وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
كلية العلوم – جامعة القادسية
قسم علوم الحياة

الخصائص الجزيئية لعزلات الفطر *A.niger* المنتجة للسموم والملوثة للحبوب العلفية وإمكانية السيطرة عليها مختبريا.

رسالة تقدمت بها

ندى أحمد فيروز الخفاجي

بكالوريوس علوم حياة /كلية التربية/جامعة القادسية

2001

الى مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الاحياء المجهرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور عبد الامير سميرسعدون

١٤٣٨ ه ٢٠١٧ م

الخلاصة

تضـــمنت الدراســـة محـــورين الأول عـــزل وتشـــخيص الفطريـــات المرافقـــة لحبـــوب الأعـــلاف (الحنطـــة والـــذرة الصـــفراء)،وأختيارعزلات الفطـــر *A.niger* وأختبـــار قـــدرتها علـــى إنتـــاج ســـم الأواكراتوكسين A وتقييم كفاءة المعاملات الحيوية والكيمياوية في حماية الأعلاف من الأصابة بهذا الفطر ،والمحور الثاني التعرف على التأثيرات السمية في بعض الخواص الفسلجية والكيموحيوية والتشريحية لذكور الجرذ الأبيض.

أظهرت النتائج عزل عدة أنواع من الفطريات المرافقة لحبوب الأعلاف، حيث شخصت الأنواع التالية : *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus ochraceus*، *Aspergillus terreus*, *Penicillium* spp ، *Fusarium oxysporum*، *Alternaria alternata*، ، *Rizopus stolonifer*، *Curvilaria lunata*.تم تشخيص الفطر *A.niger* مظهريا بأستعمال المفاتيح التصنيفية ووراثيا بتقنية تفاعل السلسلة المتبلمر(PCR) وعند أختبارقدرة عزلات الفطر المختبر على أنتاج الأوكراتوكسين A بأستعمال تقنية كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) تبين أن سبع عزلات منتجة لهذا السم من مجموع ٢٠ عزلة كان أكثر العزلات انتاجا هي عزلة *A.niger*16 ،كما أكدت تقنية تفاعل السلسلة المتبلمر (PCR) أن العزلات المختارة(AN3، AN6، AN٧، AN9، AN10 AN16، ، AN19) *A.niger* أحتوى حامضها النووي DNA على الجين (*PKS* gene) المسؤول عن أنتاج سم الأوكراتوكسين A .

أثبتت النتائج المختبرية فعالية المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط معدلات النمو الشعاعي للفطر المختبرعلى الوسط الزرعي PDA وبنسبة تثبيط١٠٠% عند التركيزين (٢ و٣) غم /لتر بينما بلغت أعلى نسب تثبيط للفطر في معاملة كاربونات الكالسيوم عند التركيز (٣٠)ملغم /ملليتر ٥٥,٥% في حين بلغ قطر الفطر في معاملة السيطرة ٩٠ ملم .

اما بالنسبة للتجربة الخزنية فقد أوضحت النتائج أن المعاملات المستعملة جميعها كانت كفوءة في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A.niger* بعد مرور ٣٠ يوم من الخزن، إذ بلغت نسب الأصابة صفربالنسبة لمعاملة الأعلاف (حنطة ، ذرة صفراء ملوثة بالفطر *A.niger*) والمعفرة بالفلوراميل ٤ غم / كغم ومعاملة التداخل للفلوراميل ٢ غم / كغم وكاربونات الكالسيوم١٥ غم / كغم ، بالمقارنة مع معاملة السيطرة البالغة

٥٣,٣٣ % ، ٦٠%، اما معاملة الأعلاف (حنطة ،ذرة صفراءملوثة بالفطر *A.niger*) والمعفرة بكاربونات الكالسيوم ٣٠ غم / كغم بذور فقد بلغت نسب الأصابة ٢٦,٦٦%، ٣٣,٣٣% في الوقت الذي

وصلت فية نسب الأصابة إلى١٠٠% في معاملة المقارنة . كما تشير النتائج إلى أن معاملة (بذور لم تلوث صناعيا بلقاح الفطر *A.niger*) والمعاملة بكاربونات الكالسيوم ٣٠ غم / كغم بذورفقد بلغت نسب الأصابة ١٣,٣٣ % ، ٢٠ % ، ومن جانب آخر بينت نتائج حساب أعداد بكتريا *P.fluorescens* على سطوح البذور وبحيوية عالية بعد مرور مدة خزن ٣٠ يوم إذ وصلت أعداد البكتريا في معاملة الحبوب المعفرة بالفلوراميل ٤ غم /كغم ومعاملة التداخل للحبوب المعفرة بالفلوراميل ٢ غم / كغم وكاربونات الكالسيوم بتركيز١٥غم /كغم والملوثة بالفطر *A.niger* ١،٧١٦ × ١٠^١٠ و١،٣٤٦ × ١٠^١٠وحدة تكوين مستعمرة/غم حبوب على التوالي .

أظهرت النتائج أن سم الأوكراتوكسين A أثر سلبا في بعض معايير الدم الفسيولوجية لذكورالجرذ الأبيض والتي تمثلت بأنخفاض معدل مستوى الهيموغلوبين (Hb) فقد إنخفض إلى ٩,١غم /١٠٠ مل كما تسبب السم في خفض معدل مستويات حجم الكريات المضغوطة (PCV)إلى ٢٧,٣٣٦ وكذلك أرتفع المعدل العام لكريات الدم البيض للحيوانات المعاملة بسم الأوكراتوكسين A إلى ١٣,٢٦ خلية/ملم^{3}.

أثر سم الأوكراتوكسين A سلبا في بعض معايير الدم الكيموحيوية حيث تسبب في رفع مستويات إنزيمي الكبد(GOT) و(GPT) لذكور الجرذ الأبيض إذ بلغت١٣و١٤ وحدة دولية /لتر .كما تسبب سم الأوكراتوكسين A أيضا ارتفاع كلّ من البروتين الكلي (Total Protein (TP واليوريا في بلازما الدم إلى٨ غم /١٠٠ مل و٣٤,٨ ملغم / ١٠٠ مل على التوالي .

أظهرت نتائج الدراسة النسجية لذكورالجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A حيث بينت المقاطع النسجية المأخوذة من الكبد وجود تأثيرات مرضية أبرزها أحتقان شديد في نسيج الكبد مع فقدان الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية مع توسع في الجيبانيات الكبدية وتكاثر في خلايا كوبفر ،أما الكلية فقد تأثرت بسم الأوكراتوكسين A وتمثل هذا التأثير بضمور في الكبيبات وتوسع في النبيبات الملتوية الكلوية مع تنكس (Degeneration) وانسلاخ في الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية الكلوية ،اما الأمعاء الدقيقة فظهرفيها تحطم للزغابات مع توسف (Desequemation) وإرتشاح للخلايا الألتهابية وخاصة البلعم الكبير (Macrophage).

أوضحت نتائج الدراسة النسجية أن المستحضرالحيوي لبكتريا *Psedomonas fluorescens* دور في حماية أعضاء ذكورالجرذالأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسينA مع الفلوراميل من الأثار السمية للأوكراتوكسين A مع وجود تغيرات نسيجية طفيفة في أعضاء الجرذان المعاملة بها. أما بالنسبة إلى تأثير

ب

الفلوراميل فقط في الأنسجة فقد أشارت نتائج الفحص والتشخيص المختبري للمقاطع النسيجية للأعضاء المذكورة إلى عدم حدوث تغير نسيجي مرضي في معاملة الفلوراميل فقط وهي تماثل المقاطع النسيجية لمعاملة المقارنة .

المقدمة

يعد تلوث الأغذية والأعلاف بالفطريات من المشاكل التي تهدد العديد من الدول النامية لاسيما تلك التي تفتقر لظروف الخزن الغذائي الجيد وتعد مصدر قلق كبيرا جدا مما دعى تلك الدول إلى توفير مصادر غذائية صحية لتحقيق أمنها الغذائي (Makun *et al* .;2010) ، وأن تعرض علائق الحيوانات ولاسيماعلائق الدواجن للإصابة بالعديد من الاعفان والتي بدورها تتسبب في تلوثها بمركبات تنتجها تلك الأعفان يطلق عليها بالسموم الفطرية (Mycotoxins) والتي تعد أحد أكثرالمشاكل الجدية التي تواجه إنتاج الدواجن في العالم، إذ يصعب منع إصابة الحبوب الداخلة في تركيب أعلاف الدواجن بمختلف الفطريات سواء تلك التي تنمو في الحقل أو أثناء الحصاد أو عند خزنها في المخازن ، والتي قد ينتج بعضها سموما فطرية إذا ما توفرت العوامل المهيأة لإنتاجها من رطوبة وحرارة ملائمتين (Huwing *et al*., 2001).

رغم أن العدد المعروف للفطريات الممرضة لا يمثل إلا النزر اليسير في عدد الفطريات الكلي البالغ حوالي 1,6 مليون نوع، هذا بالإضافة إلى أن عدداً قليلاً جداً من هذه الفطريات الممرضة تبلغ شراستهُ الحد الذي يمكنها من عدوى إنسان سليم تماماً، ومن هنا كانت غالبية الفطريات لا ضرر لها إلا إذا هاجمت مريضاً ذا جهاز مناعي مضطرب (Martello, 2006)،وتهاجم الفطريات أو منتجاتها الأيضية الحيوية صحة الإنسان بعدة طرائق منها زيادة حساسية جهاز المناعة في العائل تجاه الجراثيم الفطرية كما هو الحاصل مع الجراثيم الفطرية المحمولة في الهواء التي تم التعرف عليها كسبب من أسباب حدوث الأزمة الصدرية الناتجة عن عوامل خارجية وهي من نوع فطري (Jawetz *et al*., 2004) فضلاً عن وجود العديد من العوامل المساعدة على غزو الفطريات للإنسان منها قدرتها على النمو في درجة حرارة الجسم، وكذلك إفراز الإنزيمات الخارج خلوية، ومنها المحللة للبروتينات والكيراتين وأنسجة البشرة (Ribes *et al*., 2000).

المشكلة الحقيقية هي إن هناك فطريات تسبب حالات مرضية لم يكن سببها الفطر نفسه وإنما النواتج الأيضية لذلك الفطر وخاصة النواتج الأيضية الثانوية التي تعرف بالسموم الفطرية (Mycotoxins) في جسم الكائن الحي هي المسؤولة عن الأعراض المرضية التي تظهر على المريض (Gallagher, 2003) وهذه الإصابات تكون أشد خطورة من الحالات السابقة إذ من الصعوبة الكشف عن المنتجات الأيضية التي أدت إلى حدوث الحالة المرضية وأن تم الكشف عنها فأنهُ من الصعب إيجاد الطرق الكفيلة للحد منها (Prescott *et al*., 2001).

تعدُّ السموم الفطرية من أقوى السموم المعروفة ويرجع السبب في قوة هذه السموم إلى أنها ذات أوزان جزيئية واطئة كما أنها تعد(غير أنتجينية) أي أنها لا تملك المقدرة على تحفيز الجهاز المناعي للإنسان أو الحيوان لإنتاج الأجسام المضادة ضد هذه السموم فضلاً عن مقاومتها لدرجات الحرارة العالية وبالتالي لا تتحطم بدرجة الحرارة المستعملة في طهي الطعام، فضلا عن أنها تنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر إلى الأغذية لذلك فأن إزالة الجزء المصاب بالفطرمن الأغذية كما يفعل الكثير من الناس لا يؤدي إلى التخلص الكامل من السموم الفطرية المتكونة في هذه الأغذية ولذا يجب تجنب نمو الفطر على تلك الأغذية(وهبه والنسر، ٢٠١٠).

من أكثر الفطريات المنتجة للسموم في محاصيل الحبوب الفطر *Aspergillus* و*Fusarium* و *Penicillium* حيث تنتج مركبات أيض ثانوي ذات خطورة عالية في صحة الإنسان والحيوان، وأكثر تلك السموم خطورة هي الأفلاتوكسينات والتي تسببت في هلاك العديد من فروج الديك الرومي في انكلترا عام (١٩٦٠) نتيجة استهلاك عليقه ملوثة بالفطر *A.flavus* المنتج لسم الأفلاتوكسين وعرف المرض وقتها بـ Turky X – disease (Sargeant *et. al*.,1961).

استعملت عدة وسائل منها الوسائل الفيزياوية كالحرارة الجافة لغرض خفض المحتوى الرطوبي للحبوب الإقتصادية كالذرة والحنطة والشعيروغيرها كما استعملت بعض المواد الكيمياوية لإزالة الأفلاتوكسينات من الأغذية عند تلوثها واهم هذه المواد نترات الأمونيا(حسين,2000).كما استعملت الطرق البايلوجية والمتمثلة بتوظيف بعض الأحياء المتوطنة في التربة لحماية الحبوب والأغذية المصنعة من الإصابات الفطرية في المخازن وحظيت بعض أنواع جنس البكتريا *Psedomonas* ولا سيما بكتريا *P.fluorescens* بأهتمام كبير من قبل الباحثين لما تمتلكه من صفات الميكروب الصناعي الناجح ،حيث أستخدم هذا النوع في تصنيع المستحضر الحيوي الفلوراميل الذي حضر لأول مرة في العراق من قبل الباحث الجميلي في عام ٢٠٠٢ (مطوق ،٢٠٠٥) .

الهدف من الدراسة:

هدفت الدراسة إلى التحري عن وجود الفطريات السامة وأهم السموم المنتجة على الحبوب العلفية وأختبار قابليتها على أنتاج السموم الفطرية وأمكانية تقليل سمية أحدها وتقليل تواجده على حبوب الأعلاف من خلال الخطوات التالية:

١- عزل الفطريات المرافقة لبعض الحبوب (حنطة – ذرة صفراء) المستعملة كأعلاف للدواجن والطيور والحيوانات الاخرى.
٢- تشخيص أحد الفطريات السامة ودراسة قدرته على أنتاج السم.

٣- أستخدام تقنية PCR في تاكيد تشخيصة والتحري عن الجين المسؤول عن أنتاج السم .

٤- تاثير المعاملات الحيوية والكيمياوية في تثبيط النمو الشعاعي للفطر المختبر.ودراسة تاثيرها وتداخلها في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر المختبر أثناء فترة الخزن.

٥- دراسة تأثير السم في بعض الخواص الفسلجية والكيموحيوية والتشريحية لذكور الجرذ الأبيض المعاملة به وأمكانية الحد من تأثيراتها حيويا وكيمياويا.

استعراض المراجع

١,٢ :الفطريات المرافقة للحبوب العلفية:

تتعرض العديد من محاصيل الأعلاف للإصابات الفطرية والتلوث بسمومها وتتصف هذه السموم بتأثيراتها السامة للحيوانات مسببة لها الكثير من الامراض والعلل الحادة والمزمنة وهذا بدوره يؤدي إلى خفض المنتجات الحيوانية وزيادة كلفة الإنتاج وتعرض الدواجن للسموم الفطرية وبمستويات عالية أومنخفضة يشكل خطرا على تلك الحيوانات مؤديا إلى خفض إنتاجها من البيض والحليب واللحم وعليه أن خفض كلفة أنتاج الأعلاف يتطلب السيطرة الفعالة على التلوث بالسموم الفطرية من خلال خفض مستويات تلك السموم في الأعلاف بما يؤمن سلامة الحيوانات من أضرارها ويفضل منع تلوثها بالسموم الفطرية بصورة تامة (الجميلي، ٢٠١٤) .تعد حبوب الذرة الصفراء والحنطة والشعير وفول الصويا المكونات الرئيسية لأعلاف الدواجن وغالبا ما تهاجم تلك الحبوب بالعديد من الفطريات لاسيما أثناء فترة التخزين (ابراهيم والجبوري ،1998).

قسمت الفطريات التي تصيب الحبوب من قبل Christensen(1965) إلى ثلاثة مجاميع تتضمن المجموعة الأولى فطريات الحقل (Field Fungi) والتي تصيب المحاصيل الزراعية قبل الحصاد وتشمل أنواعا تابعة للأجناس *Alternaria* و*Fusarium* و*Helminthosporium* و*Cladosporium* ، أما المجموعة الثانية تعرف بفطريات الخزن (Storage Fungi)،وتضم الفطريات التي تهاجم المحاصيل الزراعية أثناء خزنها وتشمل أنواعا من الجنس *Aspergillus* و *Penicillium* ،وتمتاز هذه الفطريات بأن أكثرها منتجة للسموم والتي تسبب أمراضا للإنسان والحيوان عند إستهلاك المحاصيل الملوثة بها ،أما ا لمجموعة الثالثة فتضم فطريات التعفن (RootFungi) التي تنمو على بقايا المواد النباتية وتشمل *Chaetomium* spp و *Papulospora* spp و *Fusarium graminearum* و *Sordaria* spp ووجدت ان معظم الفطريات المنتجة للسموم تابعة لفطريات الخزن والقليل منها يعود لفطريات التعفن التي لها القدرة على إنتاج السموم .

أوضحت بعض الدراسات في العراق تعرض مكونات الأعلاف الأساسية للإصابة بالفطريات وتلوثها بالسموم الفطرية، إذ بينت دراسة مسحية إن 28 فطرا من فطريات المخازن معظمها أنواع تابعة للجنسين *Aspergillus* و *Penicillium* مصاحبة للحبوب المخزونة عزلت من عينات تمثل 24 نوعا وصنفا من حبوب الحنطة والشعير والرز والذرة الصفراء المخزونة في شمال العراق ووسطه وجنوبه (Sulaiman ,1977) ،وسجل وجود الفطر *A.flavus* نسبة 41.3% من بين 750عزلة فطرية في 9 أنواع من العلائق،وان هذه العلائق كانت ملوثة بسم أفلاتوكسين B1 بتراكيز تراوحت بين 0.2 إلى 160 مايكروغرام /كغم وكان التركيز الأعلى لهذا السم في عليقة الدواجن (العزاوي ،1977). وقد بينت

العديـــد مـــن الدراســـات أن أكثـــر الفطريـــات تواجـــدا فـــي العلائـــق ومكوناتهـــا هـــو الفطـــر *A.flavus* (حسين ،٢٠٠٠).

١,٢.1- الجنس *Aspergillus*

إن أول مـــن أكتشـــف جـــنس *Aspergillus* الراهـــب الإيطـــالي وعـــالم الأحيـــاء Micheli عام ١٩٢٧.(Samoson and Vagra,2008).

يعد الفطر *Aspergillus* من الفطريات الواسعة الأنتشاروالذي يضم أنواعا عديدة تسبب أمراضا للإنسان والحيوان وفساد الأغذية وإنتاج السموم كنواتج ايضية ثانوية ومن ناحية أخرى فأنه قد يكون ذو فائدة من خلال تخميرالأغذية كما له العديد من التطبيقات الحياتية. يبلغ عدد الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* اكثر من (٢٥٠) نوعا وتضاف بين الحين والأخرأنواعا جديدة تسجل في مناطق مختلفة من العالم وهي أكثر ا نتشارا في المناطق الحارة من الباردة (Geiser *et al*., 2008) . يتواجد جنس *Aspergillus* في التربة وعلى المواد العضوية المتفسخة وعلى منتجات النباتات مثل الثماروالبذور وعلى فضلات الحيوانات(العاني ،١٩٩٨) ولأنواعه القدرة على النمو والتنافس على الغذاء مع بقية الفطريات ومنها الفطريات المسببة لأمراض النبات الأمر الذي أتاح الفرصة لأستعمال الفطر في المقاومة الأحيائية (Mukherjee & Sen M,1992).الغزل الفطري جيد التكوين ويتألف من خيوط متفرعة ومقسمة ومتعددة النوى ،وتكون بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus*أجســـــــاما حجريـــــــة (Seclerotia) صغيرة الحجم تتألف من خلايا متراصة ومثخنة الجدران وعلى هيئة برنكيما كاذبة (Psedo Parenchyma)حيث تنشأ هذه الأجسام عند توفر ظروف غيرملائمة لنمو الفطر *A.niger* (أبو هيلة ،١٩٨٧).ويتكون مايسيليوم جنس *Aspergillus* من خيوط فطرية (هايفات) تكون خلايا قدمية (Foot Cells) مثخنـــة الجـــدران تمتـــد إلـــى أعلـــى بشـــكل أنابيـــب تكـــون حوامـــل كونيديـــة (Conidiophores)عديـــدة النـــوى غيـــر مقســـمة تنـــتفخ عنـــد قمتهـــا مكونـــة رؤوس كرويـــة (Globose أوHemi-sphericl) تعـــرف بالحويصـــلة (Vesical) تنتقـــل اليهـــا نـــوى وعضـــيات وسايتوبلازم بعدها يتكون عليها صف أو صفين من الذنيبات يوصف في هذه الحالة الفطر بأنه أحادي الصف(Uniseriate) كما في الفطر *A.flavus* أما إذا تكون صفين من الذنيبات فيوصف الجنس في هذه الحالة بأنه ثنائي الصف (Biseriate) كما في الفطر *A.niger* أما الكونيديا فأما أن تكون كونيديا أحادية النواة كما في الفطر *A.nidulans* أو كونيديا ثنائية النواة كما في الفطر *A niger* أو متعددة الأنوية كما في *A.repens* (Webester,1980).

تتكاثر معظم هذه الفطريات لاجنسيا فقط ، إلا ان هناك بعض الانواع تتكاثر جنسيا اذ تسلك سلوك الفطريات الكيسية ، بتكوين سبورات كيسية(Ascospores) منتظمة داخل أكياس (Asci) وتكون

الأخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري كروي الشكل Cleistothecium (Pitt and Hocking ,1997).
ان مستعمرات الفطر *Aspergillus* ذات ألوان مختلفة تختلف بحسب لون الكونيديا منها الأبيض والأصفر والبني والرصاصي والأخضر والوردي والأزرق والتبني والأسمر المائل إلى الصفُرة أو الأسود (Kown-Chung and Bennett,1992).

٢.1.2: الصفات التشخيصية والفسلجية للنوع *A. niger*

تنمو مستعمرات الفطر على وسط أكار أكار و أكار مستخلص البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)،إذ تبدو هذه المستعمرات ناعمة أو صوفية قليلا ذات لون أسود ناشئ من إنتاج أعداد هائلة من الكونيدات السوداء ويصل قطر المستعمرة من ٥-٦ سم بعد مرور إسبوعين من النمو (Pitt and Hoking,1985).تكون بعض العزلات أجساما حجرية كروية الشكل أو شبه كروية الشكل يصل قطرها إلى 0.8 - ١,٢ ملم ذات لون كريمي في بداية تكوينها ثم تتلون بلون أصفر أو برتقالي بعد مدة من الزمن (أبو هيلة ،١٩٨٧).

تتميز الرؤوس الكونيدية في هذا الفطر بكبر حجمها ولونها الأسود تبدو في بداية تكوينها كروية الشكل لكن بعد زيادة أعداد الكونيدات التي تكون سلاسل منفرجة عمودية على سطح الحوصلة ، يكتسب الرأس الكونيدي مظهرا شعاعيا . أما الحوامل الكونيدية فتكون ذات جدران سميكة ناعمة شفافة قد تتلون بلون بني قرب نهاياتها ، تتراوح أبعادها بين ٣٠٠- ١٥٠٠مايكرومترطولا و١٥- ٢٠ مايكرومترسمكا تنتهي بحوصلة كروية ذات قطر ٤٠-٨٠ مايكرومتر،يغطي سطحها بالكامل صف واحد من التراكيب القارورية الأولية في بادئ الأمر،وبتقدم عمر الحوصلة تنتج صفا ثانيا من التراكيب القارورية الثانوية التي تكون أصغر وأنحف من التراكيب القارورية الأولية وتتولد على قمتها كونيدات كروية سوداء إلى بنية اللون مشوكة يتراوح قطرها بين ٤-٥مايكرومتر (Raper and Fennel,1965;Kown chung and Bennet,1992). يعود النوع *Aspergillus niger* إلى مجموعة الفطريات الناقصة Deuteromycotina،ويصنف ضمن العائلة Moniliaceae التابعة إلى رتبة Moniliales (Raper and Fennel,1965).للفطر *A.niger* القدرة على النمو في المحاليل المركزة من السكريات والأملاح التي لا تستطيع أكثرالفطريات الأخرى من النمو عليها وكذلك قدرة أنواع الفطرعلى إفراز إنزيمات مختلفة ومضادات حيوية تنافس الأحياء المجهرية في منطقة النمو (العروسي، ٢٠٠١) .

