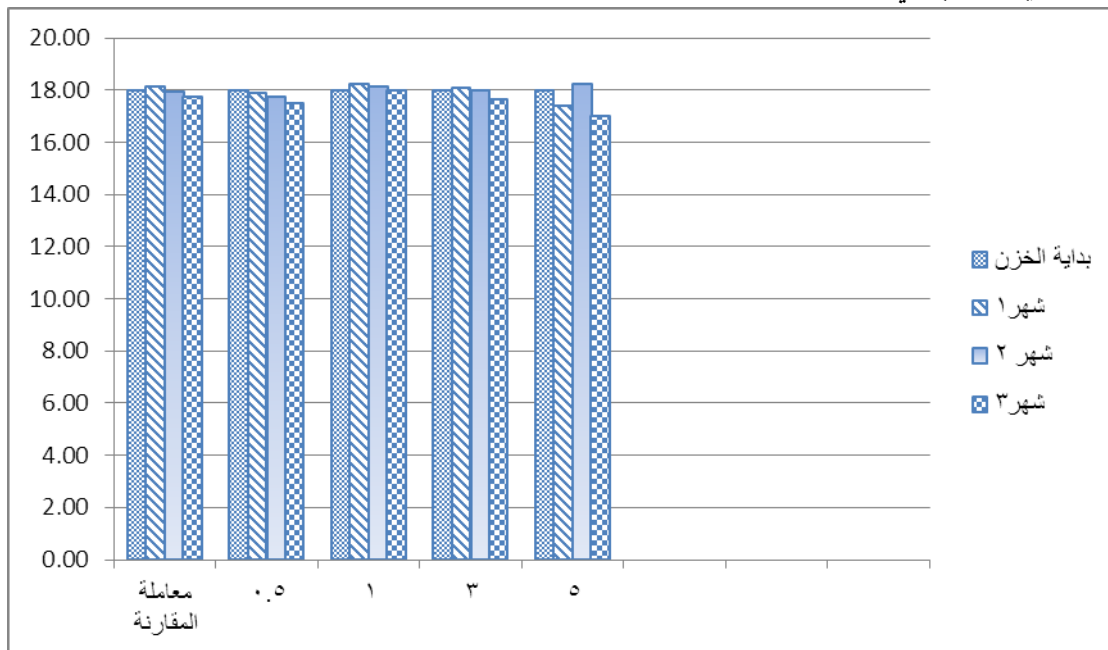
L = سمك الخلية = 10 ملم

النتائج والمناقشة:

معدل درجات حرارة الخزن:

خلال خزن الذرة الصفراء الذي بدأ من 2014/2/20 ولغاية 2014/5/20 حصل ارتفاع في معدل درجات حرارة غرفة الخزن أذ ان المعدل في الشهر الاول وصل الى 19.5م⁵ وارتفع خلال فترة الخزن الى 29.5 م النسب المئوية لرطوبة الذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك :

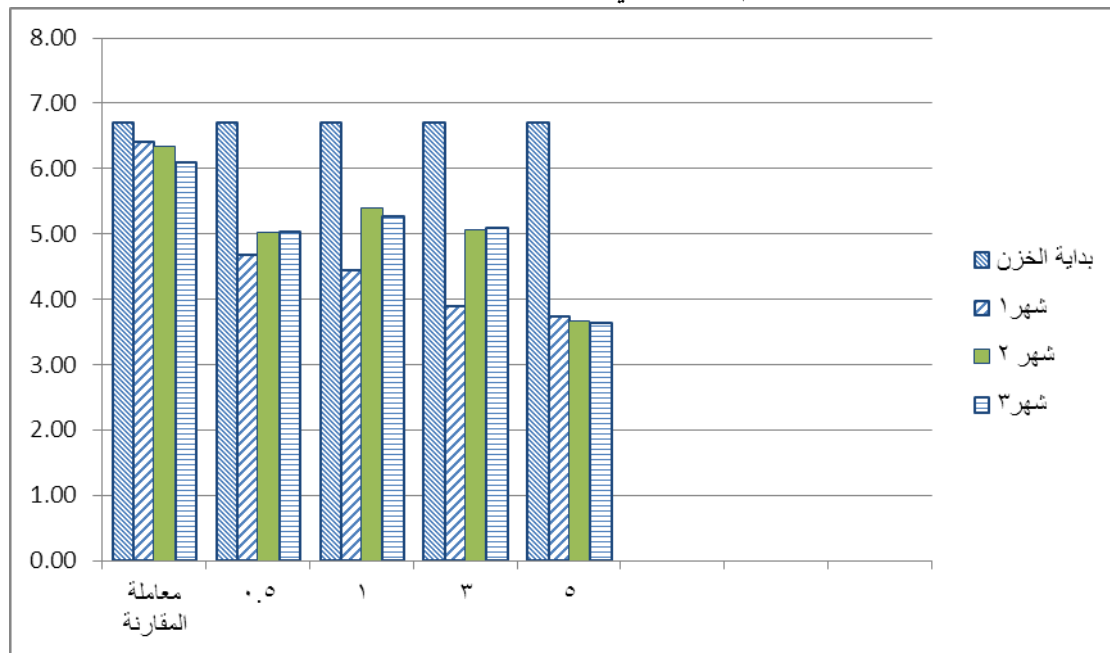
خلال خزن الذرة الصفراء لمدة ثلاثة أشهر وبوجود تراكيز مختلفة من حامض الخليك (الشكل 2) لم يلاحظ وجود فروق معنوية (P ≤ 0.05) بين المعاملات وكذلك مع معاملة المقارنة رغم ان هناك فروقا حسابية بسيطة بين المعاملات مما يعطي دلالة على ان درجات الحرارة خلال أشهر الخزن اعتبارا من 20 شباط ولغاية 20 أيار / 2014 لم تؤد الى تغيير معنوي في النسب المئوية للرطوبة في كافة عينات الذرة الصفراء المخزنة.