أشار الورشان واخرون(٢٠٠٢) إلى أن اكثر الفطريات الملوثة للفواكه المجففة كالعنب والمشمش والتين هي فطريات تعود لأنواع الجنس *Aspergillus* تليها أنواع الجنس *Penicillium* ثم الجنس *Rhizopus*، وتكون بعض أنواع الجنس *Aspergillus* فطريات انتهازية مثل *A.Parasiticus* أو

A. flavus. أو *A.niger* إذ تسبب أمراضا للأشخاص ضعيفي المناعة تدعى داء الرشاشيات Aspergillosis ، وتشبه في أعراضها مرض التدرن الرئوي كذلك قد تسبب التهاب الأذن Otomycosis (Salvaggio,2006). كما ينتج الفطر *A.niger* العديد من السموم التي لها تأثير على صحة الأنسان والحيوان مثل سموم الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين وجليوتوكسين وستيريجماتوسيستين واموديين و سيترينين وحامض السايكلوبيزونك (عبد الحميد ،٢٠٠٠).كما ينتج مادة المالفورين وهي مادة ذات تأثير سمي عالي للجرذان حديثة الولادة مسببة توسعا مع نزف القناة الواصلة بين المعدة والامعاء مع تغيرات في الكبد والكلية ويؤدي ذلك إلى موت الجرذان المحقونة تحت الغشاء البريتوني بعد أربعة أيام من الحقن ،في حين لا تسبب تسمما حادا أذا أعطيت الجرعة عن طريق الفم (Ciegler واخرون ،١٩٨١). في دراسة أجراها الجميلي وحرجان(٢٠٠٦) وجد أن الفطر *A.niger* له تأثيرات سمية في مبايض الجرذ الأبيض تمثلت بأنخفاض وزن المبيض إلى١١,٥ملغم في حين كان وزنه في معاملة السيطرة ١٢,٣ ملغم ،كما تسبب الفطر *A.niger* في زيادة وزن الرحم لإناث الجرذ الأبيض حيث بلغ ٢٠٢ ملغم في حين بلغ في حيوانات السيطرة ١٥٣,٦ ملغم .

2.٢: السموم الفطرية Mycotoxins

تنتج أنواعاً عديدة من الفطريات مركبات سامة للإنسان والحيوان خلال عمليات الأيض الثانوي تسمى السموم الفطرية Mycotoxins ، وأن كلمة مايكوتوكسين Mycotoxin هي كلمة لاتينية تتكون من مقطعين: Mukos or Mykes وتعني الفطر أو عش الغراب والـ Toxicum وتعني سم، أستعملت كلمة Mycotoxin لأول مرة في عام 1962 بعد كارثة الديك الرومي المشهورة التي حدثت في بريطانيا (نخيلان ،2011). تعرف السموم الفطرية بأنها مركبات أيضية ثانوية سامة ذات أوزان جزيئية واطئة نسبياً تنتجها مجموعة من الفطريات الخيطية التي يمكن أن تلوث الغذاء البشري أو الأعلاف الحيوانية ابتداءا بالحقل وانتهاءا بالمستهلك وقد تم إلى يومنا هذا أكتشاف عدة مئات من أنواع السموم الفطرية لعل أهمها الأفلاتوكسينات Aflatoxins، الترايكوثسين Trichothecen، الأوكراتوكسين Ochratoxins، الزيرالينون Zearalenone، وجميعها سامة تؤثر في الفعاليات الحيوية لجسم الكائن الحي بشتى الصور وربما تؤدي في نهاية المطاف إلى هلاكهِ إذا ما تناولها بمستويات تفوق الحدود التي إتفق دولياً على السماح بوجودها في المواد الأولية سواء تلك المستعملة في غذاء الإنسان أو التي تدخل في صناعة الأعلاف الخاصة بالحيوانات الزراعية (Creppy, 2002).

سجلت مجموعة من الحوادث في اليابان سنة 1891 أثر تناول الرز الملوث بالفطريات وفي عام 1930 لوحظ ظهور الأعراض المرضية على مستهلكي الحبوب المتعفنة على شكل تنخر على الجلد (Necrosis) والنزف (Hemorrhage) وفشل الكلية والكبد وظهرت الأعراض المرضية نفسها على

الخيـــول التـــي تناولـــت العلـــف الملـــوث، وفـــي ســـنة ١٩٤٠ عـــرف مـــرض الـــرز الأصـــفر (Yellow Rice Toxicosis) كأحد الأمراض الناجمة عن التلوث بسموم تنتجها أنواع متعددة من الفطريات مثل *Aspergillus* و *Penicillium* (Scott, 1965 ؛ نخيلان، 2011).

كما سجلت حالات مرضية في الإنسان قبل عام 1900 أي في نهايات القرن التاسع عشر عرف فيما بعد بمـــرض الوكيا المعوي Alimentry Toxic Aleukia في الإتحاد السوفيتي السابق في مقاطعة أوربيرج وأنتشر خلال الفترة 1942-1948م أدى إلى إصابة ٦٠% من السكان ووفاة 10% من المصابين في المقاطعة نتيجة غذاء ملـــــوث بالفطر *Fusarium spp.* وتمثلت أعراضهُ بتقرحات جلدية ونزف دموي، وتحطم نخاع العظم، وخفض في الكريات البيض ، وتقرحـــات فـــي الجهـــازالهضمي(إبراهيم والجبوري، 1998 ; Bennett and Klich, 2003 ; EMAN, 2011).

3.٢: طبيعة السموم الفطرية

الســـموم الفطريـــة هـــي مركبـــات ســـامة وهـــي نـــواتج لعمليـــات الأيـــض الثـــانوي (Secondary metabolism) وتنتجها الفطريات الخيطية ،وبعضهـــا يستطيع أن يغزو ويستعمر الأنسجة النباتية قبل الحصـــاد وفي المخـــــزن (Cast, 2003) والسموم التي تنتجها الفطريات مركبات نشطة بايولوجياً وتشكل خطورة كبيرة بتراكيز واطئة جداً (Jouany *et al*., 2005).

للسموم الفطرية تأثيرات في الإنسان والحيوان والنباتات والكائنات الحية الدقيقة، وهي مركبات تشتق من مواد كيمياوية مثل الفينولات والأحماض الأمينية والببتيدات والتربينات وغيرها والتي يستعملها الفطرفي عمليات الأيض والفسلجة الاعتيادية ومعظمها مركبات هيدروكاربونية حلقية ونادراً ما تكون ذات سلاسل مفتوحة (اليفاتية) والوزن الجزيئي لها واطئ نسبياً ينحصر بين 100-697 دالتون كما وتعد السموم الفطرية من المركبات الكيمياوية التي لا تمتلك صفة الأنتجينية (Antigen) أي أن الحيوانات اللبونة لاتكون لها أجسام مضادة (Antibodies)، لذلك تُرتبط جزيئة السم من خلال المجاميع الفعالة التي تحملها مع جزيئة بروتين لإكسابها صفة الأنتجينية، وهي مختلفة كيميائياً ولها تأثيرات بايولوجية مختلفة (نخيلان ،2011) . كما تعد السموم الفطرية بصورة عامة مقاومة لدرجات الحرارة العالية وعليه لاتكون درجات الحرارة ذات فعالية كبيرة في تحطيمها ، فسموم الأفلاتوكسينات لايمكن تحطيمها إلاعند تعرضها لدرجة ٢٥٠° ولكن هذه الدرجة لايمكن الوصول اليها في أثناء المعاملات الحرارية لبسترة بعض أنواع الأغذية كالحليب مثلاً وكذلك درجة حرارة طهي معظم الأغذية لايمكن الوصول لمثل هذه الدرجة والحرارة العالية تؤدي إلى اتلافها ، ومع ذلك هناك بعض أنواع الأغذية كالبن الأخضر يمكن تعريضهُ لدرجة حرارة تصل إلى ٢٠٠° ولمدة ١٢ دقيقة مؤدياً إلى أختزال ٧٤% من الأفلاتوكسينات الملوثة

لحبوب البن بينما تصل نسبة الأختزال إلى ٩٤ % عند التعرض لنفس الدرجة ولمدة ١٥ دقيقة (الجميلي ،٢٠١٤) .

أختلفت الإحصائيات في تسجيل عدد المركبات الأيضية الثانوية المكتشفة لحد الآن، فقد ذكر Turner (1978) أن هنالك 1200مركباً ايضياً ثانوياً ينتج من قبل 500 نوع فطري، وأشار Hawcksworth (1991) أن هنالك 1.5 مليون نوع فطري له القابلية على إنتاج مركبات أيضية ثانوية وبواقع مركبين لكل فطر،كما أعتقد الباحثان Esser and Lemke (1996) أن هناك أكثر من مائة الف نوع من الفطريات تنتج ما يقارب 200 الف نوع من السموم الفطرية، من جانب آخر أوضح Cast (2003) أن عدد المركبات الأيضية المدروسة حالياً يتراوح بين 20-30 الفاً. وهذا يعني انه لا توجد إحصائية دقيقية لعدد المركبات الأيضية المنتجة من قبل الفطريات إذ درس بعض منها وبعضهاالآخر بقي من دون اهتمام ولا تعد كلّ المركبات الأيضية الثانوية مركبات سامة ومثالها المضادات الحياتية.

٤.2:الفطريات المنتجة للسموم الفطرية

تعود الأنواع الفطرية المنتجة للسموم إلى ستة أجناس رئيسة من الفطريات وهي الأكثر انتشاراً وامتازت بقدرتها على أنتاج السموم الفطرية بتراكيز عالية والعيش في بيئات متنوعة وبمتطلبات نمو بسيطة من درجة حرارة ورطوبة وهذه الأجناس هي *Aspergillus* spp. و *Penicillium*، *Fusarium* و*Claviceps* و*Stachybotrys* و *Neotyphodium* (Cast, 2003). في حين أن هناك أجناساً أخرى يمكن أن تنتج السموم بنسب متفاوتة مثل *Alternaria* و *Rhizopus* و *Mucor* و*Trichothecium* و *Trichoderma* و *Rhizoctonia* وغيرها (العزاوي،1977 ؛ نخيلان،2011) وتعد الأجناس الثلاثة من الفطريات *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* هي الأكثر وجوداً وإنتاجاً للسموم الفطرية في مخازن الحبوب إذ يهاجم *Aspergillus* و *Fusarium* الحبوب في الحقل وتستمر مع الحبوب أثناء الخزن (FAO, 2011 ; Abbas *et al*., 1988).

تختلف التأثيرات الحيوية التي تحدثها السموم الفطرية في جسم الكائن الحي باختلاف نوع السم وجنس الفطر المفرز للسم ونوعهِ، وأن من أهم السموم الفطرية التي تشكل خطورة من الناحية العملية والمؤثرة بشكل رئيسي والتي تلوث الحبوب ومكونات علائق الدواجن،هي الافلاتوكسينات والاوكراتوكسينات والسترگماتوسستين المنتجة من قبل أنواع الفطر *Aspergillus* spp. و السترنين والباتيولين والاوكراتوكسين المنتج من قبل أنواع الفطر *Penicillium* spp.

والترايكوثيسينات والزيرالينون المنتجة من قبل أنواع الفطر *Fusarium* spp. (Ezekiel *et al*., 2011 ; IFST, 2006; Hamilton *et al*., 1982).

٥.٢: تأثيرات السموم الفطرية

تختلف السموم الفطرية أختلافاً كبيراً في تركيبها الكيميائي ومن ثم فأنها تختلف في تأثيراتها البايلوجية والسمية ، حيث تعد السموم عامة سامة للخلايا (Cytotoxic)وتتداخل في العمليات الفسيولوجية التي تقوم بها الخلية في الجهاز العصبي وجهاز الدوران والجهازالهضمي والتناسلي والجلد والأعضاء الداخلية مثل الكبد والكلى والقلب والطحال والرئتين وغيرها (نخيلان،2011) وبالرغم من تزايد المعلومات التي تم الحصول عليها بشأن السموم الفطرية وتأثيرها في صحة الأنسان أو الحيوانات الزراعية غير أن أكثر المعلومات المتحصل عليها منشئها هو الدراسات الميدانية والأختبارات الخاصة بالحيوانات المختبرية والملاحظات البيطرية الميدانية وأكدت تلك الدراسات على أن تأثير السموم الفطرية هو مسألة على جانب كبير من الخطورة (أبراهيم والجبوري، 1998).

تلعب السموم الفطرية دوراً مهماً في أحداث تأثيرات صحية مختلفة فهي أما أن تتواجد في الأغذية وتشكل خطراً ملحوظاً على الكائن المستهلك عند تناوله للغذاء الملوث بها أو تتواجد في الهواء وتسبب مشاكل صحية خطرة عند إستنشاقها من قبل الكائن الحي ويطلق على هذه الطريقة بالطرق المباشرة (Direct route) (Garrido *et al*., 2003). وتتفاقم المشاكل الصحية هنا عندما تحدث في جماعات سكانية تكون معتمدة على نوع واحد من الغذاء، إذ يزداد تأثير السموم الفطرية بشكل تراكمي نتيجة للتعرض المستمر لها مقارنة مع الجماعات التي تعتمد على التنوع الغذائي في معيشتها (Belgin *et al*., 2004) إذ وجد أن هناك علاقة تآزرية بين بعض الأمراض والسموم الفطرية ومنها العلاقة بين سموم الأفلاتوكسينات ومرض التهاب الكبد الفايروسي(Hepatitis B Virus) وقد وجد أن هذا المرض بوجود الافلاتوكسينات يؤدي إلى حدوث سرطان الكبد (Krishnamachari *et al*., 1975).

أما التعرض غير المباشر(Indirect route) فيكون عن طريق تناول منتجات الحيوانات التي تغذت سابقاً على مواد علفية ملوثة بالسموم الفطرية (Verma, 2004). إذ تؤثر السموم الفطرية على الأنظمة الحيوية بطريقتين هما :-

١.٥.٢ - تأثير السموم الفطرية على معايير الدم الفسيولوجية والكيموحيوية

أحتل موضوع تأثير السموم الفطرية على المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية للدم مجالاً واسعاً في الدراسات البحثية لما لهذا الموضوع من أهمية بالغة لمعرفة تأثير هذه المركبات بعد التعرض لها من قبل الانسان والحيوان ، ولقد أشارت الكثير من الدراسات إلى التأثيرات السمية للنواتج الايضية الثانوية للفطريات على معايير الدم الفسيولوجية والكيموحيوية ففي دراسة قام بها Bodine and Mertens (2004) على الأرانب التي تغذت على أعلاف ملوثة بسموم الأوكراتوكسين وجد فيها ارتفاع في معدل أعداد كريات الدم البيض والسكر وإنزيمي GOT وGPT كما سبب أنخفاض في كمية الهيموغلوبين، وأشار Marin *et al* (2002) إلى أن سم الافلاتوكسين عمل على خفض أعداد كريات الدم البيض في الحيوانات المختبرية .

يعمل سم الأوكراوتوكسين نوع A على خفض مستوى البروتين الكلي في مصل دم الحيوانات المختبرية نتيجة التغير في تصنيع البروتين الذي ربما قد يكون ناتج عن تغير في وظيفة الكلية (Creppy *et al* .,1983).

كذلك وجد من التجارب أنَّ لسم الأوكراتوكسين تأثيراً على معايير الدم الفسيولوجية والكيموحيوية تمثلت بإرتفاع في عدد كريات الدم البيض وإنخفاض في كمية الهيموغلوبين ومستوى كلّ من الكوليسترول والكليسريدات الثلاثية وإرتفاع في مستوى سكر الكلوكوز في مصل الدم (Mohiudin *et al*.,1993; Harvey *et al*., 1992) ، وهذا ما أكده Stoytocho *et al* (١٩٩٩) عندما أجرى تجاربهُ على الدجاج حيث لاحظ أنخفاض في معدل مستوى كل من الكوليسترول وإرتفاع مستوى سكر الكلوكوز في مصل دم الدجاج المعامل بسم الأوكراتوكسين مقارنة مع معاملة السيطرة، فضلاً عن ملاحظتهِ للأنخفاض الحاصل في عدد كريات الدم الحمر في الحيوانات المعاملة.

وجد Swamy *et al* (2002) من خلال التجارب التي أجراها حول تأثير بعض السموم الفطرية على الحيوانات المختبرية أن تغذية الخنازير بأعلاف ملوثة بسموم الترايكوثيسينات تزيد من تركيز الكلوبينات المناعية في الجسم إذ ترتبط هذه الكلوبينات بجزيئات السموم في التجويف المعوي ثم يأخذها الدم وينقلها إلى النسيج الهدف.وفي دراسة أجرتها الخلخالي (2005) بينت فيها أن سموم الترايكوثيسينات سببت أرتفاع في مستوى أنزيم GPT مقارنة مع معاملة السيطرة، كما أن للأفلاتوكسينات تأثيراً على معايير الدم الفسيولوجية والكيموحيوية إذ أدى تجريعها للحيوانات المختبرية إلى أرتفاع في عدد كريات الدم البيض وإنخفاض كمية الهيموغلوبين وكذلك سبب أنخفاض في مستوى كل من بروتين المصل والكليسيرول(Sakhare *et a*l.,2007).

2.5.2: تأثير السموم الفطرية على أنسجة الجسم

يعد الكبد هو العضو الهدف (Target organ) في حالة التسمم بأكثر أنواع السموم الفطرية إلا أنهُ من الممكن تواجدها في أعضاء أخرى (Henry *et al*.,2001). أن الأمراض الناجمة عن استهلاك الأعلاف الملوثة بالسموم الفطرية ومنها سموم الأفلاتوكسين تتراوح بين حدوث اعتلال كبدي حاد (Acute hepatitis) والذي بدوره يتميز بحدوث تنخر(Necrosis) والنزف(Hemorage) وحصول تغيرات دهنية (Fatty changes) واضحة في الكبد نتيجة الأرتشاح الدهني والنخر في مركز الفصيصات الكبدية (Centro lobular necrosis) وكذلك حدوث الاشكال المزمنة (Chronic forms) في حين التعرض التراكمي للأشكال المختلفة من هذه السموم يؤدي إلى حدوث السرطانات وخاصة سرطانات الخلايا الكبدية (Hepatocellular carcinoma) (Williams *et al*., 2004).

بين Abdelhamid *et al*(1995) في دراستهِ تأثير سموم الأفلاتوكسينات B1، B2، G1، G2 على كل من نسيج الكبد والطحال في الأرانب حيث سببت أرتشاح خلوي وتنخر في خلايا الكبد مع حصول عدم تناسق في فصوص الكبد ، كذلك أثرت هذه السموم على نسيج الطحال مسببه إحتقانه وحدوث تنسج اللب الأحمر. كما أن الأفلاتوكسينات قد تحدث تغيرات شديدة في المادة الكروماتينية وتسبب زيادة غير طبيعية في حجم النوية يصحبها إحتقان وعائي للنسيج البرنكيمي للكبد وكذلك تأثيرات على نسيج الكلية لدى الفئران البيض (ابو شبع، 2003).

فيما يخص سموم الترايكوثيسينات فقد أشارت نتائج الدراسات المختبرية إلى أن إعطاء الترايكوثيسينات للدجاج تسبب في أحداث العديد من الأعراض المرضية منها الأسهال الحاد (Acute diarrhea) والتقيؤ(Vomiting) وحدوث بقع من الخلايا الميتة في مختلف أنسجة الجسم (Aldera, 2005).

أما الأوكراتوكسينات فمن أهم التأثيرات السمية التي تسببها في الحيوانات هي إعتلال الكلى المزمن(Chronic nephropathy) وإضمحلال الأنابيب الكلوية (Renal tubular atrophy) ، كما ولها تأثيرات سمية على الجينات (Teratogenic) والإستجابة المناعية في الحيوانات المختبرية (Perica *et al*., 1999 ; WHO, 1990). كما أدى تناول الأغنام لأعلاف ملوثة بسموم الأوكراتوكسين A إلى ظهور أعراض مرضية عليها مثل تحطم الكبد والكلى وتغير لون الإدرار إلى اللون الغامق (Dark urine) فضلا عن امتناع هذه الحيوانات عن تناول العلف (Anorexia) (AST, 2003). كما أن السموم الفطرية قد تحدث تغيرات نسيجية في الكلى منها حصول تجمع للسوائل

داخل النبيبات الكلوية بسبب نضح الماء من النسيج الطلائي المبطن لها فضلاً عن حدوث تغيرات شديدة في الكبيبات لدى الفئران البيض إلى جانب حصول النزف Hemorrhage حول الكبيبات وتجمع بؤري لخلايا التهابية (Focal Aggregate Inflammatory cells) (ابو شبع، 2003 ؛ الخالدي، 2010).

٦.٢: العوامل المحددة لتأثير السموم الفطرية في الكائن الحي

يتوقف تأثير السموم الفطرية في الكائن الحي على العديد من العوامل منها مايلي:-

1.6.2: نوع السم الفطري

تختلف السموم الفطرية في درجة سميتها فمثلاً سم Aflatoxin B1 أكثر سمية من Aflatoxin G1 وبناء على ذلك فأن مقدار الجرعة القاتلة سوف تتباين من كائن إلى آخر ضمن النوع الواحد في الحيوانات لذا فأن تأثير السم يعتمد على كلَ من مقدار الجرعة ومدة التعرض (Perica *et al.*, 1999).

2.6.2: مستوى السم في الغذاء المتناول

إن زيادة تركيز السم الفطري في الغذاء تزيد من الأضرار الناتجة في الكائن الحي، ففي إحدى التجارب على تراكيز مختلفة من سم Trichothecenes 2 في الدجاج وجد إن التركيز الأعلى من هذا السم سبب انخفاضاً في النمو فضلاً عن ظهور أعراض عصبية غير طبيعية (Asker, 2004; Perica *et al.*, 1999).

3.6.2: نوع الحيوان وعمره وجنسه

تختلف الحيوانات في درجة تأثرها بالسموم الفطرية بإختلاف النوع والسلالة والعمر والجنس، ولهذه العوامل أهمية في تحديد مدى تأثر المضيف بالسموم الفطرية (FAO, 2003). فقد وجد أن البط الصغير والخنازير يتأثران بالسم بسرعة مقارنة بالماشية والأغنام فهي أكثر مقاومة كما وجد إن الإناث أكثر مقاومة للسموم الفطرية مقارنة بالذكور ومقاومة الكائن الحي للسموم الفطرية تزداد مع تقدم العمر ثم تبدأ المقاومة بالإنخفاض والتأثر بالسموم في الأعمار المتقدمة كما هو حاصل في سن الشيخوخة (Asker, 2004) .

4.6.2: مدة التغذية

تتوقف الأضرار الحاصلة نتيجة التسمم الفطري على مدة أو طول فترة التعرض له. إذ أشارت عدد من الأبحاث إلى تعرض الحيوانات المختبرية إلى أورام كبدية وأضرار فسيولوجية مع زيادة مدة التغذية على السموم الفطرية (Asker, 2004 ; Perica *et al.*, 1999).

5.6.2: التداخل بين السموم الفطرية

إن احتمال إنتاج أكثر من سم واحد من قبل نوع فطري واحد في الوقت نفسه وعلى البيئة نفسها احتمال قائم وكبير ويترتب على ذلك وجود أكثر من سم فطري مع تغير تأثير كلّ منهما نتيجة التفاعل أو التداخل بينهماحيث تحدث ثلاثة أنواع من التأثيرات هي التأثير الإضافي(Additive effect) والتأثيرالمتكافل (Synergistic effect) والتأثير المتضاد (Antagonistic effect) (Asker, 2004).

٧.٢ : أهم أنواع السموم الفطرية

يصنف المشخصون السموم الفطرية على أساس العضو المتأثر بها فالسموم المؤثرة في الكبد تسمى Hepatotoxins والمؤثرة على الجهاز العصبي Neurotoxins والمؤثرة في الكلية Nephrotoxins (Eaton and Gallagher, 1994). في حين يضع المختصون في علوم الحياة هذه السموم في مجاميع بحسب تأثيرها العام فمثلاً يطلق على المسببة للسرطان Carcinogenes والمسببة للطفرات Mutagenes والمسببة للحساسية Allergenes (Marasas and Nelson, 1986).

أما علماء الأحياء المجهرية فأنهم يصنفون السموم الفطرية على أساس الفطر المنتج لها فمثلاً المنتجة من قبل الفطر *Aspergillus* تدعى Aspergillus toxins والمنتجة من قبل الفطر *Penicillium* تدعى Penicillium toxins (Cole and Cox, 1981)، في حين هنالك تصنيف يعتمد على الطبيعية الكيميائية للسم ويعمل بهذا التصنيف من قبل ذوي الأختصاص الكيميائي فيقسمون السموم الفطرية إلى مجاميع فمثلاً مجموعة السموم الفطرية الحاوية على لاكتات الكيومارين Coumarin lactones ومجموعة الكايتيدات المتعددة Polyketides ومجموعة السموم الفطرية المشتقة من الأحماض الأمينية Amino acid-derived (Cast, 2003). وفيما يلي أيجاز لبعض السموم الفطرية وتأثيراتها الحيوية:-

١.٧.٢: الأفلاتوكسينات Aflatoxins

وهي مركبات أيضية مسرطنة وسامة وتعد من أخطر أنواع السموم الفطرية للأنسان والحيوان كما تعود إلى مجموعة ثنائي الفيورانوكومارين Difuranocoumarine وتنتج من قبل مجموعة من الفطريات أهمها تلك التي تعود إلى بعض أنواع الفطر *Aspergillus* مثل *A. flavus* و *A. parasiticus* و *A.nomius* وأنواع من الجنس *Penicillium* مثل *P.citrinum* و *P.frequentans* (Peterson *et al*.,2001).

يعد الباحث Hartley *et al* (1963) أول من عزل وأستخلص أربعة أنواع من الأفلاتوكسينات المنتجة من قبل *A. flavus* و*A. parasiticus* بشكل بقع متألقة أطلق عليها B1،B2 ، G1، G2 إذ تشير الأحرف إلى لون التألق الذي تظهرهُ البقع على صفائح الكروماتوغرافي عند فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية، ويرمز الحرف B إلى اللون الازرق والحرف G إلى اللون الأخضر أما الأرقام 1 و2 فترمز إلى معامل الترحيل Rate of flow (Rf) التي تظهرها البقع على صفائح TLC (Meerdink, 2004). كما تم التعرف على نوعين آخرين من الأفلاتوكسينات وهما M1 وM2 وتسمى سموم الحليب Milk toxins وتنتج الأفلاتوكسين B1، B2 على التوالي بعملية Hydroxylation في الحيوانات الحلوبة، وتفرز سموم الحليب M1، M2 بمعدل يقارب 1.5% من معدل الافلاتوكسين B المستهلك (Forbish *et al*., 1986).

درست الافلاتوكسينات بعد ذلك بشكل مستفيض وقسمت بحسب درجة سميتها ونسب تواجدها في الأغذية والأعلاف إذ يعد الأفلاتوكسين B1 أكثرها خطورة وتواجد بتراكيز أعلى من بقية السموم في التلوث الطبيعي للمنتجات يليه الأفلاتوكسين G1 ثم B2 وG2 (المصلح، ١٩٩٠ ; Trucksess and wood, 1997). ولقد تم تحديد الصيغة التركيبية لمركبات الأفلاتوكسين B_1 وG_1 من قبل Asao *et al* (1963) بينما حددت الصيغة التركيبية للأفلاتوكسين B_2 وG_2 من قبل(١٩٦٣) Chang *et al*. وقد وجد أن الفطر *A. flavus* ينتج الأفلاتوكسين B1 وB2 والفطر *A. parasiticus* ينتج B1 وB2 وG1 وG2 (Agarwal and Sinclair, 199٧).

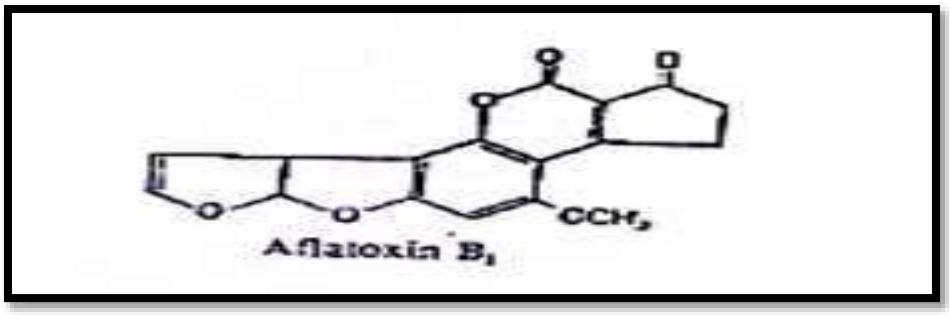
تمتاز الافلاتوكسينات بشدة توهج الفلورة المنبعث منها عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية وهذه الخاصية تجعل من الممكن الكشف عن تواجدها بمستويات واطئة جداً لكلّ بقعة من بقع الكشف المثبتة على ألواح الفحص الكروماتوغرافي. كما تمتاز بكونها مواد بلورية تذوب بشكل كامل في الكلوروفورم والميثانول والداي مثيل سلفوكسيد، وتكون ثابتة بدرجة حرارة دون 200° وفي غياب الضوء (Meerdink, 2004).

حظيت سموم الأفلاتوكسينات بأهتمام كبير جداً بسبب تأثيرها الفعال في الأنسان والحيوان وتعد أحد الملوثات الغذائية العالية السمية والتي يمكن دخولها إلى السلسلة الغذائية ابتداءً من الحقل وحتى وصولها إلى المستهلك بطريقة مباشرة أو غير مباشرة (IFST, 2006) فضلاً عن أنها تعد من أهم مسببات سرطان الكبد في الإنسان (FAO, 2003) كما لها تأثيرات مثبطة للجهاز المناعي فضلاً عن تأثيراتها المطفرة وإحداثها للتشوهات الخلقية (Williams *et al*., 2004).

أما من الناحية الوراثية فأن لهذه السموم تأثيرات على المستوى الجزيئي ، فقد أوضح Cocker *et al* (1984) أن الأفلاتوكسينات مسؤولة عن حالات تشوهات الأجنة Teratogenes والطفرات الجينية Mutagenes، وذلك من خلال تثبيط بناء الحامض النووي DNA وكذلك الحامض النووي RNA، فضلاً عن التأثيرات السمية على جينات الأستنساخ الأمينية ومن ثم تثبيط تكوين البروتين (Haworth *et al*., 1989).

كذلك وجد Benkerroum and Elaraki(2001) أن تعريض إناث الجرذ الأبيض الحوامل للأفلاتوكسين B1 أدى إلى ظهور أورام سرطانية في أكباد المواليد التي تناولت حليباً ملوثاً من أمهات كانت قد تغذت على عليقة ملوثة بسم الأفلاتوكسين B1 وأنهُ سبب الكثير من التشوهات الخلقية في الأجنة وهلاك نسبة عالية منها، فضلاً عن تأثيراتها التثبيطية للمناعة .

كذلك فأن الأفلاتوكسينات تحدث تأثيرات شديدة في المادة الكروماتينية وتسبب زيادة غير طبيعية في حجم النوية مصحوبة بأحتقان وعائي في النسيج البرنكيمي للكبد وكذلك تأثيرات واضحة في نسيج الكلية لدى الفئران البيض (الجميلي وابو شبع،٢٠٠٥) ، كما ان لهذه السموم تأثيراً على المعايير الفسيولوجية للدم والمتمثلة بإعداد كريات الدم البيض والحمر وحجم الكريات المضغوط وكمية الهيموغلوبين (Marin *et al*., 2002).كما أشارت الجنابي(٢٠٠٩) في دراستها حول تأثير سموم الأفلاتوكسين على بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية في إناث الجرذ الأبيض بأنها تسببت في خفض مستويات الهرمونات المحرضة للقند FSH و LH .وفيما يأتي الصيغة الكيميائية لسم الافلاتوكسينات B1 :



شكل(١,٢): الصيغة الكيميائية لسم الافلاتوكسين B1 (FAO, 1999).

2.7.2: الترايكوثسينات Trichothecenes :

هـي مجموعـة مـن السـموم الفطريـة تنـتج مـن قبـل العديـد مـن أجنـاس الفطريـات منهـا *Fusarium sp.* ، *Trichoderma* ، *Trichothecium* ، *Stachybotrys* ، *Mycothecium* وتعد أكبـر مجموعـة مركبـات سـامة ، إذ تظـم هـذه المجموعـة مـا يقـارب 150 نـوع (Poapolathep *et al*., 2004).

سجلت إولى حالات التسمم بالترايكوثسينات لأول مرة سنة 1900 في الاتحاد السوفيتي إذ أدت حـالات التسـمم هـذه إلـى مـوت المئـات مـن الأشـخاص نتيجـة تنـاول حبـوب مصـابة بـالفطر *Fusarium* spp والملوثة بتراكيز عالية من سم T2-Toxin، إذ ظهرت على الأشخاص أعراض مرضية أطلق عليها Alimentary Toxic Aleukia ، كما حدثت حالات مشابهة في اليابان نتيجة تناول حبوب فاصوليا ملوثة بسموم الترايكوثسين، وترجع تسمية الترايكوثسينات لأكتشاف أول مركب طبيعي منتج من الفطر *Trichothecium rosium* إذ أطلق عليه تسمية الترايكوثسين سنة 1949 وهو مركب ضعيف السمية للثديات لكنهُ مضاد حيوي للفطريات ذو طعم مر يوجد في التفاح المر الملوث بهذا الفطر، ثم توالى أكتشاف هذه المركبات تباعاً (عبد الحميد، 2000).

الترايكوثيسينات مركبات عديمة اللون ، بلورية صلبة في الغالب، وقد تمكن الباحثون من تحديد مواصفاتها بإستعمال تقنيات الفحص الطيفي،تختلف الترايكوثيسينات في مواصفاتها الكيمائية فبعضها يذوب بسهولة في المذيبات معتدلة القطبية كالكلوروفورم والايثر ثنائي الاثيل والأسيتون، بينما يتطلب إذابة البعض منها بمذيبات عالية القطبية مثل المحلول المائي لكحول الميثانول، كما أنها تتباين في خواصها الفيزيائية، ونظراً لخصوصية التراكيب الكيمائية للترايكوثيسينات فأنه لا يمكن تشخيصها اعتماداً على درجة امتصاص الأشعة فوق البنفسجية، ويشذ عن هذه القاعدة مركبا Roridin

وVerrucarin حيث من الممكن تشخيصهما بإستعمال الأشعة فوق البنفسجية (إبراهيم والجبوري، 1998).

دخلت سموم الترايكوثسين مجال الأسلحة البايولوجية والتي تمثل المطرالأصفر Yellow Rain إحدى صورها وأن أكثر السموم المتعلقة بهذه الأسلحة هي DON، T2-Toxin، Diacetoxyscirpenol (Smith and Ross, 1991). ويتعرض الكائن الحي لهذه السموم بصورة مباشرة عند تناولهُ الأغذية الملوثة بها، تستهدف هذه السموم الخلايا النشطة في الانقسام كالخلايا المعوية وخلايا الغدة الدرقية والطحال ونخاع العظم (Moss, 2002).

تتميز سموم الترايكوثسينات بأنها سهلة الامتصاص عن طريق الجهاز الهضمي أو عن طريق الجلد لذا يكون تأثيرها السام شديداً وتتمثل أعراض التسمم بسموم الترايكوثسينات برفض الغذاء والتقيؤ والإسهال وفقدان الوزن واضطرابات عصبية وأضرار بالأوعية الدموية والقلب وتثبيط الجهاز المناعي واحتقان الجلد وأضرار في نخاع العظم، لذلك تعد الترايكوثيسينات من المركبات السامة للخلايا النباتية (Phytotoxic)حيث تسبب أعراض شحوب وتثبيط نمو الجذور وأستطالتها وتقزم النبات (Bennett and Klich, 2003).

٢.٧.3: الأوكراتوكسينات Ochratoxins

الأوكراتوكسينات عبارة عن مجموعة من مركبات فطرية أيضية ثانوية ذات تراكيب كيمياوية متقاربة، يتم تصنيفها تبعاً لأصلها التركيبي الحيوي كمجموعة من الكيتايدات الخماسية Pentaketides ضمن الكيتايدات المتعددة Polyketides تنتج من قبل الفطر *A. ochraceus* و*A. ostinus* و*A. melleus* وبعض أنواع الفطر *Penicillum* مثل *P. verrucosum*، يتواجد هذا السم في محاصيل الحبوب والقهوة والفواكه المجففة كما يمكن أن يوجد في لحوم الحيوانات التي تتغذى على أعلاف ملوثة بالسم (Cast, 2003).

٢.٧.٣.1:أنواع الأوكراتوكسينات

لسم الأوكراتوكسين أنواع هي أوكراتوكسين A وأوكراتوكسينB وأوكراتوكسين C ولسم الأوكراتوكسين A أنماط عديدة هي ،أوكراتوكسين مثيل أستر وأوكراتوكسين A سيرين وأوكراتوكسين A ليسين ،كماأن الاوكراتوكسين B يحتوي أنماط هي أوكراتوكسين B مثيل أستر وأوكراتوكسين B أثيل أستر(Marquardt and Frohlic,1992).

7.2 .3 ٢: التركيب الكميائي والصفات الفيزيائية لسموم الاوكراتوكسين

سموم الأوكراتوكسين هي أحدى مشتقات المركب الحلقي ايزوكومارين Isocoumarin مرتبطة مع الحامض الاميني L-phenylalanine (Steyn,1971) .

أن التركيب الكيميائي الجزيئي لسم الاوكراتوكسين A هي ($C_{20}H_{18}ClNO_6$)، ويبلغ الوزن الجزيئي لهُ 403.8 دالتون (Mantle and Chow, 2000). أما سم أوكراتوكسين B تركيبهُ الكيميائي ($C_{20}H_{19}NO_6$) ووزنهُ الجزيئي 369.37 دالتون، في حين أوكراتوكسين C تركيبهُ الكيميائي ($C_{22}H_{22}ClNO_6$)ووزنهُ الجزيئي 431.87 دالتون (Meulenberg, 2012). أن السم أوكراتوكسينB يشابه تماماً في تركيبهِ للأوكرا توكسين A عدا إفتقاده لذرة كلور، كما يعد أقل أمتصاصاً وأسرع تحللا تبلغ سميتهُ 10% فقط من سمية الأوكراتوكسين A ونادرا ما يكون سم الاوكراتوكسين B ملوثاً طبيعياً(عبد الحميد، 2000). والاوكراتوكسينات حوامض عضوية ضعيفة ترجع سميتهُا إلى مجموعة الفينولك هيدروكسيل في حلقة الدي هايدرو آيزو كيومارين dihydroisocoumarine (Nwagu and Ire,2011).

١.٢.٣.٧.٢:الأوكراتوكسين A:

أكتشف العالم Scoot الأوكراتوكسينات سنة ١٩٦٥ في جنوب أفريقيا (Nwagu and Ire, 2011 ; Scott, 1965)،ويعد الأوكراتوكسين A من أول المركبات المكتشفة ضمن هذه المجموعة وهو المسؤول الأول عن حدوث حالة Balken endemic nephropathy (Radovanovic *et al*., 1991). وعزل بعد ذلك بكميات كبيرة من الذرة في الولايات المتحدة الأمريكية وشخص على كونهِ سماً يؤثر في الجهاز البولي (Shotwell *et al*., 1969 ; نخيلان، 2011)، وتبع ذلك دراسة المركب المذكور وتحديد خواصه وصيغته الكيميائية، كما تم إكتشاف مركب آخر مشتق وهو الأوكراتوكسين B (Turconi *et al*., 2004). أن الفعالية السمية لسم الأوكراتوكسين A قد تشمل على عدد من التأثيرات منها تسمم الكلية (Nephrotoxicity) وتشوهات خلقية (Teratogenicity) وتأثيرات سرطانية (Carcenogenic) من الكلية والكبد وتأثيرات سمية على الأجهزة العصبية والمناعية (Abdel Wahhab,1999;Heroshi et al.,1997) ،ونادرا ما يسبب سم الأوكراتوكسين A مشاكل سمية للحيوانات المجترة وذلك لوجود أحياء مجهرية في القناة الهضمية للحيوانات المجترة لها القابلية على تحليل سم الأوكراتوكسين A ذو السمية الشديدة وتحويله الى ألفا أوكراتوكسين الأقل سمية ، إذ يؤثر سم الأوكراتوكسين A في الأحماض النووية DNA وRNA وفي تصنيع البروتين في العديد من الكائنات الحية (Meisner and Krogh,1986)، والجرعة نصف المميتة LD50 للجرذان تتراوح ما بين (٢٠-٣٠) ملغم لكل كغم من وزن الجسم أما الخنازير والدواجن فإن الجرعة نصف المميتة لهما هي

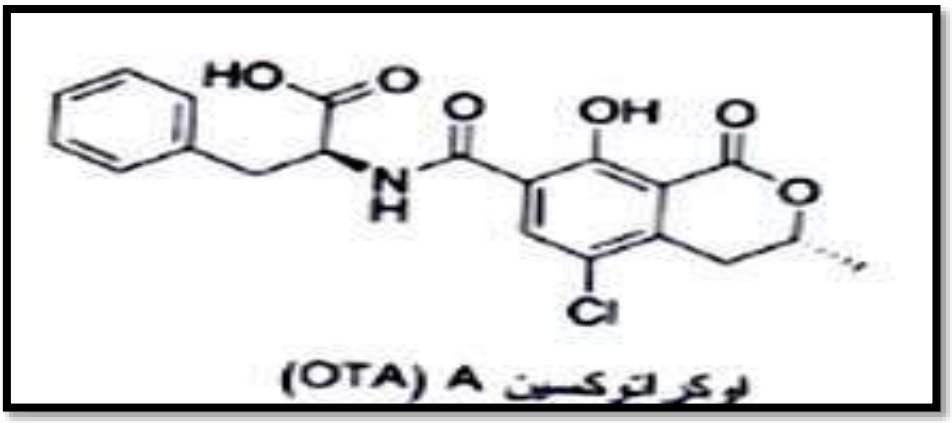
(١ ،٣,٣)ملغم لكل كغم من وزن الجسم على التوالي حيث تعد الكلاب والخنازيرمن أكثر الحيوانات حساسية له والدواجن من أكثر الطيور.

تعمل هذه السموم على تدمير أنسجة الكليتين وأصطباغ لونها باللون الأسمر المصفر مع زيادة الأسهال ذو اللون الأبيض المحتوي على أملاح اليوريا مع زيادة الحساسية للإصابة بالأمراض ،حيث يسبب الأوكراتوكسين الفشل الكلوي كما أنه يؤثر على تمثيل الكاربوهيدرات في الجسم ، كما يؤثر على أغشية المايتوكوندريا ويسبب تثبيطها ، من ناحية أخرى فإن تأثيره على الإنسان يتمثل في تأثيره على الكلى حيث يسبب ألتهابات مزمنة وفشل كلوي كما يؤدي الى إنكماش الكلى وأورام القناة البولية ،وهو يؤثر على الأناث أكثر من الذكور وأكثر البلاد توطنا لهذه السموم هي دول البلقان خاصة بلغاريا ورومانيا ويوغسلافيا ،وتسبب هذه السموم رفع نسبة اليوريا بالدم وكذلك تؤثر على عملية تخثر الدم ويعد الأوكراتوكسين مؤثر قوي على تطور الأجنة محدثا تشوهات كبيرة في حيوانات التجارب كذلك يؤثر على الجهاز المناعي في عدد من الثدييات ، من جهة أخرى تم أثبات تعرض الأنسان للأوكراتوكسين من خلال الكشف عنه في الدم وحليب الأم (Barkai-Golan and Paster, 2008).

كما وجد أنه يسبب تأثيرات سمية عصبية ومسرطنة ومشوهه للأجنة في الحيوانات المختبرية (اسماعيل،٢٠١٤) ، وأشارت منظمة الصحة العالمية إلى أن تناول هذا السم من قبل الإنسان يؤدي إلى حدوث أعتلال كلوي Nephropathy والذي كثيراً ما يؤدي إلى حصول أمراض سرطانية في الجهاز البولي (WHO, 1990) حيث سجلت حالات حصل فيها فشل كلوي حاد بعد 24 ساعة من تناول أغذية ملوثة بهذا السم وكذلك سجل أنهُ يسبب أورام سرطانية في حوض الكلية كما يسبب ضمور مزمن للكلى حسب تقديرات سنة 1977 وعزي إليه السبب في إحداث 16 إلى 20 ألف حالة مرضية توفي منهم ما يزيد على 600 شخصٍ سنوياً ويُعد مرضاً كلوياً مستوطناً في حوض نهر الدانوب في صربيا والبوسنة وكرواتيا وبلغاريا ورومانيا ويسبب أمراضاً خبيثة (Cast,2003) .

٢,٢.3.7.٢: الخواص الفيزيائية لسم الأوكراتوكسين A

الأوكراتوكسين A مركب بلوري عديم اللون يتم الحصول عليه من بلورة البنزين ودرجة أنصهاره حوالي ٩٠مْ ويذوب بالمذيبات العضوية القطبية لكنه قليل الذوبان في الماء ويذوب أيضا في المحاليل المخففة لبيكاربونات الصوديوم (Krogh,1987;Patterson,1978).يتألق سم الأوكراتوكسين A عند تعرضه للأشعة فوق البنفسجية بلون أخضر (عند الطول الموجي ٣٤٠ نانومتر)، وعند رش صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC) بمحلول قاعدي يتحول التألق إلى اللون الأزرق (Patterson,1978).



شكل (٢,٢): الصيغة الكيميائية لسم الأوكراتوكسين (Steyn, 1971).

٢,٣.3.7.٢: العوامل المؤثرة في أنتاج سم الأوكراتوكسين A

١- درجة الحرارة

تتفاوت الفطريات فيما بينها في درجة حرارة نموها فلكلّ فطر درجة حرارة خاصة لنموه فمثلا الفطر *A.ochraceus* ينمو في مدى حراري من (٨-٣٧) مْ ودرجة الحرارة المثلى لأنتاج سموم الأوكراتوكسين A تنحصر بين (٢٥-٣٠) مْ، أما الفطر *P.viridicatum* فأنه يستطيع النمو في مدى حراري ينحصر بين (٠-٣١) مْ وأن أعلى أنتاج للأوكراتوكسين A يحدث بحدود ٢٠ مْ فما فوق (Northolt *et al* .,1979 b و Northolt *et al*., 1979 a)

٢- الرطوبة

تتفاوت قيم الرطوبة المثلى لأنتاج سموم الأوكراتوكسين من قبل الفطريات لجنسي *Aspergillus* و *Penicillium* بين (٨٣-٩٠%) و(٩٥-٩٩%) على التوالي في درجة حرارة ٢٤مْ ، وأن الفطر *A,ochraceus* قادر على النمو في قيم نشاط مائي أقل من ٧٩% والقيمة المثلى للنمو هي قريبة من ٩٩% (Pitt and Hocking ,1985).

٣- الأس الهيدروجيني pH

أن قيم الأس الهيدروجيني لأنتاج سموم الأوكراتوكسين A هي بين (٦,٠ – ٦,٣) بينما لنمو الفطريات تكون قيم الأس الهيدروجيني هي (٥,٥) وأن أنتاج سم الأوكراتوكسين A يكون عادة أكثر تأثرا بتركيب الوسط الغذائي لاسيما وجود أو فقدان العناصر المغذية (Lai *et al* .; 1970).وان الأس الهيدروجيني الأمثل لأنتاج سموم الأوكراتوكسين A لجنسي *Aspergillus* و*Penicillium* هو(٥,٦) في ظروف المختبر (Northolt *et al* .;1979a) .

٤- المادة الأساس

أن للمادة الأساس التي تنمو عليها الفطريات المنتجة لسموم الأوكراتوكسين A لها تأثيرا كبيرا على أنتاج سموم الأوكراتوكسينA ، ولأنواع جنس *Aspergillus* قدرة عالية على أنتاج سموم الأوكراتوكسين في الحبوب التي تمتلك محتوى عالي من البروتين والبذور الزيتية بينما لوحظ أن بعض أنواع جنس *Penicillium* تنتج مستويات عالية من السموم في البذور الغنية بالكاربوهيدرات (Madhyasta *et al* .;1990).

٥-التنافس الميكروبي

يؤثر وجود الأحياء المجهرية الطبيعية على الحبوب في أنتاج سم الأوكراتوكسين A وخاصة بعض الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* (Gareis and Scheuer, 2000) ولكن بعض الأحياء المجهرية الموجودة في القناة الهضمية للمجترات مثل الجمل والخراف تمتلك القدرة على تحويل سم الأوكراتوكسين A الى أوكراتوكسين نوع ألفا.

٢.٧.٣.٣.٣:التأثيرت المرضية لسم الأوكرا توكسين A في الحيوانات المختبرية

تعد خلايا الكلية الهدف الرئيسي لسم الاوكراتوكسين A، إذ وجد أنهُ عندما تناولت الخنازير الهنغارية علفاً ملوثا بالفطر *A. ochraceus* لوحظ عليها أعراض سريرية مختلفة منها ارتفاع ضغط الدم، إسهال، قلة الشهية ونزيف جلدي في كل أجزاء الجسم. أثبتت الدراسات الخاصة بالتسمم الحاد أن الخنازير والكلاب هي الأجناس الأكثر حساسية وأن سبب الموت نسب إلى النزف الكبير والتخثر في داخل الأوعية الدموية وتقرحات في الكبد، الكلية، والأعضاء اللمفاوية (FAO, 1999 ; Glavits and Vanyi, 1995).