الشكل رقم 2 :- النسب المئوية لرطوبة الذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك

الرقم الهيدروجيني للذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك :

من (الشكل 3) يتضح ان هناك فروقا معنوية ($P \leq 0.05$) في الرقم الهيدروجيني للذرة الصفراء بعد اضافة تراكيز عدة من حامض الخليك خلال أشهر الخزن ، أذ حصل انخفاض في هذا الرقم نسبة الى معاملة المقارنة وبداية الخزن (6.7 وهو الرقم الهيدروجيني للذرة الصفراء المستعملة في الدراسة) وهذا الرقم أنخفض بزيادة تركيز حامض الخليك المضاف ليصل الى أدنى مستوياته وذلك عند اضافة الحامض بتركيز 5% وخلال أشهر الخزن الثلاث أذ بلغ حده الأدنى 3.64 بعد ثلاث أشهر من الخزن وهذا يعد طبيعياً أذ ان اضافة الحامض كان مؤثراً في خفض الرقم الهيدروجيني للذرة الصفراء خاصة عند اضافته بتركيز 3 و 5% مما لاشك فيه فان هذا الانخفاض المعنوي في الرقم الهيدروجيني يعد مؤثراً في نمو الفطر *A.flavus* ويؤثر في قدرته على افراز السموم وكما أشار Pelas (2012) وأخرون الذين أوضحوا ان حامض الخليك ثبط نمو وفعالية عدة سلالات للفطر *A.flavus* وان خفض الرقم الهيدروجيني بتأثير الحامض .