أجريت دراسات حول تأثير الأوكراتوكسين A على الجرذان والكلاب والخنازير فوجد أن أكثرالتأثيرات المرضية قد ظهرت في الكلية، وفي كل جنس من هذه الاجناس لوحظ حدوث اعتلال كلوي شخص عن طريق حصول تدهور في وظيفة الكلية، وتقرح في الخلايا الأنبوبية، وتثخن في الأغشية الأنبوبية السفلية (Bauer *et al*., 1988)، وأن شدة هذه التأثيرات تعتمد على الجرعة وعلى حساسية الجنس الحيواني المستعمل في البحث أما الدراسات طويلة الأجل باستعمال الفئران والجرذان أظهرت أنه فضلاً عن الأعتلال الكلوي واعتماداً على الجرعة المعطاة ظهرت دلائل على حدوث حالات من الأورام الحميدة والخبيثة كما ظهر بأن الجرذان كانت أكثر حساسية من الفئران (Baily *et al*.,1989) كما درس الاوكراتوكسين A كعامل مسرطن كلوي إذ يسهم في أحداث الأورام في كلية الإنسان وقناته البولية (Bendele *et al*., 1985) ، أوضح (Creppy *et al*., 1983)أن الاوكراتوكسين A يسبب كسراً في أحد شريطي DNA لخلايا طحال الفئران إذ أن هذا التكسر قد وجد أيضاً في الكبد والكلية

والطحال للفئران التي أخذت جرعة واحدة من هذا السم وكذلك في كلية وكبد الجرذان بعد تناول جرعة مقدارها 2 ملغم/ كغم من الاوكراتوكسين A في غذائها ولمدة 12 أسبوعاً (Kane *et al*., 1986) ، وتم أقتراح التأثيرات المسرطنة للأوكراتوكسين Aعلى أنها خاصية تطفير Mutagenic، إذ يمتلك الاوكراتوكسين A فعالية في كبح تخليق DNA وRNA والبروتين وربما يسبب تحطماً غير عكسي في الموقع وهو الكلية (ابراهيم والجبوري، 1998).

للأوكراتوكسين A القابلية على تغير الكروموسومات في الخلايا اللمفاوية للإنسان، ويسبب انحرافاً في تلك الكروموسومات وهي حالة مشابهة لتلك التي شخصت مسبقاً في الخلايا اللمفاوية المأخوذة من المرضى الذين يعانون من الأعتلال الكلوي المستوطن في دول البلقان (Manolova *et al*., 1990).

وفي دراسة أجراها Cole *et al* (1986) حول التاثيرات المحتملة لسم الأوكراتوكسين A على التركيب الدقيق لكلى الأرانب بعد تجريعها بالسم أعلاه وجد حدوث تغيرات في التركيب الدقيق للخلايا الطلائية المبطنة للكلية وأرتشاح في الخلايا الألتهابية وتضخم محفظة بومان .

٢ .٧.٣.٣.٤:تأثير سم الأوكراتوكسين A على الأنسان

أشارت الموسوي (٢٠١٥) في دراسة لها علاقة بعض الفطريات وسمومها بحالات الفشل الكلوي غير معروف الأسباب إذ أثبتت وجود سم الأوكراتوكسين A في دم وادرار المرضى والأصحاء ،كما أظهرت نتائج عدد من الدراسات الوبائية بأن سم الأوكراتوكسين A هو المسؤول عن مرض التسمم الكلوي المؤثر على المجتمعات الريفية في البلقان مثل بلغاريا وكرواتيا ورومانيا وصربيا وسلوفينيا ، وتسبب هذه السموم أمراضا كثيرة في الأنسان والنساء أكثر عرضة بهذه السموم من الرجال حيث يؤدي الى تقرن الكبيبات الكلوية وتلف وظائف الكلية والصداع وألم الظهر وفقر الدم ونقص الوزن ،كما يعد سم الأوكراتوكسين A مادة ملوثة لعدد كبير من الأغذية التي يظهر تأثيرها على الأنسان وخاصة في دول البلقان (Galtier *et al* ., 1980). أما أهم التأثيرات السمية لسم الأوكراتوكسين فأنهُ يمتص في القناة المعوية عند تناول الأغذية الملوثة به ويؤدي إلى حدوث تغيرات مرضية واضحة في الكلية وكبح للجهاز المناعي وحتى السرطان ولهُ القابليةعلى الارتباط بالبومين المصل ((Fung and Clark ,2004) وكثيرا ما يفرز هذا السم في الحليب للأنسان والحيوان عند تناولهما الأغذية الملوثة به، وأن وجود هذا النوع من السم في حليب الأطفال الرضع يعد مشكلة صحية كبيرة لفتت أنتباه كثير من الباحثين لما لهذا المركب من تأثيرات بالغة الأهمية لاسيما وأن الجهاز المناعي لم يكتمل في هذه المرحلة من عمر الإنسان (Beretta *et al*., 2002) .

٢.٧.٣.٣.٥:المستويات الصحية لسم الاوكراتوكسينA وحدود السماح به في الأغذية والأعلاف

أن تلوث أي منتج زراعي أو مادة غذائية بأي نوع من المركبات الخطرة فأنها تصبح غير صالحة للإستهلاك البشري أو الحيوانات الزراعية، وفي ضوء ذلك حاولت العديد من البلدان والمنظمات العالمية أن تضع مقاييس موحدة وقوانين لتحديد الحدود المسموح بها لتواجد السموم الفطرية في المواد الغذائية سواء كانت للإستهلاك البشري أو الحيواني (IFST, 2006) .

تختلف المقاييس الموضوعة في البلدان المشرعة من بلد إلى آخر تبعاً لعوامل عدة مثل الموقع الجغرافي وطبيعية الأنتاج الزراعي والعوامل الأقتصادية والأجتماعية والسياسية (Erik, 2004). ونظرياً فأن العديد من العوامل تؤخذ بنظر الأعتبار من قبل السلطات المختصة لتحديد الحدود المسموح بها من السموم الفطرية في الأغذية والأعلاف وتشمل هذه العوامل توفر المعلومات أو المعطيات الخاصة بعلم السموم وتوفر المعطيات المحللة للدراسات المسحية والعادات الغذائية في البلدان، وتوزيع السموم الفطرية في السلع الغذائية وتوفر طرائق التحليل الملائمة والتي يمكن الأعتماد عليها (Jorjensen and Biled, 1996). ويوجد العديد من البلدان في العالم لها قوانين خاصة بالسموم الفطرية في الأغذية الطازجة والأغذية المصنعة (Meulenberg , 2012)، ففي نهاية الستينيات 1968 بدأت الولايات المتحدة الأمريكية بتطبيق قوانين تحدد مستويات السموم الفطرية في الأغذية والأعلاف وعلى سبيل المثال حدد مقدار ما يمكن أن يتعرض لهُ الإنسان يومياً من سم الاوكراتوكسين A بين (0.7 - 4.7) نانوغرام /كغم من وزن الجسم في الغذاء، ومن(0.2-2.4) نانوغرام /كغم في الدم (EMAN,2011).

شهدت الثمانينات والتسعينات من القرن المنصرم زيادة كبيرة في عدد الدول المشرعة للقوانين الخاصة بتحديد مستويات السموم الفطرية في الأغذية والأعلاف وصلت إلى 77 دولة حتى عام 1995و13 دولة لها ضوابط عامة في حين لا تزال 50 دولة لا تمتلك أي نوع من المقاييس ، وفي نهاية عام 2003 أرتفع عدد الدول التي أعطت معلومات إلى منظمة الزراعة والأغذية الدولية Food and Agricultuer Orgnazation (FAO) تخص التشريعات التي وضعتها على مستويات التلوث بالسموم الفطرية في مختلف الأغذية والمحاصيل إلى 99 دولة أي زيادة بنسبة ٣٠ % عن العدد في عام ١٩٥٠.

لم يكن العراق ضمن الدول التي أرسلت ما يخص تشريعاً أوتجديداً للقوانين الخاصة في هذا المجال (WHO, 2003). وضعت ثمانية دول من دول شمال أوربا قوانين واضحة تخص سم الاوكراتوكسين A فحددت نسب السماح من (2-50) مكغم/ كغم للأغذية و (5-30) مكغم/كغم للعلف الحيواني ومن (1-5) مكغم/ كغم لأغذية الأطفال (Veradi and Rosner, 1995).

حددت دول الأتحـــاد الأوروبـــي المستوى الصحـــي الذي يمكن أن يتعرض له الأنسان من سم الاوكراتوكســـين A يوميـــاً بـــ 5 نـــانوغرام/ كغـــم مـــن وزن الجســـم كحـــد أقصى (Sweeney *et al*., 2000)، أما في الحبوب فكانت 5 ملغم/ كغم وفـي القهوة المحمصة بـ5 ملغم /كغم وفي بعض الفواكه المجففة كالعنب (الزبيب والكشمش) بـ 10 ملغم/كغم (Duarte *et al*.,2010 ; IFST, 2006). وفي عصير العنب والفواكه فكانت 2 ملغم/ كغم أما أطعمة الأطفال الرضع وبعض الأطعمة الخاصة للأغراض الطبية فكانت0.5 ملغم /كغم، في حين العلف الحيواني 5-30 ملغم/ كغم (Beretta *et al*., 2002 ; Kabak, 2012).

أما في الصين حددت النسبة في الحبوب والبقول بـ 5 مكغم /كغم وفي إيران حددت النسبة 5مكغم /كغم في الحنطة، وفي تركيا حددت النسبة 5 مكغم /كغم في الحبوب الخام و3 مكغم / كغم في الأغذية المصنوعة من الحبوب (Duarte *et al*., 2010).

٨,٢: دور الأحياء المجهرية في مكافحة المسببات الفطرية

استعملت العديد من الأحياء الدقيقة في مكافحة الكثير من المسببات المرضية التي قد تصيب النبات ولم يكن التركيز على الجوانب التجارية لهذه المكافحة إلافي غضون العقدين الماضيين وجاءت نتيجة للتطور العلمي في مجال المكافحة الحيوية والمشاكل العامة من جراء استعمال المواد الكيمياوية الزراعية ،فضلا عن إمكانية مكافحة بعض الأمراض والتي لا يمكن السيطرة عليها بأستعمال الأساليب المتبعة كالمبيدات الكيمياوية والطرق الزراعية وتمخضت أبحاث عدد كبير من الباحثين خلال السنوات الأخيرة وفي مختلف أنحاء العالم عن توظيف عدد كبير من الأحياء الدقيقة في هذا المجال خاصة الأحياء المتوطنة في الترب أو المحمولة فيها وأحتلت أنواع البكتريا التابعة لجنسي *Bacillus* و *Psedomonas* مركز الصدارة في هذا المجال .(قاسم ،١٩٩٨ و العاشور ،٢٠٠٥) .

١,٨,٢:الخصائص التصنيفية العامة لبكتريا *Psedomonas*

تمتاز خلايا بكتريا *Psedomonas* بكونها مفردة مستقيمة ،مسوطة وسالبة لصبغة كرام شائعة التواجد في الترب العضوية ،هوائية إجبارية ،متحركة بسوط قطبي أو سوطين وأحيانا أسواط غير قطبية ،ذات أفعال حيوية مؤكسدة وموجبة لفحص الكاتليز ،غير مكونة للأبواغ أو المحفظة . تنتج العديد من الصبغات في الأوساط الخالية من الحديد (Govan,1997). المديات الحرارية التي تنمو فيها تتراوح بين (٤-٤٠)مْ والمثلى تقع بين (٢٥-٣٠) مْ ويتوقف النمو عند درجة حرارة (٤١-٤٣) مْ (الكرخي ،٢٠٠١).

٢,٨,٢:الصفات التشخيصية لبكتريا *Psedomonas fluorescens*

بكتريا هوائية ، موجبة لانزيم الكاتيلزوالأوكسديز ،سالبة لصبغة كرام ،تنمو على وسط الماكونكي وتنمو بدرجة حرارة ٤١ مْ ويصبح نموها ضعيفا عند درجة حرارة ٤ مْ ،تخمر الكلوكوزفتنتج حامض وغاز ،تسيل الجيلاتين .(Macfaddin,2000)

٣,٨,٢:دور البكتريا *P.fluorescens* وأهميتها في مكافحة المسببات المرضية

لبكتريا *P.flurescens* أهميه كبيرة في تثبيط نمو عدد كبير من الفطريات والأحياء الدقيقة الملوثة للغذاء ،فقد إستعمل كثيرا من سلالاتها المثبطة في كثير من برامج المقاومة الحياتية ، فضلا عن إستعمال تقنيات الهندسة الغذائية في تطوير المقاومة من سلالات أخرى في هذه البكتريا (Duijff ,1994;Leeman,19٩٤).

تعد بكتريا *Psedomonas fluorescens* رمية المعيشة ، واسعة الأنتشار في الطبيعة تتواجد في الترب والمياه وعلى أسطح و جذور النباتات ، كما وتعد هذه البكتريا من اكفأ الأنواع وأكثرها فعالية في التضاد مع الأحياء المجهرية وإنتاج مضادات حيوية (Thomashow and Weller, 1988) .

أطلق مصطلح التضاد الحيوي الحيوي (Antagonism) على بعض العلاقات التضادية بين الأحياء المجهرية وتعرف بأنها أحد أنواع الأرتباط بين الأنظمة الحية، إذ تستطيع إحدى هذه الأحياء من تحطيم الكائن الحي الأخر أو الحد من نموه لغرض الحفاظ على حيويته وتكاثره (Leisinger and Margraff ,1979; Girija and Kumar ,2005).

تمتلك بكتريا *P.fluorescens* صفات بيئية وفسيولوجية متعددة مكنتها من إحتلال مركز الريادة في السيطرة على المسببات المرضية للنباتات تمثلت بالآتي:

A - الموطن الطبيعي لبكتريا *P.fluorescens* هو التربة والغالب هو تخصصها الدقيق على المواد العضوية في المنطقة المتأثرة بالجذور (Rhizosphere)، فضلا عن قدرتها على إستغلال نواضح الجذورفي التغذية ومن ثم تواجدها على سطوح الجذور مباشرة (Rhizoplan) (Rovira and Sands ,1971).

B - إن المعدل النسبي لنمو بكتريا *P.fluorescens* وتكاثرها سريع مقارنة بأنواع البكتريا الأخرى فقد أشار كل من (Rovira and Sands,1971)إلى ان الفترة ألتي تحتاجها للأنشطار على جذور نبات الصنوبر *Anus radiate* هي ٥,٢ دقيقة بينما فترة إنشطار البكتريا Bacillus spp هي (٣٩-٧,٢) ساعة .

C - تنتج بكتريا *P.fluorescens* أنواعا عديدة من المضادات الحياتية التي تثبط نمو المسببات المرضية البكتيرية والفطرية في الطبيعة (Leisinger and Margraff ,1979 ; Raaijmarkerrs,1994 ;Ursula *et al*.,2000).

D - قدرة هذه البكتريا على تحفيز النبات عن طريق إنتاج منظمات النمو والتي لها دور كبير في تسريع نمو النباتات المعاملة بها (Amara *et al* .,1996).

٤,٨,٢ الدراسات المحلية لدور *P.fluorescens* في المقاومة الحيوية ضد المسببات الفطرية

على الصعيد المحلي ثبطت بكتريا *P.fluorescens* نمو الفطر *Rhizoctonia solani* في الوسط الزرعي وأعطت زيادة في النسبة المئوية لبزوغ بادرات القطن المعاملة بالبكتريا في الحقل مقارنة بغير المعاملة (الجبوري، ١٩٩٨) ،وذكر الجميلي(١٩٩٦) إن إضافة اللقاح البكتيري لبكتريا *P.fluorescens* إلى نباتات فستق الحقل في مرحلتي البادرة والتزهير قد حققت مقاومة فعالة ضد الفطر *A.flavus* فضلا عن الفطريات الممرضة الأخرى لاسيما الفطر *F.solani* ،كذلك وجد إن لموعد إضافة اللقاح البكتيري تأثيرا على كفاءة المقاومة ،إذ بلغت الإصابة بالفطر ٢,٦% ونسبة التلوث في البذور ٠,٦% عند إضافة اللقاح في مرحلتي البادرة والتزهير قياسا بنسبة الأصابة ٢٨% ونسبة تلوث ٣٥% في بذور معاملة المقاومة ، وقد إمتازت النباتات المعاملة باللقاح البكتيري في مرحلتي البادرة والتزهير بزيادة معنوية في معدل الوزن الجاف للنباتات وبين قاسم (١٩٩٨)إن راشح سلالة بكتريا Pf5 *P.flurescens* ثبط نمو وتجرثم الفطر *A.flavus* المسبب لتلوث حاصل الذرة الصفراء في الأوساط الزرعية فضلا عن تخفيضها لنسبة تلوث حبوب الذرة الصفراء بالفطر إلى ٣,٣% قياسا بمعاملة المقارنة التي بلغ التلوث فيها ١٠٠% .

كما وجد ان للقاح بكتريا *P.fluorescens* كفاءة تثبيطية عالية لنمو الفطر *F.graminearum* في الوسط الزرعي ،كما أوضحت التجربة الحقلية كفاءة اللقاح في خفض معدلات نسب الأصابة بالفطرفي حين إرتفعت النسبة في معاملة المقارنة (جاسم ،١٩٩٩).

كما أعطى اللقاح البكتيري *P.fluorescens* Pf5 حماية لبذور بادرات الحنطة وخفض معدلات الإصابة بالفطر *R.solani* في النبات وبمعنوية عالية بلغت ٤,١% في حين بلغت في معاملة المقارنة ٢٤,٥%(الجميلي والوائلي ، ٢٠٠٠). وبينت الكرخي (٢٠٠١) قدرة سلالة *P.florescens* على تثبيط نمو الفطر الممرض *R.solani* في الوسط الزرعي بنسبة ١٠٠% في التراكيز العالية ، كذلك تفوق

معاملة اللقاح البكتيري في خفض النسبة المئوية لموت البادرات في الطماطة إلى ١٨,٤٤% بينما بلغت في معاملة المقارنة ٩٠% .

٥,٨,٢:المستحضر الحيوي الفلوراميل

أن للبكتريا *P.fluorescens* قدرة عالية على كبح نمو ونشاط كثير من المسببات المرضية الفطرية والحد من أضرارهاعلى النبات (الجميلي،١٩٩٦; الكرخي ، ٢٠٠١) ولإستعمال هذه البكتريا على نطاق واسع في الحقل ، تم تحميل لقاح البكتريا *P.fluorescens* على كاربونات الكالسيوم بحيث أصبح منتج حيوي صناعي سهل التداول والإستعمال تم تسميته بالفلوراميل .

حضر المستحضرالحيوي فلوراميل لأول مرة في العراق من قبل الباحث الجميلي في عام ٢٠٠٢ (مطوق ،٢٠٠٥) ، حيث يتكون هذا المستحضر من لقاح البكتريا *P.florescens* كمادة فعالة وكاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للمستحضر . وإعتمد كمستحضر حيوي فعال وناجح من قبل اللجنة الوطنية لتسجيل وإعتماد المبيدات في وزارة الزراعة العراقية .

أجريت على هذا المستحضرالعديد من الدراسات التي أثبتت كفاءته العالية في السيطرة على العديد من المسببات المرضية للنبات . فقد ذكر أبو شبع(٢٠٠٣) إن للمستحضر الحيوي الفلوراميل كفاءة عالية في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين *A.niger* و *A. flavus* وبنسبة ١٠٠% في الوسط الزرعي . أما بالنسبة للتجربة الخزنية فقد خفض المبيد نسبة الإصابة بكلا نوعي الفطر في حبوب الذرة الصفراء مقارنة مع معاملة المقارنة .أوضح عبد الجليل(٢٠٠٤) إن لهذا المستحضر كفاءة تثبيطية عالية ضد الفطر الممرض *Pythium aphanidermatum*(Edson)Fitz على الوسط الزرعي ،وخفض أعداد الحوافض البوغية للفطر . وأكدت دراسة أخرى قدرة مستحضر الفلوراميل في تثبيط نمو الفطر الممرض *Pythium aphanidermatum* في الوسط الزرعي (PDA) أما بالنسبة للتجربة البايلوجية فقد سيطر هذا المستحضر على إصابة محصول الحنطة بهذا الفطر (جبر ،٢٠٠٤).

تعود القابلية التثبيطية لهذا المستحضر الحيوي إلى المواد الفعالة الداخلة في تكوينه التي تشمل البكتريا *P.fluorescens* وكاربونات الكالسيوم ($CaCO_3$)الداخلة في تركيب هذا المستحضر ،فقد إستعمل (Casino *et al* .,1984)كبريتات الكالسيوم ($CaCo_3$) وكبريتات المغنيسيوم ($MgSO_4$) في مقاومة الفطريات الممرضة *Fusarium* spp و*Rizoctonia* spp و *Pythium* spp التي تصيب نبات الفول السوداني .

أوضح Biggs *et al* (1997) تأثير الكالسيوم المثبط لنمو الفطر *Monilinia fructicola* المنتج لإنزيم (Polygalacturonase) الذي يصيب ثمار الخوخ على وسط (PDA) في حين أشار كل من

Duffy and Defago (1997)إلى إن الكالسيوم يؤثر في زيادة جهازية العناصر الغذائية للنبات العائل وتحفيز بكتريا *P.fluorescens* لإنتاج المضادات الحيوية وهذا ما أكده كل من Girija and Kumar (2005) بأن بكتريا *P.fluorescens* تعمل على تحفيز المقاومة الجهازية للنبات.

ذكرقاسم (١٩٩٨)إن إضافة مادة كاربونات الكالسيوم إلى الوسط الزرعي بتركيز ٢٠% ثبط نمو الفطر *A.flavus* بنسبة ٣٨,٥% . في حين أشار الفهد (١٩٩٩)إن إستعمال مادة كاربونات الكالسيوم بشكل مفرد أو متداخل مع البكتريا *P.fluorescens* أدى إلى تقليل نسبة الإصابة بالفايروس Tomato yellow leaf curl virus .

المواد وطرائق العمل

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة القادسية ومختبرات قسم التحليلات المرضية / كلية العلوم الطبية التطبيقية /جامعة كربلاء.

١.٣:الاجهزة والمواد المستخدمة في الدراسة:

١.١.٣:الأجهزة Equipments

الجدول (١,٣) الأجهزة المستخدمة في الدراسة مع أسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

ت	أسم المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
١	موصدة Autoclave	Gallen Kaamp	England
٢	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	Olympus	Japan
٣	جهاز تقطيرDistiller	Fisons	Japan
٤	ثلاجة Refrigerator	Concord	Lebanon
٥	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	Gallen Kaamp	England
٦	حمام مائي Water bath	Memmert	Germany
٧	أنابيب اختبارTest tubes	Superestar	India
٨	محاقن Disposable Syringes	Superestar	India
٩	شرائح زجاجية وغطاء الشريحة Slides and cover slides	Superestar	India
١٠	جهاز ترحيل كهربائي Gel Electrophorsis	Shndon,scientific	England
١١	مازج Vortex	Shndon,scientific	CYAN
١٢	جهاز الدوران الحراري PCR Thermocycler	Bioneer	Korea
١٣	Exispin vortex centrifuge	Bioneer	Korea

١٤	باعث الاشعة فوق البنفسجية Ultra violet	Bioneer	Korea
١٥	كاميرا رقمية Degetal camera	Sony	Japan
١٦	جهاز نبذ مركزي مبردCooling Centrifuge	Eppendorf	Germany
١٧	الناقل الزرعي القياسي Standard wire loop (1m)	Himedi	India
١٨	أطباق بتري Petri dishes	Sailbran	China
١٩	Micropipette 0.5-10µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	CYAN	China
٢٠	أدوات تشريح Anatomy tools	A.N.D	Japan
٢١	أنابيب اختبار Test tubes	Superestar	India
٢٢	ألواح TLC	Unisonics	England
٢٣	خلاط كهربائي Warring blender	National	Japan
٢٤	فرن كهربائي Electric oven	Memmert	Germany
٢٥	المشراح الدوار Rotary microtome	R.Tunge	Heidelberg
٢٦	كابينة الزرع المجهري Laminar flow cabinate	Philips	Netherlands
٢٧	حاضنة Incubator	Memmert	Germany
٢٨	جهاز فحص نقاوة DNA Nanodrop spectrophotometer	Bioneer	Korea
٢٩	أوراق ترشيحFilter paper	Whatman4	England
٣٠	أنابيب شعريةCapillary tube	Superestar	India

٢,١,٣ :المواد

جدول (٢,٣) المواد الكيمياوية والأوساط الغذائية والمضاد والمستحضر الحيوي والنباتات والعدد المستخدمة في الدراسة:

المواد الكيمياوية			
ت	أسم المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
١	هايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorite	الفرات	Iraq
٢	كلوروفورم Chloroform	BDH	England
٣	كحول أثيلي Ethanol alcohol	BDH	England
٤	صبغة الهيماتوكسلين Haematoxylin stain	Reidle	Germany
٥	صبغة الآيوسين Eosin stain	Reidle	Germany
٦	فورمالين Formalin	BDH	England
7	الزايلين	Fluka	Switzerland
٨	شمع البرافين المنصهر Paraffin wax	Fluka	Switzerland
٩	أيثانول مطلقAbsolute ethanol	Fluka	Switzerland
١٠	شب البوتاس	BDH	England
١١	أوكسيد الزئبقيك	BDH	England
١٢	حامض الخليك الثلجي	Fluka	Switzerland

١٣	كاربونات الكالسيوم	معمل نورة كربلاء	Iraq
١٤	هلام الأكاروز Agarose Gel	Biobasic	Canada
١٥	ايثيديوم بروماید Ethidium bromid	Biobasic	Canada
١٦	TBE buffer	Biobasic	Canada
١٧	اللادر Ladder	Bioneer	Korea
١٨	أنــزيم البروتنيــز Protinase K enzyme	Bioneer	Korea
١٩	Disodium ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)	Bioneer	Korea
٢٠	Free nuclease water	Bioneer	Korea
٢١	ميثانول Methanol alcohol	BDH	England
٢٢	داي مثيــل سلفوكســيد Dimethyl sulfoxide	BDH	England
٢٣	السم القياسي Stander ochratoxin A	promega	America

الأوساط الزرعية		
أسم الوسط	الأستخدام	الشركة المصنعة
وسط أكار البطاطا والديكستروز(PDA) Potato's Dextrose Agar	عزل و حفظ الفطريات و فحص حساسية الفطر*A.niger* للمعاملات الحيوية والكيمياوية وحساب نسب الأصابة لبذور الحنطة والذرة الصفراء.	Hi Media laboratories Limited (India)
وسط Nutrient Agar	تقدير أعداد البكتريا *P. fluorescens*	Hi Media laboratories Limited (India)

المضاد والمستحضر الحيوي المستخدم		
الأسم العربي	الأسم الأنكليزي	الشركة المصنعة
الكلورامفينيكول	Cloramphenicol	Ajanta Pharma Limited
الفلوراميل	Floramil	حضرمختبريا

النباتات المستخدمة		
الأسم العربي	الأسم العلمي	العائلة
الحنطة	*Triticum aestivum*	Gramineae
الذرة الصفراء	*Zea mays*	Poaceae

العدد			
ت	اسم العدة	مكوناتة	الشركة وبلد المنشأ
١	عدة استخلاص الحامض النووي الفطري EZ-10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	EZ-10 Column 50	Biobasic Canada
		2.0 ml Collection Tube 50	
		Universal Digestion Buffer 12 ml	
		Universal Buffer PF 6 ml	
		Universal Buffer BD 12 ml	
		Universal PW Solution (concentrate) 18 ml	
		Universal Wash Solution (concentrate) 7.5 ml	
		TE Buffer 10 ml	
		Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml	
٢	عدة فحص Accupower ® PCR PerMIX	Taq DNA polymerase	Bioneer (Korea)
		dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	
		Tris-HCl (pH 9.0), KCl, $MgCl_2$	
		Stabilizer and tracking dye	

3.1.٣:البادئات Primers

أُستعملت نوعين من البادئات الاول (18S rRNA gene ITS region) الخاص بتشخيص الفطر *Aspergillus niger* أما البادئ الثاني (A-136 ochratoxin *PKS* gene) الخاص بالتحري عن الجين المسؤول عن أنتاج سم الأوكراتوكسين A حيث تم تصميم البادئات في هذه الدراسة من موقع بنك الجينات NCBI Genbank وبأستعمال برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص PCR وقد تم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية .

جدول (٣,٣) :البادئات المستخدمة في الدراسة.

البادئات			
Primer	**Sequence(5'-3')**		**Amplicon**
18 S Rrna gene ITS region	**F**	**TTGTACCCTGTTGCTTCGGC**	**503bp**
	R	**TTCAGCGGGTATCCCTACCT**	
A – 136 rRNA ochratoxin *PKS* gene	**F**	**CCCAGTTCGGTTTTGCACTG**	**307bp**
	R	**GCCCGTCAGTAACATGGGAA**	

F :البادئ الأمامي **R :البادئ العكسي**

2.3: الحيوانات المختبرية Laboratory animals

أستعملت ذكور الجرذ الابيض *(Rattus rates)* يتراوح عمرها بين (١٠-١٢)اسبوعا ، وتراوحت أوزانها بين (١٥٠-٢٠٠) غم تم الحصول عليها من كلية الطب البيطري /جامعة القادسية ،وضعت في أقفاص لدائنية بهيئة مجموعات ، تم تهيئة الظروف الملائمة لها من التهوية والإضاءة والتغذية والمدى الحراري المثالي الذي تراوح من (٢٣- ٣٠) مْ .

3.٣: المستحضر الحيوي وسم الأوكراتوكسين Aالقياسي :

أستعمل المستحضر الحيوي الفلوراميل وسم الأوكراتوكسينAالقياسي والذي تم الحصول عليهما من الأستاذ الدكتور سامي الجميلي /جامعة كربلاء . أستعمل المستحضر الحيوي كعامل حياتي في السيطرة على الفطر *A. niger* الذي يصيب حبوب الأعلاف أثناء فترة الخزن.

٤,٣:طرائق العمل..

١,٤,٣:جمع العينات:

جمعت الأعلاف (الحنطة والذرة الصفراء) من مناطق متفرقة (مخازن الأعلاف والأسواق المحلية)في مدينة الديوانية وبواقع ١كغم لكل عينة ، وضعت العينات في أكياس ورقية معقمة وعلمت وجلبت للمختبر.

٢,٤,٣:الأوساط الزرعية والمحاليل :

١,٢,٤,٣:تحضير الأوساط الزرعية :

١- وسط أكار البطاطا ديكستروز(Potatos Dextrose Agar (PDA :

حضر هذا الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة بأذابة ٣٩غم منه في ١٠٠٠مل من الماء المقطر في دورق زجاجي ،ضبط الأس الهيدروجيني عند PH=٦,٨،بعدها عقم الوسط بالموصدة (Autoclave) وبدرجة حرارة ١٢١مْ وبضغط ١جو لمدة ٢٠ دقيقة وبعد تبريد الوسط أضيف المضاد الحيوي الكلورامفينيكول (Chloramphenicol) لغرض منع النمو البكتيري وبتركيز ٢٥٠ملغم /لتر (Collee *et al* .,1996).أستعمل هذا الوسط لغرض عزل وحفظ الفطريات .

٢- وسط Nutrient Agar

حضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة (20 غم/لتر). أستعمل هذا الوسط في تقدير أعداد البكتريا المستعملة في الدراسة.

٥,٣: لمحاليل والصبغات المستخدمة:

١.محلول الفصل لصفائح الكروموتوغرافي

حضر هذا المحلول بأستعمال (كلوروفورم:ميثانول)(٩٨ :٢)وأستخدم لفصل بقع السموم على صفائح الكروموتوغرافي (TLC) (الجميلي ،١٩٩٦) .

٢.محلول صبغة اللاكتوفينول الزرقاء Lactophenol blue Solution

تم تحضير هذا المحلول طبقا لما ورد في (Ellis,1994) من المواد الآتية :

- فينول ٢٠ غم .
- كليسرول ٤٠ مل .
- حامض اللاكتيك ٢٠ مل .

تم أذابة مادة الفينول البلوري بالماء المقطر المعقم مع الأستعانة بالحرارة قبل أضافتها إلى الكليسرول وحامض اللاكتيك، بعدها تم أذابة المكونات السابقة في ٢٠ مل من الماء المقطر المعقم ، بعدها تم أضافة ٣ قطرات من صبغة أزرق القطن،وحفظ المحلول في قنينة معتمة ، أستعمل هذا المحلول لغرض تصبيغ الفطريات أثناء الفحص المجهري .

٣. محلول درابكن Drabkins solution

حضر بأذابة ١غم من بيكاربونات الصوديوم و٠,٠٥ غم من سيانيد البوتاسيوم و٠,٢ غم من سيانيد البوتاسيوم الحديديكي في لتر من الماء المقطر ، حفظ في قنينة معتمة ،أستعمل هذا المحلول في حساب تركيز الهيموغلوبين(Brown,1976).

٤. محلول ترك Turke's solution

حضر بمزج ٢مل من حامض الخليك مع ٩٨ مل من الماء المقطر بعدها تم أضافة قطرة واحدة من محلول أزرق المثلين (Methyline blue) كدليل لوني ، حفظ في قنينة معتمة ،أستعمل هذا المحلول في التعداد الكلي لكريات الدم البيض .(سود،١٩٩٢).

٥. محلول البومين ماير Meyer's albumin

حضر بمزج ٥٠ مل من زلال البيض مع ٥٠ مل من الكليسرين مع ١غم من سلسيلات الصوديوم لمنع نمو الفطريات ، رشح الخليط بأستعمال قطعة شاش نظيفة ، أستعمل هذا المحلول في تثبيت المقاطع النسجية (المختار واخرون ،١٩٨٢).

٦. صبغة أزرق القطن Cotton blue solution:

تم تحضير هذا المحلول طبقا لما ورد في (Ellis,1994) من المواد الآتية :

- أزرق القطن ٠,٣ غم .
- كحول أثيلي (٩٦%) ٣٠ مل (خفف الى ١٠٠ مل مع الماء المقطر المعقم).

حيث تم إذابة المكونات السابقة ومزجت جيدا وحفظت الصبغة في قنينة لحين إستعمالها .

٧. صبغة الهيماتوكسيلين هارس Harris-Haematoxylin stain

حضرت بحسب طريقة (Bancroft and Stevens (1982 من المواد التالية وكما يلي: إذيب 1غم مسحوق الصبغة الهيموتوكلسين في 10مل من كحول الايثانول المطلق ثم اضيف اليه 20غم من شب البوتاس المذاب مسبقاً في الماء الحار، سخن المزيج إلى درجة حرارة 60 م° ثم اضيف اليه0.5غم من أوكسيد الزئبقيك إلى أن أكتسب اللون الأرجواني الغامق، ثم برد المحلول تحت ماء الحنفية وأضيف إليه 8 مل من حامض الخليك الثلجي،ثم رشح المحلول قبل الأستعمال،وأستعملت هذه الصبغة في المقاطع النسجية (Bancroft and Stevens,1982).

٨. صبغة الأيوسين Eosin stain

حضرت حسب طريقة (Bancroft and Stevens,1982) بإذابة 10غم من مسحوق الأيوسين في لتر من الماء المقطر، وأستعملت الصبغة في صبغ المقاطع النسجية أيضاً.

٦,٣: عزل الفطريات المرافقة للأعلاف :

عزلت الفطريات المرافقة لبذور الحنطة والذرة الصفراء المستعملة في في هذا البحث كالاتي : قسمت البذور إلى مجموعتين ،الأولى عقمت سطحيا بأستعمال محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ٢%لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بالماء المقطرالمعقم ثلاث مرات ،أما المجموعة الثانية غسلت بالماء المقطر المعقم فقط ، ثم زرعت البذور في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي (PDA) وبواقع خمس بذور في كلّ طبق وبثلاثة مكررات لكلّ مجموعة ووضعت الأطباق في بالحاضنة بدرجة حرارة ٢٥مْ ولمدة سبعة أيام

(ميخائيل وبيدر ،١٩٨٢) ثم فحصت الاطباق لمعرفة الفطريات النامية وتم حساب النسبة المئوية لتردد الفطركالآتي:

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر}}{\text{عدد العزلات الكلية}} \times 100$$

٧,٣:تشخيص الفطريات المعزولة :

١,٧,٣:التشخيص بأستعمال المفاتيح التصنيفية :

تم تشخيص الفطريات المعزولة من بذور الحنطة والذرة الصفراء إلى مستوى النوع بالأعتماد على المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features of coloney) مثل الشكل واللون وقطر المستعمرة وارتفاعها وايضا بالأعتماد على الصفات المجهرية (Microscopic features) مثل شكل وحجم ولون وتركيب الحوامل والأبواغ والتراكيب الأخرى على وفق الأسس التصنيفية الواردة في المصادر (Barnett and Hunter,1972;Moustafa,1982;Watanabe,2002;Domsch *et al*., 1980;Leslie and Summerell,2006;Ellis *et al*.,2007)

٢,٧,٣:طريقة التشخيص بأستعمال تفاعل السلسلة المتبلمر (PCR) :

تم أجراء فحص PCR للتحري عن الفطر*A.niger* و بأستعمال البادئ الخاص بتشخيص الفطر المذكور،ويتكون الفحص من عدة خطوات:

١,٢,٧,٣:أستخلاص االحامض النووي DNA extraction :

أستخلص الحامض النووي DNA من عينات مستعمرات الفطرالمختبر بأستخدام عدة (EZ- 10 Spin Column Fungal Genomic DNA Mini – Preps Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية ،تم أجراءالأستخلاص حسب تعليمات الشركة كالاتي:

١- تم تنشيط الفطرالمختبر على الوسط الزرعي الصلب (PDA)،ثم تم نقل ٢٠٠ ملغم من مستعمرات النمو الفطري إلى حاوية خزفية معقمة وعوملت بالنتروجين السائل ذو درجة حرارة ١٦٩٠ C– تحت الصفر، وسحقت المستعمرات الفطرية بواسطة مطرقة خاصة وذلك لتحطيم الجدار الخلوي لخلايا الفطر والحصول على الحامض النووي بسهولة ومن ثم نقلت إلى أنابيب معقمة سعة ١,٥ ml.

٢- أضـيفت µl ١٨٠ مـن محلـول(Universal Dgestion Buffer) و µl ٢٠ مـن أنـزيم Proteinase K إلى كل عينة ثم مزجت جيدا بواسطة جهاز المازج ثم حضنت العينـات بدرجـة حرارة ٥٦°C لمدة ٣٠ دقيقة .

٣- تـم أضـافة µl ١٠٠ مـن محلـول Universal Buffer PF ومـزج بواسـطة قلـب الأنابيـب ثـم حضنت بدرجة حرارة ٢٠°C – لمدة ٣٠ دقيقة .

٤- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة rpm ١٠٠٠٠ لمدة ٥ دقائق بدرجـة حـرارة الغرفة ونقل الطافي والذي يحتوي على الاحماض النووية إلى أنبوبة جديدة سعة ml ١,٥.

٥- تم أضـافة µl ١٠٠ محلول Universal Buffer BD ومزجت جيدا بواسطة المـازج ، ثم تم التخلص من الراسب والحاوي على بقايا من حطام الخلايا والأنزيمات.

٦- تم أضافة µl ٢٠٠ من الكحول الأثيلي المطلق ٩٦% Absolute ethanol إلـى جميـع العينـات ومزجت جيدا بواسطة المازج.

٧- تـم نقـل المـزيج إلـى أنابيـب خاصـة تحتـوي علـى فلتـر أسـتخلاص الحـامض النـووي المجهـزة مع العدة (EZ-10 column)موضوعة داخل أنابيب جامعة سعة (٢ml tube collection) ومن ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة rpm ١٢٠٠٠ لمدة دقيقة واحدة ومن ثم تم التخلص من الراسب ونقل أنبوبـة الترشيح الحاويـة علـى الحـامض النـووي إلـى أنبوبـة أختبـار أخرى.

٨- تم اضافة µl 500 من محلول Universal PW Solution ومن ثم وضعت الانابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000rpm لمدة دقيقة ومن ثم تم التخلص من الراسب.

٩- تـم أضـافة µl ٥٠٠ من محلـول (Universal Wash Solution) ثـم وضـعت الأنابيـب فـي جهـاز الطـرد المركـزي بسـرعة rpm ١٢٠٠٠ لمـدة دقيقـة واحـدة ومـن ثـم تـم الـتخلص من الراسب .

١٠- وضعت الـ EZ- 10column الحاوية على الحامض النووي فـي أنابيـب معقمـة سعة ml ١,٥ ومن ثم وضـعت الأنابيـب فـي جهـاز الطـرد المركـزي بسرعة rpm ١٢٠٠٠ لمدة دقيقتـان لتجفيـف الـ (EZ – 10 column membrane) من الكحول ومن ثم تم التخلص من الراسب.

١١-أخيـرا تـم أضـافة µl50-100مـن محلـول الـ (TE Buffer) لأذابـة الحـامض النـووي داخـل الـ (EZ-10 filter column) ثم حضنت بدرجة حرارة الغرفـة لمدة دقيقـة واحدة ،بعدها وضـعت جميع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة rpm ١٢٠٠٠ لمدة دقيقـة لجمـع الحـامض النـووي،

بعدها نقل إلى الحفظ بدرجة حرارة ٢٠ - تحت الصفر في الثلاجة لحين الأستعمال في فحص الـ PCR .

٢,٢,٧,٣:فحص الحامض النووي المستخلص DNA profile

تم تقدير كمية الحامض النووي الـ DNA وذلك بإستخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer والذي يستخدم لقياس تركيز الأحماض النووية DNA and (RNA) حيث يتم تحديد تركيز الحامض النووي(ng\µl) DNA وقياس نقاوته من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين(260-280nm) وتم استخدام الجهاز كما يلي :

١- بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحامض النووي نوع DNA .
٢- تم تصفير ركيزة المقياس مرتين بأستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع ١µl من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفيرثم نقوم بتنظيف الركيزة لقياس العينات.
٣- تم قياس تركيز الـ DNA وذلك باستخدام ١ µl من كل عينة من الـ DNA المستخلص ومن ثم نقوم بتنظيف ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.
٤- تم تحديد نقاوة عينات الـ DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحامض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

٣,٢,٧,٣: تحضير مزيج PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل PCR بأستخدام عدة الـ (Accupower ® PCR PerMIX) المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة كما في الجدول(٤,٣) :

جدول (٤,٣): تعليمات شركة Bioneer الكورية بأستعمال عدة (Accupower ® PCR PerMIX)

PCR master mix	Volume
DNA template	٥ µL
Forward primer (10pmol)	1.5µL

Reverse primer (10pmol)	**1.5µL**
Free nucleas water	**12 µL**
Total	**20 µL**

وضعت مكونات مزيج تفاعل PCR التي ذكرت في الجدول اعلاه في أنابيب حجم 0.2ml خاصة بعدة فحص PCR (Accupower ® PCR Premix) والحاوي على بقية مكونات تفاعل PCR ، ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) Vortex centrifuge بسرعة rpm ٣٠٠٠ لمدة ثلاثة دقائق ثم وضعت في جهاز PCR Thermocycler .

٤,٢,٧,٣:حالات الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions :

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره بأستعمال جهاز PCR Thermocycler وبحسب كلّ جين كما في الجدول (٥,٣) :

جدول (٥,٣) : الظروف المختبرية في تجربة PCR

PCR Step	Repeat cycle	Temperature	Time
Initial denaturation	**1**	**95C**	**5min**
Denaturation	**30**	**95C**	**5sec.**
Annealing		**58C**	**30sec**
Extension		**72C**	**1 min**
Final extension	**1**	**72C**	**5min**

Hold	-	4C	Forever

٥,٢,٧,٣:تحليل نتائج فحص الـ PCR

١,٥,٢,٧,٣:الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis :

تم اجراء الترحيل الكهربائي Agrose gel electrophorsis بأستعمال هلام الاكاروز بنسبة ١% وكذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis كما يأتي:

١- أتبعت طريقة (Sambrook and Russel,2001) لغرض تحضير هلام الأكاروز ، تم اذابة١غم من هلام الاكاروز(Agarose gel) في 90ml مل من الماء المقطر المعقم و10ml من محلول (10X TBE buffer) وسخن المزيج بأستعمال جهاز Microwave لمدة ٥ دقائق.

٢- ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة ٥٠مْ وبعدها تم إضافة ٣µlمن صبغة الحامض النووي المشعة (Ethidium bromide) ومزجت جيدا مع الهلام .

٣- تم صب هلام الاكاروز في قالب الترحيل Tray الحاوي على المشط (Comb) لتحديد اماكن عيناتPCR، وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة ١٥ دقيقة ومن ثم ازيل المشط من الهلام بعناية.

٤- تمت عملية تحميل عينات ناتج الفحص PCR product ووضعت في حفر الهلام.

٥- تم استعمال سلم القياس 100 DNA ladder لقياس ناتج PCR product ووضع في الحفرة الاولى.

٦- بعد اكتمال عملية التحميل تم غمر هلام الاكاروز بأستعمال محلول TBE Buffer الدارئ بتركيز 1X وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل بأستعمال تيار ١٠٠فولت وامبير٨٠ لمدة ساعة واحده.

٧- بعد أنتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على ناتج PCR بأستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V light source لتحديد الناتج مع وحدة القياس.بعدها تم تصوير الناتج بأستعمال كاميرا رقمية لملاحظة حزم DNA التي ظهرت بشكل حزم براقة برتقالية اللون.

٨,٣:حفظ عزلات الفطر*A.niger*

تم تنقية عزلات الفطرعلى الوسط الغذائي (PDA) وحفظت العزلات النقية بزراعتها على الوسط الغذائي نفسه بصورة مائلة في أنابيب أختبار حجم ٢٠ مل وحضنت لمدة أسبوع بدرجة حرارة ٢٥مْ بعدها حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة ٤ مْ لحين الاستعمال (ديوان ويحيى ،١٩٨٤).

٩,٣:اختبار قابلية عزلات الفطر *A. niger* على إنتاج سم الاوكراتوكسين A

١,٩,٣:تنمية عزلات الفطر *A.niger*

تم تهيئة أطباق حاوية على وسط (PDA) معقمة ثم زرعت فيها أقراص من عزلات الفطر المعزول وبمعدل قطر ٥ ملم وبواقع ثلاث مكررات لكلّ عزلة وضعت هذه الأقراص في مراكز الأطباق بعدها حضنت بدرجة حرارة ٣٠ مْ ولمدة عشرة أيام .

٢,٩,٣:أستخلاص سم الأوكراتوكسين A

استخلص سم الأوكراتوكسين A وفقا لطريقة(Mac Donald وآخرون، ١٩٩٩) حيث تم أختيار طبق من كل عزلة منمى عليها الفطر *A.niger* ثم قطع الوسط الزرعي إلى أربعة قطع بواسطة أبرة معقمة على شكل (+)،بعدها نقلت القطع الأربعة إلى خلاط كهربائي زجاجي (Blander) يحتوي على ٢٠ مل كلوروفورم ،وتم مزج الخليط لمدة ١٠ دقائق بعدها نقل المزيج إلى بيكر معقم وترك لمدة ٢٤ساعة،بعد أنتهاء المدة رشح المزيج عبر قطعة من الشاش ثم رشح مرة أخرى عبر ورق ترشيح (What man4) في بيكر حجم ١٠ مل ،ثم وضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة ٤٥مْ لحين جفاف المزيج .

٣,٩,٣:الكشف عن سم الأوكراتوكسين A

نفذت هذه التجربة في مختبر السموم في كلية العلوم الطبية التطبيقية/ جامعة كربلاء ،حيث أستعملت تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromotography للكشف عن عزلات الفطر *A.niger* القادرة على انتاج سم الأوكراتوكسين A وذلك بأخذ صفائح ذات أبعاد (٢٠×٢٠) سم حيث نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة ١٢٠ **مْ** لمدة ساعة قبل الأستعمال (الجميلي ،١٩٩٦) وأستعمل نظام الفصل (كلوروفورم:ميثانول)(٩٨ :٢)،حيث تم عمل خط مستقيم خفيف على صفيحة (TLC) يبعد مسافة ١,٥ سم من قاعدة الصفيحة السفلية ثم أخذ ١٥ مايكروليتر من

السم القياسي (OTA) بواسطة انبوبة شعرية Capillary tube وضعت على الخط من الجهة اليسرى وتم وضع الكمية نفسها من كلّ عزلة على يمين السم القياسي وبمسافة ٢سم بين عينة وأخرى ،وبعد ذلك تترك البقع لكي تجف ثم توضع الصفائح في حوض الفصل الحاوي على مزيج الكلوروفورم والميثانول وتمت مراقبة هذه الصفائح لحين وصول الطور المتحرك إلى مسافة تقارب ٢ سم من النهاية العليا للصفيحة ،أخرجت بعد ذلك الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي ٣٦٥ نانوميتر وبذلك تم الكشف عن وجود الأوكراتوكسين A بمطابقة موقع و لون التألق للمستخلصات قيد الدراسة مع موقع و لون سم الأوكراتوكسين A القياسي (OTA) (Sobolev and Dorner,2002).

١٠,٣:الكشف عن الجين المنتج لسم الأوكراتوكسين A للفطر *A.niger*

تم أجراء فحص الـ PCR بأتباع الخطوات نفسها الواردة في الفقرة (١,٢,٧,٣) مع أستعمال البادىء (A-136Ochratoxin *PKS*gene) للتحري عن الجين المسؤول عن أنتاج الأوكراتوكسين A .

١١,٣:تأثير المعاملات الحيوية والكيمياوية في عزلة الفطر *A.niger* المنتجة لسم الأوكراتوكسين A

١,١١,٣:أختبار كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

حضر الوسط الغذائي PDA المعقم في٥ دوارق سعة كلّ منهما ٢٥٠مل كل منهاحاوية على ٢٠٠ مل من وسط PDA ،عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة ١٢١مْ وضغط ١ جو لمدة 20 دقيقة ، وبعد إنخفاض درجة الحرارة إلى ما قبل تصلب الوسط الزرعي أضيفت التراكيز(١،٥، ٠,٢ ، ٣)غم /لترمن المستحضر الحيوي الفلوراميل أما الدورق الخامس فترك من دون أضافة بوصفه معاملة سيطرة ،ثم رجت الدوارق الحاوية على الوسط الزرعي والفلوراميل، بعدها صبت محتويات كل دورق في ثلاث أطباق بتري معقمة وكذلك معاملة السيطرة .حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٠ مْ ولمدة ٤٨ ساعة ،ثم لقحت الأطباق بالفطر بقرص قطره ٥ ملم من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* منمى على وسط PDA بعمر سبعة أيام وضع في مركزالطبق وحضنت الأطباق جميعها بدرجة (٣٠) مْ ولمدة ٧أيام . بعدها تم حساب مقدارالتثبيط للنمو الشعاعي بأخذ معدل قطرين متعامدين وبتطبيق معادلة (Abott , 1925) الواردة في (شعبان والملاح ،١٩٩٣)

R1- R2

النسبة المئوية للتثبيط = ——————— ×100

R1

حيث أن :

R1= أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر (معاملة السيطرة)

R2= أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر في الأطباق الحاوية على المستحضر الحيوي.