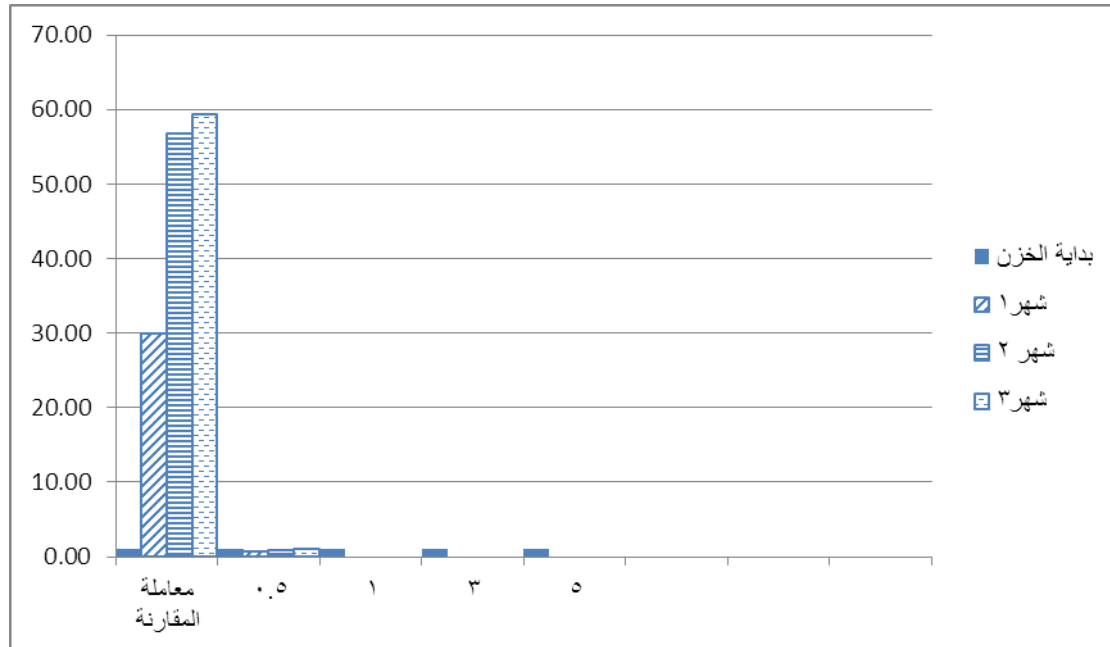


الشكل رقم 3: الرقم الهيدروجيني للذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك

العدد الكلي للفطر *A.flavus* في الذرة الصفراء المعاملة بحامض الخليك :

حصل تباين في اعداد الفطر *A.flavus* المتواجدة في الذرة الصفراء المخزنة والمضافة اليها حامض الخليك وكما هو موضح من (الشكل 4) والتباين المعنوي ($P \leq 0.05$) حصل بين المعاملات التي اضيف اليها حامض الخليك وعينات معاملة المقارنة وهذه الاخيرة كان الفرق المعنوي فيها واضحا بين مدد الخزن ، إذ أن اعداد الفطر تدرجت بالزيادة من بداية التجربة (10×10^4 و.ت.م / غم) لتصل حدها الاعلى بعد (3 أشهر) من الخزن اذ بلغ العدد 59.4×10^4 و.ت.م / غم وهذه الزيادة في اعداد الفطر بسبب وجود محتوى رطوبي ملائم للنمو تراوح ما بين 17.75 - 18.13 % (الشكل 2) ورقم هيدروجيني مناسب وصل الى ما بين 6.09 - 6.40 (الشكل 3) اضافة الى خلو المعاملات من حامض الخليك ودرجات حرارة ملائمة ، لم يلاحظ اي تفاوت معنوي في العدد الكلي للفطر *A.flavus* بين التراكيز المستخدمة في الدراسة وكذلك في مدة خزن المعاملات التي اضيف فيها حامض الخليك وان نتائج الجدول أظهرت ان اضافة الحامض بتركيز 1 و 3 و 5% ادى الى تثبيط نمو الفطر بصورة تامة ولكافة اشهر الخزن . مما يعطي دلالة على ان لحامض الخليك تأثيراً واضح في منع نمو هذا الفطر باستخدام التراكيز والمدد المستخدمة في الدراسة ومن الممكن ان يعزى ذلك وكما اشار Sholberg

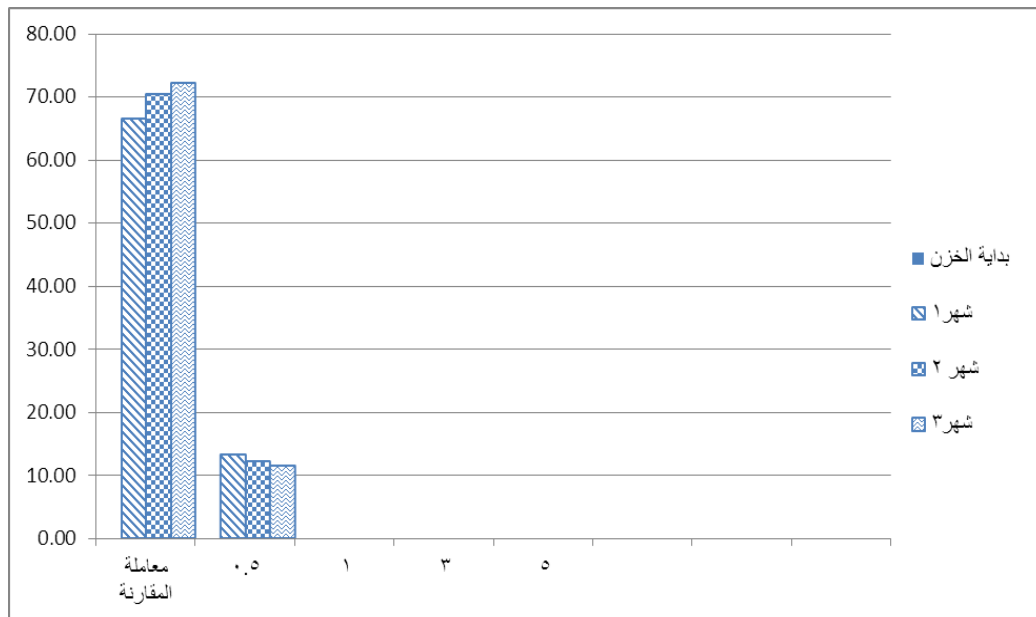
وأخرون (1998) الى ان لحامض الخليك بالإضافة الى تأثيره في الرقم الهيدروجيني فان له سمية تجاه الخلايا الميكروبية ويؤثر في الاغشية الخلوية للأحياء المجهرية وبالتالي يعيق عملية نقل مواد الايض عبر هذه الاغشية .
هذه النتائج تتفق مع ما ذكره Morsy وآخرون (2000) الذين وجدوا ان حامض الخليك له تأثير قاتل ومثبط لنمو معظم أنواع الفطريات الشائعة والملوثة للمحاصيل الزراعية وخاصة الحبوب كما انه يمنع انبات سبورات هذه الفطريات .