٢,١١,٣:أختبار كفاءة كاربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

لتحديد فاعلية كاربونات الكالسيوم المختبرة في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger* أتبعت طريقة Dixit *et al* .,(1976) وهي تقنية الغذاء المسموم Poisoned Food Technique إذ تم تحضير أربعة تراكيزمن ملح كاربونات الكالسيوم وهي (٣٠،٢٠،١٠،٥) ملغم /مل في الوسط الزرعي المعقم PDAمع أضافة المضاد الحيوي الكلورامفينيكول بتركيز ٢٥٠ ملغم /لتر ثم بعد ذلك صب الوسط الزرعي في الأطباق ، أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية فقط على الوسط الزرعي المعقم (PDA) من دون أي إضافة ،وبعد تصلب الوسط الزرعي في الأطباق لقحت الأطباق بأقراص قطرها ٥ ملم من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* منمى على وسط PDA بعمر سبعة أيام وضع في مركز الطبق وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥مْ ولمدة ٧ أيام بعدها تم حساب النسبة المئوية للتثبيط كما ورد في الفقرة (١,١١,٣).

٣,١١,٣:التجربة الخزنية:

١,٣,١١,٣:أختبار كفاءة المعاملات الحيوية والكيميائية في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A.niger* أثناء فترة الخزن :

نفذت هذه التجربة خلال الفترة ما بين ٢٠١٦/٣/٢٧ الى ٢٠١٦/٤/٢٧ في مختبرات قسم علوم الحياة - كلية العلوم - جامعة القادسية ، تضمنت الدراسة ٦ معاملات وبثلاث مكررات حيث تم تهيئة ١٨ كغم من الأعلاف (الحنطة والذرة الصفراء) ، وطبقت عليها المعاملات الآتية :

١- معاملة (أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger*):

وضع ١ كغم من الأعلاف (حنطة – ذرة صفراء) في كيس نايلون نظيف ، لوثت بلقاح من المزرعة السائلة للفطر *A.niger* ٦٠ مل /كغم بذور ورج الكيس لعدة مرات لغرض توزيع الفطرعلى أسطح الحبوب ، كررت العملية ثلاث مرات (ثلاث مكررات) لكلّ معاملة، بعدها وضعت

حبوب كلّ معاملة في عبوات من البولي فنايل كلورايد (P.V.C) (Poly vinyl chloride) . ١ كغم / عبوة .

٢- معاملة (أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* + المستحضر الحيوي الفلوراميل):

لوثت الأعلاف بنفس الأسلوب الوارد في الفقرة(١) بعدها مباشرة أضيف الفلوراميل وبكمية ٤ غم / كغم بذور.

٣- معاملة (أعلاف ملوثة بلقاح الفطر + كاربونات الكالسيوم):

نفذت بالأسلوب نفسه الوارد في الفقرة (٢) مع أستبدال الفلوراميل بكاربونات الكالسيوم وبكمية ٣٠ غم /كغم بذور.

٤- معاملة التداخل (أعلاف ملوثة بلقاح الفطر +الفلوراميل + كاربونات الكالسيوم):

نفذت بالخطوات نفسها الواردة في الفقرة (٢) مع أضافة الفلوراميل ٢ غم / كغم بذور وكاربونات الكالسيوم ١٥ غم / كغم بذور .

٥- معاملة (أعلاف غير ملوثة بلقاح الفطر + كاربونات الكالسيوم):

عوملت الأعلاف الغير ملوثة بلقاح الفطر بكاربونات الكالسيوم ٣٠ غم / كغم بذور.

٦- معاملة السيطرة :

أعلاف غير ملوثة بلقاح الفطر وغير معاملة بالفلوراميل أو كاربونات الكالسيوم (محسن ،٢٠٠٦)، أعقب ذلك خزن الأكياس تحت ظروف المختبروبذلك تكون المعاملات المستعملة في التجربة كالآتي:

ت	رمز المعاملات	التوصيف
1	A.N	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* فقط
٢	F+A.N	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بالفلوراميل ٤ غم/ كغم حبوب.
٣	CaCo3 +A.N	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* معاملة بكاربونات الكالسيوم ٣٠ غم / كغم حبوب.
٤	F+A.N+CaCo3	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *Aniger* معاملة بالمستحضر الحيوي ٢ غم / كغم +كاربونات الكالسيوم ١٥ غم / كغم حبوب.
٥	CaCo3	أعلاف معاملة بكاربونات الكالسيوم فقط ٣٠ غم /كغم بذور.
٦	Control	أعلاف غير ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* وغير معاملة بالمستحضر الحيوي أو كاربونات الكالسيوم.

A.N =الفطر *A.niger*

F =الفلوراميل

وبعد مرور ١٥ و٣٠ يوم من خزن الأعلاف تم تقدير أعداد البكتريا في الأعلاف وحساب نسب أصابة الحبوب بالفطر المختبر.

٢,٣,١١,٣:تقدير أعداد البكتريا في الغرام الواحد من الأعلاف :

أخذت عينات من الأعلاف المخزنة مقدارها١غم عشوائيا من كل مكرر من مكررات كل معاملة عوملت بالمستحضر الحيوي وبالتركيز المستعمل وكلا على حدة ثم وضع هذا الوزن (١غم) من الأعلاف في أنبوبة اختبارزجاجية معقمة بحجم ٢٠مل حاوية على ٩ مل ماء مقطر معقم ،رجت محتويات كل أنبوبة جيدا وأخذ منها ١مل وأضيف إلى أنبوبة اختبار أخرى حاوية على الكمية نفسها من الماء المقطر المعقم وهكذا تم عمل سلسلة تخافيف عشريةحتى 10^{-12} تحت ظروف التعقيم التام مع أستعمال ماصة نظيفة معقمة لكل تخفيف على أنفراد، نقل ١مل من كل تخفيف من التخافيف $١٠^{-١٠}$ و$١٠^{-١١}$ و$١٠^{-١٢}$ إلى أطباق زجاجية معقمة قطرها ٩سم حاوية على الوسط الزرعي nutrient agar وبثلاث مكررات لكل تخفيف ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة ٣٥ مْ لمدة ٢٤ ساعة الواردة في (حميد،٢٠٠١).أختبرت الأطباق الحاوية على عدد مستعمرات تتراوح بين (٣٠ و٣٠٠)مستعمرة بكتيرية ومن ثم طبقت معادلة Clark (١٩٦٥) لحساب أعداد البكتريا .

عددخلايا البكتريا /غم = معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

٣,٣,١١,٣:حساب نسبة الإصابة بالفطر *A. niger* في الأعلاف :

أخذت ٢٠ غم من حبوب كلّ مكررولكلّ معاملة بصورة عشوائية وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ٢% بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ، ثم جففت الحبوب ونقلت الى أطباق بتري حاوية على وسط PDA بمعدل ٥ حبوب /طبق وبثلاث مكررات لكلّ معاملة ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥مْ لمدة أسبوع بعدها تم حساب نسبة الحبوب المصابة بحسب طريقة (ميخائيل وبيدر، ١٩٨٢) .

$$\text{نسبة الأصابة (\%)} = \frac{\text{عدد الحبوب المصابة}}{\text{العدد الكلي للحبوب المزروعة على الوسط الزرعي}} \times ١٠٠$$

١٢,٣:دراسة التأثيرات السمية لسم الأوكراتوكسين A داخل جسم الكائن الحي (Invivo).

١,١٢,٣:تنمية عزلة الفطر *A.niger*

علـى ضـوء نتـائج التجربةالمبينـة فـي الفقـرة (٩,٣) تـم أختيـار عزلـة واحـدة مـن العـزلات المنتجـة للأوكراتوكسين A وتم تنميتها على وسطPDA بنفس الأسلوب الوارد في الفقرة (١,٩,٣).

٢,١٢,٣:إستخلاص سم الأوكراتوكسين A

بعد أنتهاء مدة الحضن للأطباق المنمى عليها الفطر *A. niger* والبالغة مائة طبق .تم أستخلاص سم الأوكراتوكسين A منها بالطريقة نفسها المتبعة في الفقرة (٢,٩,٣).

٣,١٢,٣:تنقية وفصل سم الأوكراتوكسين A

أستعملت تقنية ألواح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC) في عملية تنقية وفصل سم الأوكراتوكسين A بأستعمال نفس نظام الفصل المستعمل في الفقرة (٣,٩,٣) أذ تم وضع عينة المستخلص الحاوي على سم الأوكراتوكسين A بهيئة شريط Streak على ألواح TLC وعلى مسافة ٢سم عن الحافة السفلية وبعد أنتهاء عملية الترحيل تم تحديد موقع تواجد السم على ألواح TLC بأستعمال شفرة نظيفة ومعقمة وبمساعدة الأشعة فوق البنفسجية ،بعدها تم قشط السليكا الحاوية على السم بواسطة شفرة حادة وجمعت السليكا في أنابيب أختبار نظيفة ومعقمة ،بعدها أضيف كمية من الكلوروفورم مساوية لكمية السليكا في أنابيب الأختبارالمعقمة ورجت الأنابيب جيدا ووضعت في جهاز الطرد المركزي وبسرعة ٦٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٠ دقائق ، بعدها اخذ الراشح (الكلوروفورم المذاب فيه السم) ووضع في بيكر زجاجي معقم وركزت العينة بوضعها في فرن كهربائي تحت درجة حرارة ٤٥ مْ حيث كررت العملية عدة مرات و تم الحصول على كمية مقدارها ١٤٠ ملغم من سم الأوكراتوكسين A ، بعدها حفظت العينة تحت درجة حرارة- ٢٠مْ لحين أستعمالها في معاملة الحيوانات المختبرية .

٤,١٢,٣:تهيئة الحيوانات المختبرية

تم تهيئة ١٢ حيوان من ذكور الجرذ الأبيض حيث قسمت إلى اربعة مجاميع كل مجموعة تضم ثلاثة جرذان،كما تمت إذابة تلك السموم بمادة الداي مثيل سلفوكسيد (DMSO) .

٥,١٢,٣:تطبيق المعاملات

المعاملات	وصف المعاملات
معاملة السيطرة	معاملة الحيوانات بالماء المقطر المعقم فقط (١مل .كغم وزن الحيوان)
سم الأوكراتوكسين A (OTA)+ المستحضرالحيوي الفلوراميل	تجريع الحيوانات بسم الأوكراتوكسين A عن طريق الفم بتركيز(٢ملغم /كغم وزن الحيوان) وبعد ٢٤ ساعة من التجريع جرعت بالمستحضر الحيوي الفلوراميل تركيز ٢ غم / كغم وزن الحيوان .
سم الأوكراتوكسين A (OTA) فقط	تجريع الحيوانات بسم الأوكراتوكسين بتركيز(٢ملغم/كغم وزن الحيوان) كل ٤٨ ساعة.
المستحضر الحيوي الفلوراميل	تجريع الحيوانات بالمستحضر الحيوي الفلوراميل تركيز(٢غم /كغم وزن الحيوان) كل ٤٨ ساعة.

وبعد أنتهاء مدة التجريع والبالغة ثلاث أسابيع تركت الحيوانات٣أيام بعدها تم تخدير الحيوانات بواسطة الكلوروفورم والتضحية بها ثم شرحت عن طريق فتحة التجويف البطني وتم سحب الدم عن طريق طعنة القلب (Heart puncture)،حيث وضع الدم المسحوب في أنابيب خاصة تحتوي على مادة الهيبارين مانع تخثر الدم لغرض حساب بعض معايير الدم الفسلجية مثل WBC , PCV , Hb ووضع القسم الآخر منه في أنابيب خاصة بالمصل تسمى Jel tube لغرض دراسة أنزيمات الكبد GPT,GOT كما تم قياس مستوى البروتين الكلي Total protein واليوريا في الدم ،كما تم أستئصال أجزاء من أعضاء الكبد والكلية والأمعاء الدقيقة الأمامية Duodenum،ومن ثم غسلت بالمحلول الفسلجي Normal Saline وحفظت هذه الأعضاء في مادة الفورمالين تركيز ١٠%وتم تهيئتها لعمل المقاطع النسجية.

١٣,٣:فحوصات الدم الفسيولوجية

١,١٣,٣:حساب تركيز الهيموكلوبين (Hb)

وضع ٥ ml من محلول درابكن في أنبوبة إختبار نظيفة وأضيف اليها ٠,٠٢ ml من الدم المسحوب ورجت الأنبوبة جيدا ثم تركت مدة ١٠ دقائق بعدها تم تصفير مقياس الهيموغلوبين (Hemoglobin meter) بالماء المقطر ، ثم وضع الأنبوب في الجهاز وتمت القراءة بوحدات غم /١٠٠ مل بطول موجي ٥٤٠ نانوميتر(سود،١٩٩٢).

٢,١٣,٣:حساب حجم الكريات المضغوطة (PCV)

جمعت كمية من الدم في أنبوبة شعرية عن طريق الخاصية الشعرية (Capillarity) مع ترك ١٥ ملم تقريبا من الأنبوبة فارغ ثم أغلقت احدى نهايتها بالطين الصناعي ووضعت في جهاز الطرد المركزي الدقيق بسرعة ٣٠٠٠ دورة /دقيقة مدة ٥ دقائق ، ثم قرأت النسبة المئوية لحجم الكريات المضغوطة PCV % بواسطة المسطرة المدرجة (Hematocrit reader). (Brown ,1976).

٣,١٣,٣:حساب العدد الكلي لكريات الدم البيضاء (WBCs)

وضع ٠,٤ ml من محلول الترك في أنبوبة إختبار نظيفة ووضع فيها ٠,٠٢ ml من الدم المسحوب بواسطة جهازسالي ، ورج المزيج جيدا ، بعد ان تم التخلص من القطرات الأولى نقلت قطرة منه إلى عداد الخلايا (Haemocytometer) ، ثم وضع غطاء الشريحة عليه وترك ليستقر لمدة دقيقتين وفحصت تحت قوة التكبير (٤٠ X)،بعدها تم حساب عدد كريات الدم البيضاء في المربعات الكبيرة في زوايا عداد الخلايا (Brown ,1976).

$$W.B.Cs/mm^3 = \text{Number cells counted} \times 50$$

١٤,٣:الفحوصات الكيموحيوية للدم

١,١٤,٣:تقدير فعالية إنزيمي الكبد GOT

تم تقدير مستوى أنزيم الكبد GOT في مصل دم الحيوانات بأستخدام الكت المصنع من قبل (Spine Liner Chemical) بحسب ما هو في أدناه:

جدول (٦,٣) خطوات طريقة تقدير فعالية انزيمي الكبد GOT

	العينة Sample test	السيطرة Control	القياسي Stander	محلول الكشف Blank
GOT substrate	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٤ ml	٠,٥ ml
Serum	٠,١ ml	-	-	-
D.W	-	-	٠,١ ml	٠,١ ml
Working pyruvate stander	-	-	٠,١ ml	-

حضنت الأنابيب في حمام مائي لمدة ٦٠ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧ مْ وأضيف إليها ما يلي :

	العينة Sample test	السيطرة Control	القياسي Stander	حلول الكشف Blank
DN.PH	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٥ ml
Serum	-	٠,١ ml	-	-

تركت الأنابيب لمدة ٢٠ دقيقة ثم أضيفت مادة NaOH كالاتي :

NaOH (0.4)	٥ ml	٥ ml	٥ ml	٥ ml

تركت الأنابيب لمدة ١٠ دقائق بعدها قرأت النتائج على طول موجي ٥١٠ نانوميتر بجهاز المطياف Spectrophotometer.

٢,١٤,٣:تقدير فعالية إنزيم الكبد GPT

تم تقدير مستوى أنزيم الكبد GOT في مصل دم الحيوانات بأستخدام الكت المصنع من قبل (Spine Liner Chemical) بحسب ما هو في أدناه:

جدول (٧,٣) خطوات طريقة تقدير فعالية انزيم الكبد GPT

	العينة Sample test	السيطرة Control	القياسي Stander	محلول الكشف Blank
GPT substrate	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٤ ml	٠,٥ ml
Serum	٠,١ ml	-	-	-
D.W	-	-	٠,١ ml	٠,١ ml
Working pyrovate	-	-	٠,١ ml	-

stander				

حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٣٧ مْ ولمدة ٣٠ دقيقة بعدها يضاف لها:

D.N.PH	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٥ ml	٠,٥ ml
Serum	-	٠,١ ml	-	-

تركت لمدة ٢٠ دقيقة ثم أضيف للأنابيب مادة :

NaOH(0.4N)	٥ ml	٥ ml	٥ ml	٥ ml

تركت لمدة ١٠ دقائق ثم قرأت النماذج على طول موجي ٥١٠ نانوميتر بجهاز المطياف Spectrophotometer .

٢,١٤,٣:تقدير مستوى البروتين الكلي في مصل الدم

تم تقدير مستوى البروتين الكلي(TP) Total Protien في مصل دم الحيوانات بأستعمال عدة التحليل (KIT).تكون البروتينات مع أيونات النحاسيك Coppers ions في المحيط القاعدي معقد ملون Colored complex blue – violet ، حيث تتناسب الكثافة اللونية لهذا المعقد تناسبا طرديا مع البروتين الكلي .

١,٢,١٤,٣:طريقة العمل :Procedure

أخذت ٣ أنابيب أختبار ، ووضع في كل أنبوب ٠,٢ مليليتر من محلول العمل Reagent ثم أضيف ٢٠ مايكروليتر من الماء المقطر إلى الأنبوب الأول ، و٢٠ مايكروليتر إلى الأنبوب الثاني ، و٢٠ مايكروليتر من المحلول القياسي إلى الأنبوب الثالث ، ثم تركت الأنابيب مدة ١٠ دقائق بعد أن تم رجها بشكل خفيف بدرجة حرارة المختبر وحسب الجدول (٧,٣) في أدناه، وتم قياس الأمتصاصية عند الطول الموجي 546nm.

جدول (٧,٣) طريقة قياس مستوى البروتين الكلي Total Protien

	Blank محلول الكشف	Sample العينة	Standerd القياسي
H2O	٢٠ مايكروليتر	-	-
Sample	-	٢٠ مايكروليتر	-
Standerd	-	-	٢٠ مايكروليتر
Reagent	٠,٢ مليليتر	٠,٢ مليليتر	٠,٢

الحسابات: Calculation

$$\text{Urea ncentration (mg / dl)} = = \frac{(A)sample}{(A)STD} \times C.STD$$

حيث (A)= الامتصاصية :Absorbance

C.STD = تركيز المحلول القياس Standard Concentration

٣,١٤,٣ تقدير مستوى اليوريا في مصل الدم

جدول (٨,٣) تقدير مستوى اليوريا في مصل الدم

	محلول الكشف Blank	العينة Sample	المحلول القياسي Standard
H_2O	١٠ مايكروليتر		
Sample		10 مايكروليتر	
Standard			١٠ مايكروليتر
R_1+R_3	١,٠ مليليتر	١,٠ مليليتر	١,٠ مليليتر
R2	١,٠مليليتر	١,٠مليليتر	١,٠مليليتر

١,٣,١٤,٣طريقة العمل :Procedure

تم أخذ ٠,٥ من R1 وحجم مشابه من R3 للأنابيب الثلاثة ثم وضع ١٠مايكروليتر من الماء المقطر في الأنبوب الأول و ١٠ مايكروليتر من مصل الدم في الأنبوب الثاني و ١٠ مايكروليتر من المحلول القياسي في الأنبوب الثالث ومزجت لمدة ١٠ دقائق في درProtien من R2 ووضع في الأنابيب الثلاثة ، ثم مزجت لمدة ١٠ دقائق عند درجة حرارة ١٥ – ٢٥ مْ وتم قياس الأمتصاصية عند الطول الموجي ٥٨٠ nm . الحسابات: Calculation

$$\text{Protien Concentration (mg / dl)} = = \frac{(A)sample}{(A)STD} \times C.STD$$

حيث (A)= الامتصاصية :Absorbance

C.STD = تركيز المحلول القياس Standard Concentration

١٥,٣:الدراسة النسجية المرضية

حضرت المقاطع النسجية في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف حيث أتبعت طريقة Bancroft and Stevens (1982) في تحضير المقاطع النسيجية والتي تضمنت:-

١- الانكاز Dehydration : أستخرجت االأعضاء المحفوظة بالفورمالين (10)% وغسلت بالماء المقطر ثم مررت النماذج في تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (100،90،80،70)% لمدة (2-1.5) ساعة في كل تركيز لإزالة الماء منها.

٢ - الترويق Clearing **:** روقت النماذج بالزايلين مرتين ولمدة (1-1.5) ساعة لكل مرة وذلك لإزالة محلول الإنكاز من الأنسجة.

٣ - التشربInfiltration **:** شربت النماذج بشمع البرافين المنصهر في درجة حرارة (56-58) مْ مرتين ولمدة (١-١,٥) ساعة لكل مرة.

٤ - الطمر Embedding : طمرت العينات في قوالب خاصة حاوية على شمع البرافين المنصهر وتركت لتتصلب .

٥ - التقطيع Sectioning : حضرت مقاطع نسجية متسلسلة بسمك (٥) مايكروميتر بأستعمال جهاز المشراح الدوارRotary microtome وثبتت النماذج على شرائح زجاجية بأستعمال لاصق ألبومين مايرMeyer’s albumine بعدها وضعت الشرائح في الفرن بدرجة حرارة (56-58)مْ بصورة عمودية لمدة (20) دقيقة لإزالة الشمع الزائد.

٦ - التصبيغ Staining : صبغت المقاطع النسجية بصبغة الهيماتوكسلين- ايوسين إذ مررت الشرائح في (زايلين- كحول اثيلي (100-95-90-70)%- صبغة الهيماتوكسلين) لمدة 3 دقائق لكل منها ثم غسلت المقاطع بماء الحنفية وغطست بصبغة الايوسين لمدة (3) دقائق وغسلت بعدها بماء الحنفية أيضا ثم مررت بتراكيز تصاعدية في كل من الكحول الاثيلين(70 ،90 ،95 ،100)% والزايلين ولمدة دقيقتين لكل تركيز .

٧- التحميل Mounting : وضع غطاء الشريحة بأستعمال كندا بلسم. وبعدها تم تشخيص المقاطع النسجية لملاحظة التغيرات النسيجية.

٨- تشخيص المقاطع النسجية: تم تشخيص المقاطع النسجية مجهريا من قبل الدكتور خليل كزار جفات /أختصاص في علم الأمراض/ كلية الطب البيطري / جامعة القادسية.

١٦,٣ :التحليل الأحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الأحصائي لتحديد الفروق المعنوية عند مستوى أحتمال ٥% ،إذ شمل التحليل الأحصائي تحليل التباين الثنائي (ANOVA (TowWay Analysis of Variance ، كما تم أختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بواسطة أختبار أقل فرق معنوي L.S.D (الراوي وخلف الله ،٢٠٠٠).تم تحليل النتائج احصائيا بواسطة برنامج spss في الحاسوب.

:النتائج والمناقشة

1.٤:عزل وتشخيص الفطريات

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود أنواع عديدة من الفطريات المرافقة لعينات من الحبوب العلفية (حنطة – ذرة صفراء) التي جمعت من مخازن الأعلاف والأسواق المحلية في مدينة الديوانية وهي معرضة للأستهلاك البشري والحيواني وتم تشخيص الأنواع التالية :

Aspergillus niger،*Aspergillus flavus*،*Aspergillus ochraceus*، *Aspergillus terreus*، *Penicillium* spp ، *Alternaria alternata* ، *Fusarium oxysporum*، *Curvilaria lunata*، *Rhizopus stolonifer*.

أظهرت نتائج عزل الفطريات المرافقة للأعلاف في الجدول(١,٤) وجود فروق معنوية في النسب المئوية لتردد الفطريات التي تم تشخيصها في معاملة الأعلاف (حنطة – ذرة صفراء) غير المعقمة سطحيا والمعقمة ولكلّ مجموعة من البذور،إذ وجد أن النسبة المئوية للبذور الملوثة بالفطريات في معا ملة الأعلاف(حنطة – ذرة صفراء) غير المعقمة هي الأعلى بالمقارنة مع البذور المعقمة سطحيا والسبب في ذلك يعود إلى عملية الغسل والتعقيم السطحي التي تؤثر على الفطريات المحمولة على سطح البذور وبالتالي تؤدي إلى التقليل من تواجدها على البذور،بالإضافة إلى أن مادة هايبوكلورات الصوديوم المعقمة يقتصر تأثيرها على الفطريات المحمولة على الغلاف الخارجي للبذور ولا تؤثر على الفطريات التي تصيب البذورمن الداخل أو التي تصيب جنين البذرة وهذا يتفق مع ما وجده (سرحان ١٩٩٥ ; سعدون ٢٠٠٥).