الشكل رقم 4 : العدد الكلي *A. flavus* للذرة الصفراء المعاملة بحامض الخليك (10×10^4 و.ت.م /غم)

تركيز حامض الكوجك في الذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك :

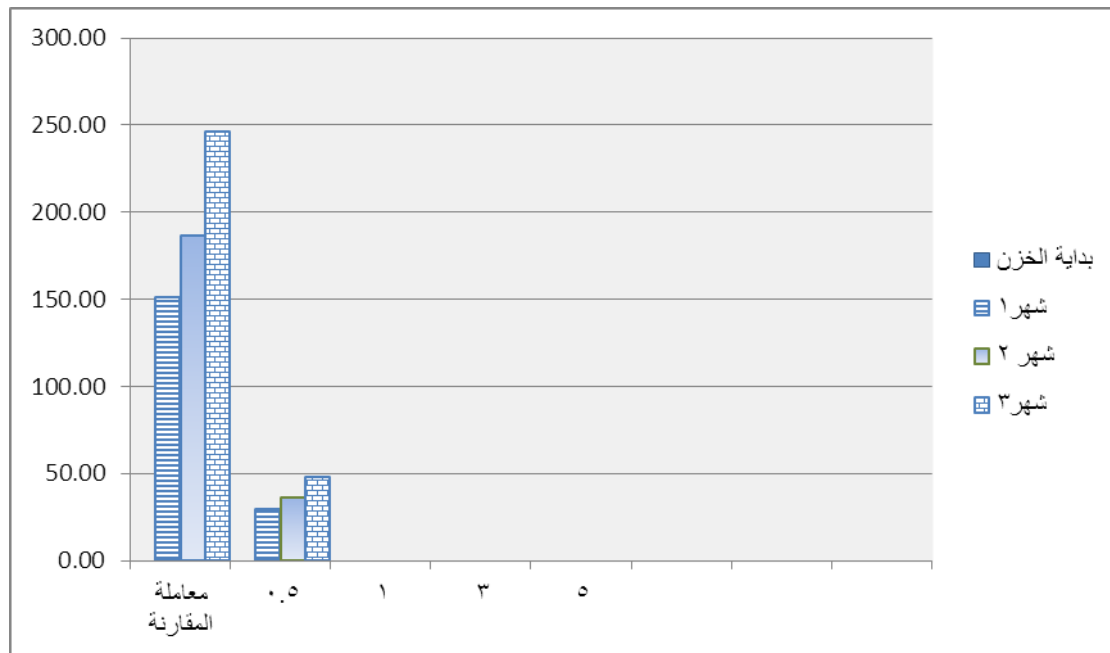
خلال خزن الذرة الصفراء وكما يوضح (الشكل 5) حصل تفاوت معنوي ($P \leq 0.05$) في تركيز حامض الكوجك المنتج بواسطة الفطر *A. flavus* خاصة بين المعاملات التي اضيف فيها حامض الخليك ومعاملة المقارنة ، اذ ان الفطر انتج حامض الكوجك بتركيز 66.5 غم /كغم بعد شهر من خزن الذرة في معاملة المقارنة وازداد تركيز المنتج منه بعدئذ ليصل حده الاعلى بعد 3 أشهر من الخزن اذ وصل الى 72.3 غم / كغم ولعل نمو الفطر في هذه المعاملة وزيادة اعداده (الشكل 3) مع توفر محتوى رطوبي ورقم هيدروجيني ودرجة حرارة ملائم (الاشكال 2 و 3 و 4 ، على التوالي) حفز الفطر *A. flavus* الى زيادة افراز حامض الكوجك مع تقدم مدة الخزن . حصل انخفاض معنوي عند معاملة الذرة الصفراء بحامض الخليك بتركيز 0.5 % ولم يلاحظ في هذا التركيز فرق معنوي مع اطالة مدة الخزن . ثبت انتاج الحامض تماما (100 %) عند اضافة حامض الخليك بتركيز 1 و 3 و 5 % وهذا يعود الى تأثير المثبط لحامض الخليك في ايقاف نمو وفعالية الفطر *A. flavus* ولأسباب التي جرى ذكرها عند مناقشة العدد الكلي للفطر أعلاه ، ان التثبيط العالي لحامض الخليك لنمو الفطر *A. flavus* وإفراز متايضاتها أكدها Pundir و Jain (2010) الذين وجدوا ان حامض الخليك يعد من أكثر المواد الحافظة والمضادة لمجموعة من الفطريات خاصة *A. flavus* و *Mucor sp.* وغيرها.