تشير النتائج إلى أن الفطر *A.niger* هو الأعلى ترددا في معاملة بذور الحنطة غير المعقمة سطحيا والمعقمة مقارنة مع بقية الفطريات الأخرى إذ بلغت النسبة المئوية لتردده ٣٣,٠٢ % و٣١,٧٤% على التوالي، في حين بلغت النسب المئوية لتردده في معاملة بذور الذرة الصفراء غير المعقمة سطحيا والمعقمة ٢٥,٠٦% ،٢٤,٦٧% على التوالي وجاء هذا متفقا مع ما وجده سرحان وآخرون(٢٠٠١)،كما اتفق ايضا مع الطويل (٢٠١٤)،اذ وجدت ان الفطر *A. niger* كان الأعلى ترددا في بذور الباذنجان من بقية الفطريات الأخرى ،كما أتفق أيضا مع الموسوي (٢٠١٥).

والسبب في ذلك يعود إلى قدرة الفطر *Aspergillus* على تكوين أعداد ضخمة من الوحدات التكاثرية المقاومة للظروف البيئية غير الملائمة والتي تشكل عوالق في الهواء كون قطرها أقل من ١٥ نانوميتر وبالتالي الوصول إلى أماكن عديدة إذ يمكن أن تدخل للمخازن عبر الشبابيك والفتحات الأخرى ،فضلا عن نموها في مديات واسعة من الحرارة والرطوبة ، إذ تتصف بعض الأنواع العائدة لجنس *Aspergillus* بأنها تنمو في مديات من درجات حرارة تتراوح ما بين ٥-٤٥ مْ أو أعلى من ذلك.

أما الفطر *A.flavus* فكانت النسبة المئوية لتردده في معاملة بذور الحنطة غير المعقمة سطحيا والمعقمة ٢٤,٧٠ % ،٢١,٨٥ % على التوالي ،في حين بلغت النسب المئوية لتردده في معاملة بذور الذرة الصفراء غير المعقمة سطحيا والمعقمة ٣٢,٠٢% ،٣١,٥٦.% على التوالي . تتفق هذه النتائج مع ما وجده البلداوي وآخرون (٢٠٠٩) الذي أكد على ان الأنواع المختلفة والتابعة لجنس *Aspergillus* كثيرا ما تتصدر الفطريات المعزولة من البذور وتتفق مع ما ذكره Agrios (2005) الذي أكد على ان العديد من البذور ومنها بذور الحنطة تصاب بالفطر *A.flavus* وبنسبة عالية وان تأخير مدة الحصاد يزيد من تعرض البذور للأضرار، وأكد على أن أنواع الجنس *Aspergillus* والعديد من الفطريات الأخرى التي تهاجم الحبوب في الحقل بوساطة غزو الجنين وباقي أجزاء البذرة ،وقد ذكر Reddy (1992) أن طول مدة التخزين للبذور مع توفر الرطوبة النسبية ودرجة الحرارة الملائمة لنمو الفطريات وكذلك وجود الحشرات والقوارض تعد من العوامل المهمة والمسؤولة عن زيادة الإصابة بفطريات المخازن .

أما الفطر *Penicillium* spp فقد بلغت النسب المئوية لتردده في معاملة بذور الحنطة الغير معقمة سطحيا والمعقمة ١٢,٥٣% ،١٢,٩٣% على التوالي في حين لم يظهر الفطر *Penicillium* spp في معاملة بذور الذرة الصفراء الغير معقمة سطحيا والمعقمة وهذا يتفق مع ما توصل إليه الخويلدي(٢٠٠٨) الذي تمكن من عزل الفطر *P.griseofulvum* من بذور كل من الحنطة والشعير .

أما الفطريات *Alternaria alternata* ، *Fusarium oxysporum* فقد بلغت النسبة المئوية لتواجدها في معاملة بذور الحنطة الغير معقمة سطحيا ٩,٩٧% ،٧,٩١% على التوالي في حين بلغت النسبة المئوية لترددها في معاملة بذور الحنطة المعقمة ١٩,٩١ % ،٩,٨٧% على التوالي ،أما في معاملة الذرة الصفراء الغير معقمة سطحيا فقد بلغت النسب المئوية لترددها ٩,٠٤% ،٨,٤٤% على التوالي في حين بلغت النسبة المئوية لترددها في معاملة بذور الذرة الصفراء المعقمة١٣,٣٤ %،٩,٨٨%وهذا يتفق مع ما ذكره جبر(٢٠٠٤) في أن الفطريات *Alternaria alternata* ،*Fusarium oxysporum* من الفطريات المرافقة للبذور.

أما بالنسبة للفطر *Rhizopus stolonifer* فقد بلغت النسبة المئوية لتواجده في معاملة بذور الحنطة والذرة الصفراء غير المعقمة سطحيا ٧,٧٠% ٢,٧٧% على التوالي بينما أختفى الفطر في معاملة بذور

الحنطة والذرة الصفراء المعقمة سطحيا ويعود سبب ذلك إلى كون الفطر *Rhizopus stolonifer* من الفطريات المحمولة على الغلاف الخارجي للبذور ولا ترافق البذور من الداخل أو تصيب جنين البذرة وهذا يتفق مع ما وجده(سعدون، ٢٠٠٥).

أما الفطر *Aspergillus terreus* فقد بلغت النسبة المئوية لتردده في معاملة بذور الذرة الصفراء غير المعقمة سطحيا والمعقمة ١٠,٤% ،٩,٨٨ %.

أما بالنسبة للفطر *Aspergillus ochraceuse* فقد بلغت النسبة المئوية لتردده في معاملة بذور الحنطة غير المعقمة سطحيا والمعقمة ٤,٤١% ،٣,٧٠% على التوالي ،في حين بلغت النسب المئوية لتردده في معاملة بذور الذرة الصفراء غير المعقمة سطحيا والمعقمة ١٢,٤٧ % ،١٠,٦٦% على التوالي تتفق هذه النتائج مع ما أشار إليه مرجان(٢٠٠٦) إلى أن الفطر *A. ochraceous* من الفطريات المرافقة لبذورالذرة الصفراء وكذلك يتوافق مع (الزيادي، ٢٠١١) .

أما الفطر *Curvilaria lunata* كان هو الأقل ترددا حيث بلغت النسب المئوية لتواجده في معاملة بذور الحنطة غيرالمعقمة سطحيا ١,٨٥% .

جدول (١,٤) الفطريات المعزولة من بذور الحنطة الغير معقمة سطحيا والمعقمة ونسب ترددها

الفطريات المعزولة	نسب تردد الفطريات(%) في بذور الحنطة	
	بذور غير معقمة سطحيا	بذور معقمة سطحيا
Aspergillus niger	33.2	31.74
Aspergillus flavus	24.70	21.85
***Penicillium* spp**	12.53	12.93
Alternaria alternata	9.97	19.91
Fusarium oxysporum	7.91	9.87
Rhizopus stolonifer	7.70	٠
Aspergillus ochraceus	4.41	3.70
Curvilaria lunata	1.85	٠

- تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات.

قيمة LSD للفطريات المعزولة =20.52

فيمة LSD بين البذور المختبرة=31.151

قيمة LSD للتداخل بين القيم=3.975

جدول (٢,٤) الفطريات المعزولة من بذور الذرة الصفراء الغير معقمة سطحيا والمعقمة ونسب ترددها

الفطريات المعزولة	نسب تردد الفطريات(%) في حبوب الذرة الصفراء	
	حبوب غير معقمة سطحيا	حبوب معقمة سطحيا
Aspergillus flavus	32.02	31.56
Aspergillus niger	25.06	24.67
Aspergillus ochraceus	١٢,٤٧	10.66
Aspergillus terreus	10.4	٩,٨٨
Alternaria alternata	٩,٠٤	13.34
Fusarium oxysporum	8.44	9.88
Rizopus stolonifer	2.77	٠

- تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات.

قيمة LSD للفطريات المعزولة =18.35

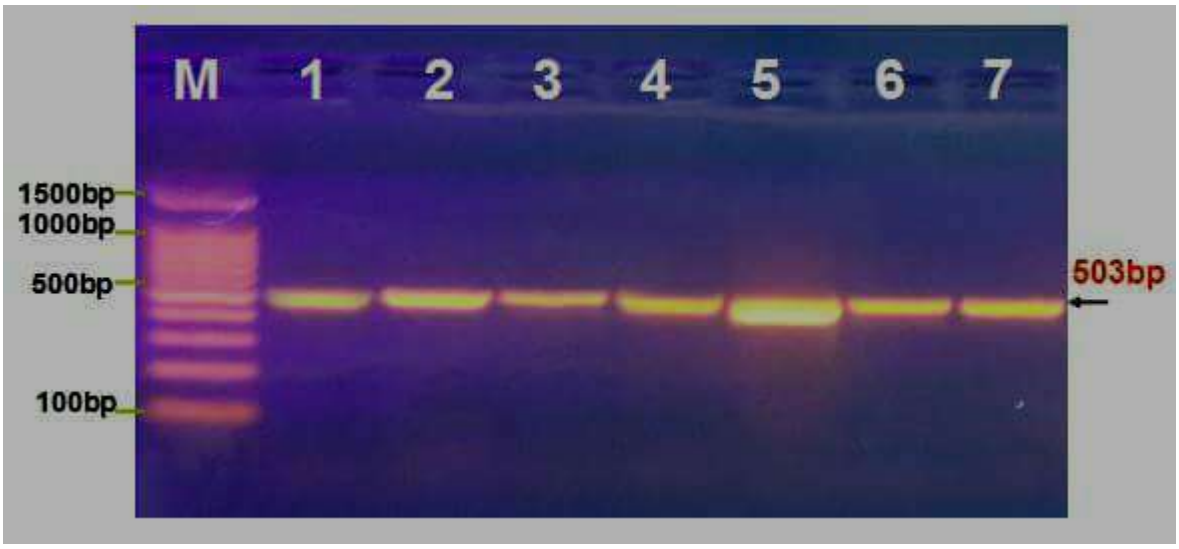
فيمة LSD بين البذور المختبرة=٢٦,٣٢٢

قيمة LSD للتداخل بين القيم=٣,٨٧

١,١.٤ :التشخيص بأستعمال تفاعل السلسلة المتبلمر Diagnosis by PCR :

تم أختيار الفطر *Aspergillus niger* لغرض أجراء التجارب عليه وكذلك لدعم التشخيص المعتمد على المفاتيح التصنيفية فقد شخص الفطر بأستعمال تقنية PCR للتأكد من صحة تشخيص الفطر قيد الدراسة. وبأستعمال البادئ (18S rRNA gene ITS region) المصمم بواسطة برنامج التصميم primers 3 plus بعد أن تم الحصول على التسلسل الجيني للبادئ من بنك الجينات Gen bank في

الموقع WWW.ncbi.nlm.nih.gov ،كما تم التأكد من الدورات الحرارية للبادئ وحزم الحامض النووي المضاعف للفطر *A.niger* مع البادى(ITS-1) ومسافة الترحيل الكهربائي الموضحة في الشكل (١,٤) وقد بلغت **(٥٠٣bp)**.أن استعمال البادىء المذكور في الفقرة (٣,١,٣) في المواد وطرائق العمل بينت نجاحه في عملية التضخيم للحامض النووي للفطر *A.niger* إذ أظهرت الحزمة زوجا قاعديا وهذا يشير إلى أن العزلات قيد الدراسة تعود إلى الفطر *A.niger* و أن نتائج الفحص التقليدي والفحص الجزيئي جاءت متطابقة تماما. تتفق هذه النتائج مع الكثيرمن الباحثين الذين عملوا على توصيف العزلة أعتمادا على تشخيص الوراثة الجزيئية ومنهم محمد وعيدان(٢٠١٦) الذين عملوا على تضخيم منطقة ITS في تشخيص الفطر كشفرة وراثية عالمية .



شكل (١,٤) الترحيل الكهربائي(Electrophoresis) بأستخدام هلام الأكاروز تركيز ١%والذي يظهر نتائج فحص PCR لجين 18S rRNA والخاص بتشخيص الفطر *A.niger* . حيث يمثل M:Marker (1500 -100bp) , الحفر من (١-٧) عزلات الفطر الموجبة للفحص بناتج ٥٠٣ bp.

٢.٤: أختبار قابلية عزلات الفطر *A.niger* على أنتاج الأوكراتوكسين A بطريقة صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC).

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي بتقنية صفائح الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) أن ٧ عزلات من مجموع ٢٠ عزلة للفطر *A.niger* ، عزلت من الأعلاف كانت منتجة للسم اوكراتوكسين A وبنسبة أنتاج ٣٥% جدول(٤ .٣) .كما تباينت عزلات الفطر في إنتاجها للسم أستنادا إلى حجم البقعة وشدة التألق تحت الأشعة فوق البنفسجية ويعزى تفاوت العزلات في أنتاج الأوكراتوكسين A إلى القدرة الوراثية للعزلة .تفوقت نتائج هذه الدراسة على العديد من الدراسات منها ما ذكره Gherbawy *et al*., (2012) والذي أشاروا إلى أن ٢٥% من عزلات الفطر *A. niger* المعزولة من التمر قادرة على إنتاج

الاوكراتوكسين A.ومع ما ذكره الغزالي وعلي (٢٠١٤) واللذان أشارا إلى أن ٢٤% من عزلات الفطر *A.niger* المعزول من ثمار التفاح والكمثرى منتجة للسم أوكراتوكسين A .و مع ما ذكره علي وآخرون(٢٠١٥) الذي أشاروا إلى أن ٢٠% من عزلات الفطروالمعزولة ايضا من التمر كانت منتجة للسم(OTA).

جدول (٣.4) عزلات الفطر *A.niger* المنتجة وغير المنتجة للأوكراتوكسين A

العزلة	القدرة على انتاج الاوكراتوكسين A
An1	-
An2	-
An3	++
An4	-
An5	-
An6	++
An7	++
An8	-
An9	+
An10	+
An11	-
An12	-
An13	-
An14	-
An15	-
An16	+ + +
AN17	
An18	-
An19	+ +
An20	-

(+ + +) :عزلة منتجة للأوكراتوكسين شديدة التألق .

(+ +):عزلة منتجة للأوكراتوكسين متوسطة التألق .

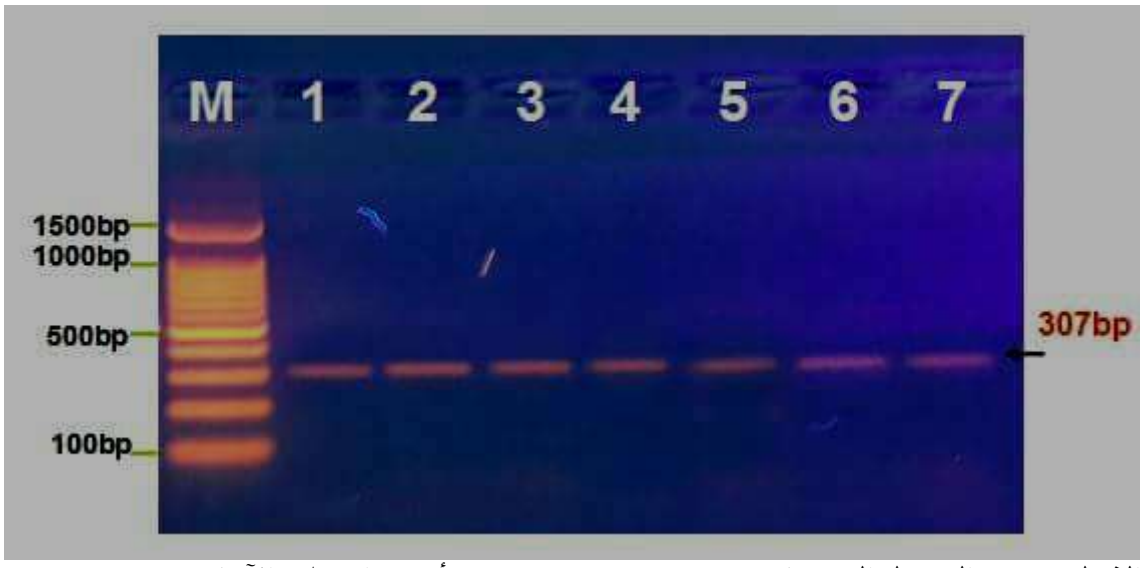
(+) :عزلة منتجة للأوكراتوكسين ضعيفة التألق.

(-) :عزلة غير منتجة للأوكراتوكسين.

AN :عزلة الفطر *A. niger* .

3.٤: الكشف عن قدرة عزلات الفطر *A.niger* و الجين المسؤول عن أنتاج الأوكراتوكسين A بأستخدام تقنية PCR :

أظهرت نتائج تقنية PCR عن وجود الجين *PKS* وهو الجين المسؤول عن أنتاج الأوكراتوكسين A في الفطر *A.niger* وبنسبة ٣٥% من مجموع العزلات المختبرة،الشكل (٢,٤).تفوقت نتائج هذه الدراسة عن ما توصلت إليه الربيعي(٢٠١٢) ،اذ وجدت أن (١٠%) من عزلات الفطر *A.niger* كانت حاوية على الجين *PKS* المسؤول عن إنتاج الأوكراتوكسينA . وفي دراسة أخرى وجدت الموسوي(٢٠١٥) أن (٦٦,٦٦%) من عزلات الفطر المذكور والمعزول من دم وادرار مرضى الفشل الكلوي كانت حاوية على الجين المسؤول عن أنتاج الأوكراتوكسين A .



الشكل (٢,٤) الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بأستخدام هلام الآكاروز تركيز ١% والذي يظهر نتائج فحص الـPCR الخاص بجين *PKS* في عزلات الفطر *A.niger* .حيث يمثل -1500 M:Marker (100bp), الحفر من (١-٧) عزلات الفطر الموجبة للفحص بناتج 307 bp .

4.٤:تأثير المعاملات الحيوية والكيمياوية في عزلة الفطر *A.niger* المنتجة لسم الأوكراتوكسين A

1.٤,٤:أختبار كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (٤,٤) حساسية الفطر *A.niger* لجميع تراكيز المستحضرالحيوي وبمعدلات تباينت معنويا فيما بينها حسب تركيز المستحضر الحيوي المستعمل ، فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط للفطر *A.niger* عندالتركيزين ٢ غم /لتر ، ٣ غم / لتر (١٠٠%) أما بالنسبة للتركيزين ٠,٥ غم /لتر و ١غم /لتر أنخفضت النسبة وبفارق معنوي (٧٥,٨٣%) ،(٨٥%) على التوالي. تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي بينت أن بكتريا *P.fluorescens* تستعمل كثيرا في السيطرة الحيوية على بعض الأمراض النباتية الناتجة عن الأصابة بالفطريات الممرضة وخاصة الأجناس *Aspergillus* ، *Penicillium* (Girija and Kumar,2005)وتعود القابلية التثبيطية لهذا المستحضر إلى قدرة البكتريا *Pseudomonas flurescens*على إنتاج العديد من المركبات المضادة لنمو الفطريات (Antifungul compound)أذ تم تشخيص أنواع عدة من المضادات الحيوية مثل (HCN) و Oligomycine و Oomycin و Phenazinel- Carboxylic Acid(PCA) و Pyoluterin(Plt) و Pymolnitrin(Pln) وغيرها من المضادات (Duffy وDefago وآخرون ١٩٩٧ ، Thrane وآخرون ،١٩٩٩) .ولكلّ من هذه المضادات دور في عملية تثبيط الفطر، كما تنتج بكتريا *P.fluorescense* صبغة SiderophoreFluorescent وهي صبغة قابلة للأنتشار خارج الخلية تدعى pyoverdin ومعروفة بأسم Pseudobactin وهي ذات ألفة عالية لأيونات الحديد(Fe+3)الأمرالذي يعمل على إختزال ايونات الحديد الذائبة فيقلل من جاهزيته للأحياء الدقيقة التي تحتاجها لنموها (Zodor and Anderson ,١٩٩٢). تتفق هذه النتائج مع حسن(٢٠١٢)إذ أشارت ان لهذه البكتريا قدرة على تثبيط نمو الفطر*Aniger* والمعزول من فستق الحقل بنسبة ١٠٠%عند التركيز ٢غم /لتر،كما أتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه الجميلي (١٩٩٦) وقاسم(١٩٩٨) من قدرة بكتريا *P.fluorescens* على تثبيط نمو الفطر *A.flavus* بنسبة ١٠٠% ،ولهذه البكتريا القدرة على تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة للنبات مثل الأجناس *Pyhtium*،*Phytophthora*،*Sclerotium*،*Rhizoctonia* و*Fussarium* (الهيتي وجماعته،١٩٩٦)

الجدول (4.٤) :كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

المعاملات	التركيز (غم / لتر)	معدل قطر مستعمرة الفطر *A.niger* (ملم)	نسبة التثبيط (%)
المستحضر الحيوي (الفلوراميل)	٠	٩٠	٠
	٠,٥	٢٤,١٦	٧٥,٨٣
	١	١٥	٨٥
	٢	٠	١٠٠
	٣	٠	١٠٠

- تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات.

قيمة LSD بين التراكيز عند مستوى أحتمال ٠,٠٥%= 3.016

٢.4.٤: أختبار كفاءة كاربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (٥,٤) أن أعلى نسبة تثبيط للفطر *A.niger* ظهرت في الوسط الحاوي على ٣٠ ملغم /ملليترمن كاربونات الكالسيوم إذ بلغ معدل أقطار المستعمرات ٤٤,٥ ملم بينما بينما لم يؤثرالتركيز ٥ ملغم / ملليتر في نمو الفطرالمختبرإذ بلغ معدل أقطارالمستعمرات ٩٠ ملم وهو مماثل لما ظهر في معاملة السيطرة وهناك ملاحظة جديرة بالأشارة وهي أن نمو الفطر كان ضعيفا ،بينما في معاملة المقارنة ظهر النمو كثيفا .أما عند التركيزين ١٠ ملغم /ملليتر،٢٠ ملغم /ملليتر بلغ معدل أقطار المستعمرات ٧٨,٦٦ ملم و ٦٥,٨٣ ملم على التوالي .تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما أشار إليه قاسم (١٩٩٨) حيث ذكر أن أضافة كاربونات الكالسيوم إلى الوسط الزرعي بتركيز ٢٠ % ثبط نمو الفطر *A.flavus* بنسبة ٣٨% وقد يعود السبب في ذلك إلى إحداث تغير pH الوسط الزرعي ،فمادة كاربونات الكالسيوم تغير الوسط إلى الظروف القاعدية عند تحللها مائيا بإعطائها ايونات الهيدروكسيل السالبة ،وبما أن الفطريات عامة تفضل نموها في الوسط المتعادل أو قليل الحموضة (أنكولد ،١٩٨٠) فالتغير في قيمة pH الوسط نحو الظروف القاعدية يؤثر في جاهزية العناصر الغذائية التي يحتاجها الفطر وبالتالي تثبيط معدلات نموه (بلكرامي وفيرما ،١٩٨٨) أو قد يكون لمادة كاربونات الكالسيوم تأثير

مباشر إذ تعمل على جعل جهد الماء في الوسط أكثر سالبية مما يقلل من جاهزية الماء للفطر أو أنها تعمل على إعاقة امتصاص العناصرالغذائية الضرورية من الوسط الزرعي (Koller وجماعته،١٩٨٢) .

الجدول(٥.4) كفاءة كاربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

المعاملات	التركيز ملغم /مللتر	معدل قطر مستعمرة الفطر*A.niger*(ملم)	نسبة التثبيط (%)
كاربونات الكالسيوم	٠	٩٠	٠
	٥	٩٠	٠
	١٠	٧٨,٦٦	٢١,٣٣
	٢٠	٦٥,٨٣	٣٤,١٦
	٣٠	٤٤,٥	٥٥,٥

- تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات.