الشكل رقم 5 : تركيز حامض الكوجك للذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك (غم/كغم)

تركيز سم الافلا B₁ في الذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك :

تعد سموم الافلا احدى متايبضات الفطر *A.flavus* عند نموه في الاغذية المخزنة ، (الشكل 6) يبين ان معاملة الذرة الصفراء بحامض الخليك بتركيزات 1 و 3 و 5 % لم يحدث تغيير معنوي ($P \leq 0.05$) في تراكيز سم الافلا B₁ بسبب التثبيط التام (100%) لإفراز هذا السم بتأثير التراكيز اعلاه من حامض الخليك وهذه اختلفت معنويا عن المعاملة التي اضيفت فيها الحامض بتركيز 0.5% اذ انتج الفطر سم الافلا B₁ بتركيزات تراوحت بين 29.5-47.5 مايكرو غرام / كغم كما اختلفت معاملات اضافة حامض الخليك مع معاملة المقارنة التي حصلت فيها نمو للفطر *A.flavus* وافراز سم الافلا B₁ بحدوده العليا اذ تراوح تركيزه ما بين 151 - 246 مايكرو غرام / كغم وقد يعود سبب ذلك الى عدم وجود الحامض المثبط لنمو الفطر وملائمة درجات الحرارة والمحتوى الرطوبي والرقم الهيدروجيني لنمو الفطر وافراز سموم الافلا (الاشكال 2 و 3 و 4 على التوالي) . فيما يتعلق بإطالة مدة التخزين فانه عند اضافة الحامض بتركيز 0.5% لم يحدث فرق معنوي بين الاشهر الثلاث وهذا يخالف معاملة المقارنة التي تفاوتت فيها تركيز السم بأطاله مدة خزن الذرة الصفراء ومن الممكن ان يعزى هذا الى التأثير الفاعل لحامض الخليك في احداث تثبيط تام لنمو الفطر وافراز سم الافلا B₁ خاصة عند اضافة الحامض بتركيز تزيد عن 1% او خفض النمو وافراز هذا السم عند اضافته بتركيز 0.5% . ان لهذا الحامض تأثير مثبط لنمو الفطر *A.flavus* وافراز سموم الافلا وكما وجد Shekhar وآخرون (2009) الذين لاحظوا ان لحامض الخليك تأثير مثبط لإفراز سموم الافلا وان نسب التثبيط زاد عن 68% وذلك بحسب التراكيز المضافة من الحامض .



الشكل رقم 6 : تركيز الافلا B₁ للذرة الصفراء المخزنة المعاملة بحامض الخليك (مايكروغرام/غم)

المصادر:

- الطحلي ، عبد الواحد (2004) . دراسة الافلاتوكسينات والفطريات المفترزة لها في حبوب الذرة الصفراء في سورية ، كلية العلوم ، جامعة دمشق – سورية.
- A.O.A.C. (1980). Official methods of analysis. 13th ed. Association of analytical chemists, Washington, D.C.USA
- Ana Paula, D.R.; A.S.Carvalho; A.S.Santos; C.A.Alves; J.L.M.Nascimento and E.O.Silval (2011). Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus sp.* Acts as an inducer of macrophage activation. Cell Biol. Int. 35: 335-343.
- Bennet, J.W. and Klich, M. (2003). Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 16: 479-516.
- Bently, R.(1957). Preparation and analysis of kojic acid. Methods Enzymol. 3: 238-241.
- Blumenthal, C.Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparation derived from the three fungi. Regulat. Toxicol and Pharmacol., 39: 214-228.
- Chang, T. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. Int. J. Mole. Scien. 10(6) :2440-2475.
- Harrigan, F.; M.C.Cance and E.Margaret (1976). Laboratory Methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. U. K.
- Higgins and Brinkhaus , (1999). Efficacy of several organic acid against molds. J. Applied Poultry. Res. 8, 480-487.
- Jones, B.D. (1972). Methods of aflatoxin analysis, Tropical products institute, Report G 70 London P. 58,
- Klick ,M.A. and J.I. Pitt (1988). The theory and practice of distinguishing species of the *Aspergillus flavus* group. Plenum Press, New York. : 211-220.
- Lugaukas , A.; A. Railiene and V . Raudoniene (2006) . Toxic micromycetes in raw material during its processing , Ann. Agric. Environ . Med . 13 : 147 – 161.
- Lanyasunya, T. P.; L. W. Wamae; H. H. Musa; O. Olowofeso and I. K. Lokwaleput (2005). The risk of mycotoxins contamination of dairy feed and milk on small holder dairy farms in kenya, Pakistan J. of Nutrition. 4 (3) :162-169.

- Mc Williams, M.(2005). Experimental Food Laboratory Manual for Foods: experimental perspective. prentic. Hall. USA .
- Mirocha, C. J.; S. V. Pathre and C. M. Christensen (1980). Mycotoxins, Advance in Cereal Science and Technology. 3:159-225.
- Morsy, A.A.; F.Abd-EL-Kareem and M.A.Abd-Alla (2000). Effect of acetic acid fumigation on common storage fungi of some grains. Egypt. J. Phytopathol., 28: 95-106.
- Moto, M.; Mori, T.; Okamura, M.; Kashida, Y. and K. Mitsumori (2006). Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. Arch. Toxicol. J. 80 : 299-304.
- Moubashar, H.; S. I. Abdal-Hafez ; F.T. EL-Hissy and S. K. Hassan (1980). Effect of temperature and moisture content on Egyptian peanut seed – borne fungi. Mycopath., 70 : 49-54.
- Nabney. J. and B. F. Nesbitt (1965). A spectrophotometric method for determining the aflatoxin. Analyst, 90: 155-160.
- Pelaez, A.M.L.; C.A.S.Catano; E.A.Yepes; R.R.Villarroel; G.L.Antoni and L.Giannuzzi (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. Food Control, 24(1-2): 177-183.
- Petchkongkaew, A. (2008). Reduction of mycotoxin contamination level during soybean fermentation. ph. D. thesis Food Techno. Univ. , pp 212. Thailand.
- Pitt, J. I. and A. D. Hocking (1985). Fungi and Food spoilage springer.
- Pundir, R.K. and P. Jain (2010). Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives. Intern. J. Pharmac. Sci. Rev. and Res., 5 (2): 25-27.
- Samarajeewa, V. (1984). Aflatoxin contamination in peanuts. J. of Nation. Agric. Sci. of Ceylon 21: 21-30.
- SAS Version Statistical Analysis System (2007). SAS Institute Inc. Cary NC.
- Shanum, S.A.; T. Yagoob ; S. Sadal ; M. Hussain ; M. Jabber ; H. N. of various feed stuffs for live stock production using in vitro gas method . Pakistan Vet. J. , 27 (3) : 129-133 .
- Shekhar, M.; S. Singh; A. A. A. Khan and S. Kumar (2009). Efficacy of inorganic salts and organic acid against colony growth of *Aspergillus flavus* and their use to control aflatoxin level in post harvest maize. Intern. J. Food Safety , 11 : 4-10.
- Sholberg, P. L.; P. J. Delaguis and A. L. Moyls (1998). Use of acetic acid fumigation to reduce the potential for decay in harvest crops. Recent. Res. Devel. in plant Pathol. , 2 : 31 – 41.
- Suleiman, M.N. and A.Taiga (2009). Efficacy of aqueous extracts of neem and sharf for the control of fungi associated with mild and unmilled stored rice grains. In 5th proceeding of the Humboldt kellogg Annual. Agric. Conference, pp: 71-73.