قيمة LSD بين التراكيز عند مستوى أحتمال ٠,٠٥%= ١,٦١

٤. ٣.٤:التجربة الخزنية

٤.٣.4.١:أختبار كفاءة المستحضر الحيوي وكاربونات الكالسيوم في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A.niger* في أثناء فترة الخزن :

أظهرت النتائج الموضحة في جدول (٦,٤) و(٧,٤)أمتلاك الفطر *A.niger* ضراوة عالية تمثلت بأحداث نسب عالية من الأصابة في الأعلاف (حنطة – ذرة صفراء)في معاملة (بذور ملوثة بلقاح الفطر *A.niger*)إذ وصلت إلى ٧٣,٣٣%، ٨٠% على التوالي بعد مرور ١٥ يوم من الخزن ،كما حدثت زيادة في نسب الأصابة بعد مرور ٣٠ يوم من الخزن إذ بلغت نسب الأصابة ١٠٠%، ١٠٠% ،في حين كانت في معاملة السيطرة (بذورغير ملوثة بلقاح الفطر *A.niger*) ٥٣,٣٣%، ٦٠% على التوالي بعد مرور ١٥ يوم و٣٠ يوم من الخزن حيث أشارت العديد من الدراسات إلى قدرة أنواع الفطر *Aspergillus* على إصابة الحبوب. فقد أشار Sulaiman (1977) إلى أن بذور الحنطة والشعيروالذرة الصفراء المخزونة في شمال ووسط وجنوب العراق

مصابة بأنواع الفطرين *Aspergillus* ، *Penicillium* كما وجد سرحان(١٩٩٥)أنواع تابعة لشبه جنس الفطر *Aspergillus* مرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء في سايلوات محافظة القادسية وأن نسبة الأصابة تراوحت بين ٣٤%- ٩٥% . كماأظهر المستحضر الحيوي الفلوراميل فعالية عالية في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر المذكور وتمثل بأختزال نسب الأصابة من ٧٣,٣٣%،٨٠% و ١٠٠%،١٠٠% في البذور الملوثة بالفطر فقط إلى ٠%،٠% في معاملة (بذور ملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي) ومعاملة التداخل (بذورملوثة بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي +كاربونات الكالسيوم) بعد مرور ١٥ و ٣٠ يوم من الخزن على التوالي ،كما وفرت كاربونات الكالسيوم في معاملة (بذورملوثة بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بكاربونات الكالسيوم) حماية للأعلاف وذلك بأختزال نسب الأصابة من ٧٣,٣٣ %،٨٠ %في معاملة (بذورملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger*فقط) إلى ٢٠%،٢٦,٦٦% بعد مرور ١٥ يوم من الخزن كما حدثت زيادة في نسب الأصابة بعد مرور ٣٠ يوم من الخزن إذ بلغت نسب الأصابة ٢٦,٦٦%، ٣٣,٣٣%،وبالرغم من ارتفاع نسب الأصابة للبذور إلا أن المظهر الخارجي يوحي أنها سليمة ويبدوأن الأصابة موجودة ولكنها مكبوحة . كما تشير النتائج إلى أن معاملة (بذور لم تلوث صناعيا بلقاح الفطر*A.niger* والمعاملة بكاربونات الكالسيوم) كانت لها القدرة على أختزال نسب الأصابة إلى١٣,٣٣%، ٢٠% على التوالي بعدمرور١٥ و ٣٠ يوم من الخزن . يعزى سبب أمتلاك المستحضر الحيوي الفلوراميل القدرة على حماية الأعلاف (حنطة – ذرة صفراء) من الأصابة بالفطر *A.niger* في المخزن إلى القدرة التضادية للبكتريا *P. fluorescens* والفعل المثبط لمادة كاربونات الكالسيوم فضلا عن خفض المحتوى الرطوبي للحبوب ، فقد أشارت أحد الدراسات إلى أن لكاربونات الكالسيوم أثر في تثبيط نمو الفطريات المخزنية ومنها *A.flavus* ، *A.niger* من خلال قدرتها على خفض المحتوى الرطوبي للبذور إلى المستوى الذي يمنع إنبات وتطور أبواغ الفطريات (Siriacha وجماعته ، ١٩٨٩) اذ أن لهذه المادة القدرة على أمتصاص الرطوبة من خلال أختلاف السعات الرطوبية بينها وبين الحبوب حيث أنها لا تتميأ بسهولة (الكبيسي ،١٩٨٩) .. تتفق نتائج الدراسة مع الجميلي وأبوشبع (٢٠٠٥) ومحسن(٢٠٠٦) إذ وجدوا أن لبكتريا*P.fluorescens* قدرة عالية في حماية بذور الحنطة والذرة الصفراء من الأصابة بالفطريات .وفي دراسة أخرى الجميلي وتويج(٢٠٠٦) أستطاع لقاح بكتريا *P.fluorescens* خفض نسبة الأصابة في درنات البطاطا بالفطر *F.solani* المسبب لمرض التعفن الجاف كما وفر المستحضر الحيوي الفلوراميل حماية حبوب الرزمن الأصابة بالفطرين *A.niger* و *P.chrysogenum* (مطوق،٢٠٠٥)، كما إتفقت نتائج هذه الدراسة مع النتائج التي ذكرها(١٩٩٥)Fonseca& Calori – Dmingues بأن المادة المضافة كلما

كانت كفوءة في خفض المحتوى الرطوبي للحبوب المخزونة فأنها تكون فعالة في حمايتها من الأصابات الفطرية

جدول (٦,٤) كفاءة المعاملات الحيوية والكيمياوية في حماية الحنطة من الأصابة بالفطر *A. niger* أثناء الخزن بعد مرور ١٥ و٣٠ يوم :

المعاملات	نسبة الأصابة بعد مرور ١٥ يوم	نسبة الأصابة بعد مرور ٣٠ يوم
Control	٥٣,٣٣	٥٣,٣٣
A.N	٧٣,٣٣	١٠٠
F+A.N	٠	٠
F+A.N+Caco3	٠	٠
CaCo3+A.N	٢٠	٢٦,٦٦
CaCo3	١٣,٣٣	١٣,٣٣
LSD (0.05)	16.26	21.6

F = المستحضر الحيوي الفلوراميل

A.niger = الفطر

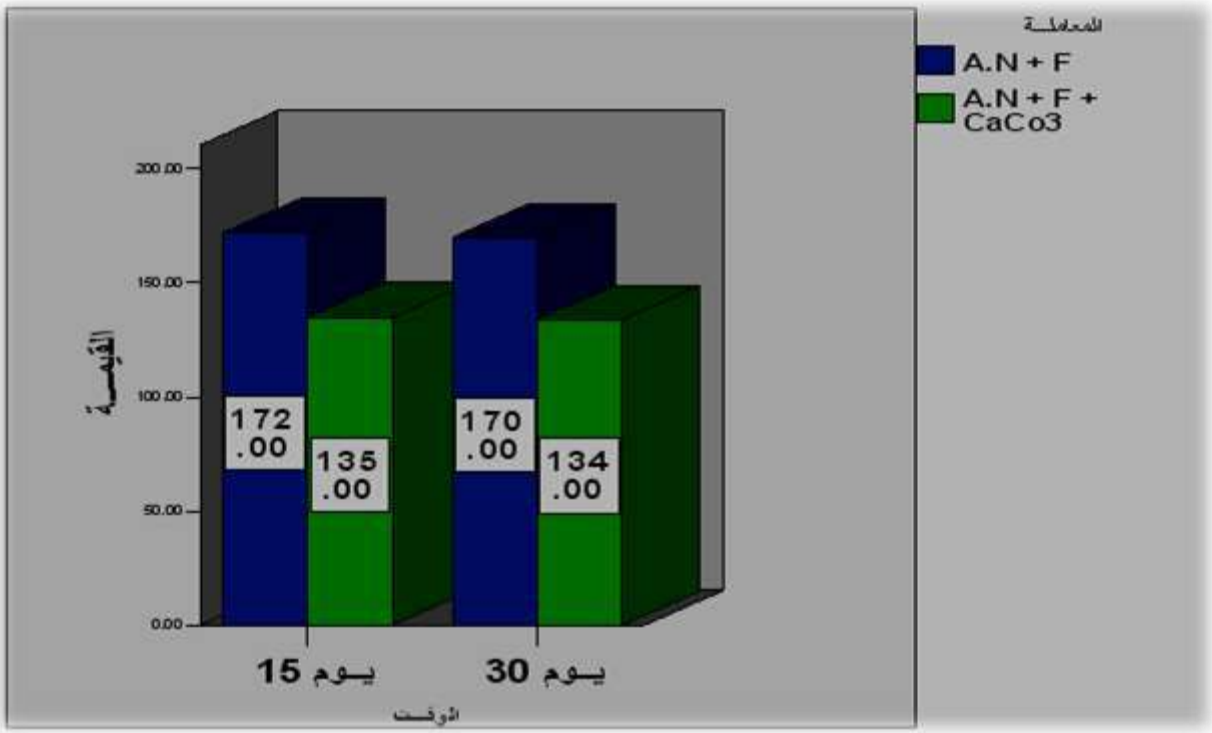
جدول (7.4) كفاءة المعاملات الحيوية والكيمياوية في حماية الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر *A.niger* أثناء الخزن بعد مرور ١٥ و٣٠ يوم:

المعاملات	نسبة الأصابة بعد مرور ١٥ يوم	نسبة الأصابة بعد مرور ٣٠يوم
Control	٦٠	٦٠
A.N	٨٠	١٠٠
F+A.N	٠	٠
F+A.N	٠	٠

CaCo3+A.N	٢٦,٦٦	٣٣,٣٣
CaC03	٢٠	٢٠
LSD(0.05)	٣٥,١٦	٢٤,٠٠

2.3.4.٤:تقدير أعداد البكتريا *P.flurescense* على حبوب الأعلاف :

أظهرت النتائج في الشكل (٣,٤)عدم وجود فرق معنوي في أعداد البكتريا بعد مرور ١٥ و٣٠ يوم من الخزن ولكلا المعاملتين إذ بلغت أعداد البكتريا في معاملة (بذور ملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي الفلوراميل) ١,٧٢٠ ×١٠^١٠ و١,٧١٦ ×١٠^١٠ وحدة تكوين مستعمرة /غم من البذورعلى التوالي بعد مرور ١٥ و٣٠ يوم من الخزن في حين بلغت أعداد البكتريا في معاملة التداخل (بذور ملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* + الفلوراميل+ كاربونات الكالسيوم) ١,٣٥٠ ×١٠^١٠ و١,٣٤٦ ×١٠^١٠ وحدة تكوين مستعمرة /غم من البذوربعد مرور ١٥ و٣٠ يوم من الخزن. كما تشير النتائج إلى عدم وجود تغير في أعداد البكتريا وحيويتها مما يعطي انطباع أن المستحضر الحيوي كان كفوءا في حماية الأعلاف خلال فترة الخزن المذكورة ،كما أن للمادة الحاملة القدرة على المحافظة على الخلايا الخضرية وذلك من خلال توفيرها ظروفا ملائمة من حيث خفض درجة الحرارة وخفض نسبة الرطوبة وذلك لتواجد البكتريا على سطوح حبيبات كاربونات الكالسيوم التي تقوم بأمتصاص الرطوبة الموجودة في الهواء فضلا عن قلة امتصاصها للحرارة من المحيط مما يوفر حرارة ملائمة للخلايا الخضرية وتمنع جفافها (قاسم ، ١٩٩٨ ؛حميد،٢٠٠١) .



شكل (٣,٤) أعداد البكتريا المتواجدة على أسطح بذور الحنطة والذرة الصفراء والملوثة بالفطر *A.niger* والمعاملة بالفلوراميل وكاربونات الكالسيوم المخزنة لمدة ١٥ و٣٠ يوم

٥,٤:تأثير سم الأوكراتوكسين A داخل جسم الكائن الحي

١,٥,٤: فحوصات الدم الفسيولوجية

1.١,٥,٤: حساب تركيز الهيموغلوبين (Hb)

أظهرت نتائج فحوصات الدم الفسيولوجية ان معدل الهيموغلوبين في دم ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A والمستخلص من الفطر *A.niger* قد انخفض إلى ٩,١غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كان فيها معدل الهيموغلوبين ١١,٥غم /١٠٠ مل (جدول ٨,٤).

جاءت هذه النتائج متقاربة مع الغزالي وعلي(٢٠١٤) والذي أشارا إلى انخفاض معدل الهيموغلوبين إلى١٠,٣ غم /١٠٠ مل عند معاملة ذكور الجرذان بسم الأوكراتوكسين A مقارنة مع مجموعة السيطرة.كما جاءت متقاربة مع علي وكاظم (٢٠١٢) التي اشارت إلى انخفاض مستوى الهيموغلوبين بفعل سم *Bipolaris holmii* إلى ٧,٩ غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة والبالغة ١٣ غم /١٠٠ مل . أن الأنخفاض في مستوى الهيموغلوبين قد يعود إلى أن السموم الفطرية تؤثر سلبا على أنتاج كريات الدم الحمراء (Groopman *et al*.,2003) كما أن لها القابلية على الأرتباط الشديد مع بروتينات الدم التي تشمل الألبومين والكلوبيولين والترانسفرين المسؤولة عن التخليق الحيوي لكريات الدم الحمراء مما ينتج عنها قلة كميتها وتأثيرها في التوازن الدموي Heamostasis (Kubena *et al*.,1997).

كما كان لمعاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A والمستحضر الحيوي الفلوراميل تأثير في أعادة معدل تركيز الهيموغلوبين في دم ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بها إلى مستواه الطبيعي١١ غم/١٠٠مل مقارنة مع معاملة الأوكراتوكسين A والبالغة٩,١ غم /١٠٠مل .

أما معاملة المستحضر الحيوي الفلوراميل بلغ معدل الهيموغلوبين١١,٦٦غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة١١,٥غم/١٠٠ مل) .

جدول (٨,٤) تأثير سم الأوكراتوكسين Aفي معدل تركيز الهيموغلوبين في دم ذكور الجرذ الأبيض .

المعاملات	معدل تركيز الهيموغلوبين غم / ١٠٠ مل
المقارنة	11.5
سم الأوكراتوكسين A	9.1
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	١١
الفلوراميل فقط	١١,٦٦
L.S.D. (0.05)	0.521

٢,١,٥,٤:حساب حجم الكريات المضغوطة (P.C.V.)

أشارت النتائج إلى انخفاض معدل حجم الكريات المضغوطة في دم ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A إلى ٢٧,٣٣ غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة والبالغة ٣٧,١١ غم /١٠٠ مل(جدول٩,٤).

جاءت نتائج هذه الدراسة متقاربة مع العبيدي(٢٠١١) التي أشارت إلى انخفاض معدل حجم الكريات المضغوطة في دم الأفراخ المعاملة بلقاح الفطريات *A.flavus* و *A.niger* و *P.griseofulvum* اذ بلغ معدل مستواها ٣٠,٣٣ و٣٠,٦٦ و٣٤,٦٦ % مقارنة مع مجموعة السيطرة التي كان فيها معدل حجم الكريات المضغوطة ٣٨,٣٣ %. ويعزى سبب انخفاض حجم الكريات المضغوطة إلى انخفاض معدل تركيز الهيموغلوبين إذ أن هناك علاقة طردية بين كلّ من حجم الكريات المضغوطة وكمية الهيموغلوبين والتعداد الكلي لكريات الدم الحمراءمن خلال اختزال اعدادها في نخاع العظم (Groopman *et al.*,2003) .

كما بلغ معدل حجم الكريات المضغوطة في معاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A و المستحضر الحيوي الفلوراميل ٣٥,٣٣% مقارنة مع مجموعة السيطرة البالغة ٣٧,١١ % في حين بلغت في معاملة المستحضر الحيوي الفلوراميل ٣٧,١٦ .

جدول (٩,٤) تأثيرسم الأوكراتوكسين في معدل حجم الكريات المضغوطة في دم ذكور الجرذ الأبيض.

المعاملات	معـــدل حجـــم الكريـــات المضغوطة (PCV)%
المقارنة	37.11
سم الأوكراتوكسين A	27.33
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	٣٥,٣٣
الفلوراميل فقط	٣٧,١٦
L.S.D.(0.05)	٥,١٣

٣,١,٥,٤:حساب خلايا الدم البيضاء (WBC)

أوضحت النتائج أرتفاع أعداد كريات الدم البيضاء في دم ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A فقد بلغت١٣,٢٦خلية بيضاء /ملم^{٣} مقارنة مع مجموعة السيطرة والبالغة ٩,٠٦ خلية بيضاء /ملم^{٣} (جدول١٠,٤)،والسبب في ذلك يعود إلى أستحثاث الجهاز المناعي على زيادة تكوين خلايا الدم البيضاء.جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة مع علي وآخرون(٢٠١٥) إذ أشاروا إلى أرتفاع نسبة خلايا الدم البيضاء إلى ١١,٣ ×١٠^{٣} خلية /ملم^{٣} مقارنة مع مجموعة المقارنة والبالغة ٤,٥ ×١٠^{٣} .

أما معاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A والمستحضر الحيوي الفلوراميل فكان للفلوراميل أثرا في أعادة معدل أعدادخلايا الدم البيضاء إلى المستوى الطبيعي إذ بلغت نسبة خلايا الدم البيضاء ١٠,٤٣خلية ×١٠^{٣}مقارنة مع معاملة الأوكراتوكسين A البالغة ١٣,٢٦ ×١٠^{٣} خلية / ملم^{٣} ،أما معاملة الفلوراميل فقد بلغت نسبة خلايا الدم البيضاء ٩,٢ خلية بيضاء / ملم^{٣} .

جدول (١٠,٤) تـأثير سم الأوكراتوكسينA في معدل تعداد كريـات الـدم البيض في دم ذكور الجرذ الأبيض .

المعاملات	معدل تعداد خلايا الدم البيضاء
المقارنة	9.06
سم الأوكراتوكسين A	13.26
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	10.43
الفلوراميل فقط	٩,٢
L.S.D.(0.05)	٦,١٨

٦,٤:الفحوصات الكيموحيوية

١,٦,٤:تقدير فعالية أنزيمي الكبد GPT , GOT

أثر سم الأوكراتوكسين A في مستويات أنزيمي الكبد GOT وGPT في دم ذكور الجرذ الأبيض المعاملـة بهـا أذ بلـغ مسـتواه ١٣ ، ١٤ وحـدة دوليـة /لتـر مقارنـة مـع مجموعـة السـيطرة البالغـة ١٠,٦٦ وحدة دولية /لتر (جدول١١,٤). جاءت نتائج الدراسة الحالية مقاربة مع الغزالي(٢٠١٤) إذ وجد أن سم الأوكراتوكسين A سبب أرتفاع مستويات إنزيمي الكبد GOT وGPT إلـى ١٢ ،١٥ وحدة دولية /لتر مقارنة مع معاملة السيطرة إذ بلغت ١١ ،٩ وحدة دولية /لتر كما جاءت نتـائج هذه الدراسة مقاربـة مع ما وجده الجميلي والساعدي(٢٠١٢) إذ وجدا أن سموم الأفلاتوكسينات أحدثت أرتفاع في مستوى انزيمـي الكبـد GOT وGPT إلـى ٢٠,٧ وحـدة دوليـة /لتـر مقارنـة مـع مجموعـة السـيطرة والبالغـة ١٨,٣ وحدة دولية /لتر.كما جاءت نتـائج البـاحثين (٢٠٠١) Benkerroum and Elarkia مقاربـة ايضـا مـع نتـائج هـذه الدراسـة إذ وجـدا أن سـموم الفطـر *Penicillium* spp مثـل Ochratoxin A وPencilic acid أحدثت ارتفاع في مستوى هذين الأنزيمين. أن سبب هذا الأرتفاع يعزى إلى التـأثيرات السمية المتعددة للسموم الفطرية في خلايا الكبد إذ أنها تحدث تحللا لخلايا الكبد والتـي تحتـوي علـى هذين الأنزيميين مما يؤدي إلى تحررهما ومن ثم أرتفـاع مستواهما فـي الـدم ،أو أن السموم تـؤثر فـي أعضـاء

أخـــرى كالكليـــة وأغشـــية الشـــبكة الأندوبلازميـــة إذ يتواجـــد فيهمـــا هـــذين الأنـــزيميين أيضـــا (Meerdink,2004).

كما أن لمعاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A والمستحضر الحيوي الفلوراميل فكان لها أثرا ايجابيا فـــي خفـــض مســـتويات إنزيمـــي GPT GOT فـــي دم ذكـــور الجـــرذ الأبـــيض إذ بلـــغ مســـتواهما ١١، ١١,٣٣وحدة دولية /لتر مقارنة مع معاملة الأوكراتوكسين A فقط ، أما معاملة الفلوراميل فقد بلغ مستوى إنزيمي الكبد GOT وGPT ١٠،١٠,٣٣ وحدة دولية /لتر.

جدول (١١,٤) تـأثير سم الأوكراتوكسين A في معدل مستوى انزيمي الكبد GOT و GPT في دم ذكور الجرذ الأبيض .

المعاملات	نسبة انزيم الكبد GOT وحدة دولية / لتر	نسبة انزيم الكبد GPT وحدة دولية / لتر
المقارنة	١٠	10.66
سم الأوكراتوكسين A	١٣	١٤
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	١١	١١,٣٣
الفلوراميل فقط	١١	١٠,٣٣
L.S.D.(0.05)	١٠	١,٥٩

٢,٦,٤ :تقدير مستوى البروتين الكلي في مصل الدم Total Protien

أحدث سم الأوكراتوكسين A تأثيرا في بلازما الدم (Seurm) لذكور الجرذ الأبيض المعاملة به إذ سبب إرتفاعا في مستوى البروتين الكلي إلى٨غم / ١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة البالغة ٦,٥٥غم /١٠٠ مل (جدول ١٢,٤) ،وهذه النتائج جاءت مقاربة لما أشار إليه الغزالي وعلي (٢٠١٤) إذ وجدا ان سم الأوكراتوكسينA سبب رفع كمية البروتين الكلي في دم ذكوروأناث الحيوانات المعاملة إلى ٦,٥ ،٧,٢غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة السيطرة البالغة ٥,٦ ،٥,٥غم /١٠٠ مل .

أما معاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A والفلوراميل فكان لها أثرا إيجابيا في خفض معدل البروتين الكلي لذكورالجرذ الأبيض المعاملة به إذ بلغت نسبة البروتين ٦,٥٣ غم /١٠٠ مل مقارنة مع مجموعة

السيطرة البالغة٦,٥٥ غم /١٠٠ مل ، أما معاملة الفلوراميل فقد بلغت نسبة البروتين ٦,٥٤ غم /١٠٠ مل.

جدول (١٢,٤) تأثير سم الأوكراتوكسين A في معدل البروتين الكلي في مصل الدم لذكور الجرذ الأبيض.

المعاملات	معدل مستوى البروتين الكلي غم / ١٠٠ مل
المقارنة	6.55
سم الأوكراتوكسين A	8
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	6.53
الفلوراميل فقط	٦,٥٤
L.S.D.(0.05)	٤,٠٧

٣,٦,٤:تقدير مستوى اليوريا في مصل الدم

أحدث سم الأوكراتوكسين A ارتفاعا في مستوى تركيز اليوريا في مصل الدم لذكور الجرذ الأبيض المعاملة به إذ بلغت٣٤,٨ ملغم /١٠٠ مل مقارنة مع مستوى اليوريا في مجموعة السيطرة البالغة ٢٤,٩٦ملغم /١٠٠ مل (جدول ١٣,٤)،ويعود السبب في ارتفاع اليوريا إلى أن هذه السموم قد تكون أثرت نسيجيا في الكلية وتسببت بضمور واضح في الكبيبات الكلوية وتوسع في النبيبات الملتوية الكلوية مع تنكس (Degeneration) وأنسلاخ واضح في الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية الكلوية هذا بدوره يؤثر في وظائف الكلية ثم يحدث فشلا كلويا مما يؤدي إلى انخفاض عملية طرح المواد السامة ومنها اليوريا وهذا بدوره يرفع من مستويات اليوريا في الدم (Guyton,1986).جاءت نتائج هذه الدراسة مقاربة مع الغزالي وعلي (٢٠١٤) أذ وجدا أن سم الأوكراتوكسين A سبب رفع مستوى تركيز اليوريا في دم الحيوانات المعاملة بها إذ بلغت٣٣ ملغم /١٠٠ مل مقارنة بمستوى اليوريا في دم حيوانات السيطرة والبالغة ٣٠ ملغم /١٠٠ مل ،كما جاءت مقاربة مع ما ذكره البلداوي (٢٠١٢) إذ أشارإلى زيادة حامض اليوريك في بلازما دم الطيور المتعرضة لسم الأوكراتوكسين A ، وفي دراسة أخرى الجميلي والساعدي(٢٠١٢) إذ وجدا أن سموم الأفلاتوكسينات B_1 وB_2 سببت رفع مستوى تركيز

اليوريا في دم الحيوانات المعاملة بهما إذ بلغت ٦٣,٥ و ٥٢ ملغم / ١٠٠ مل على التوالي في حين كان مستوى اليوريا في دم حيوانات معاملة المقارنة ٤١,٣ ملغم / ١٠٠ مل. كما كانت لمعاملة التداخل لسم الأوكراتوكسين A والفلوراميل ذات تأثير في خفض مستوى اليوريا إلى النسب الطبيعية إذ بلغت ٢٩,٣٣ ملغم /١٠٠ مل مقارنة مع معاملة سم الأوكراتوكسين A. أما معاملةالمستحضر الحيوي الفلوراميل فقد بلغ مستوى اليوريا ٢٥,٦٦ ملغم /١٠٠ مل.

جدول (١٣,٤) تأثيرسم الأوكراتوكسين A في معدل مستوى اليوريا في مصل الدم لذكور الجرذ الأبيض .

المعاملات	معدل مستوى اليوريا ملغم / ١٠٠ مل
المقارنة	٢٤,٩٦
سم الأوكراتوكسين A	٣٤,٨
الفلوراميل + الأوكراتوكسين A	٢٩,٣٣
الفلوراميل فقط	٢٥,٦٦
L.S.D.(0.05)	١٧,٩٨

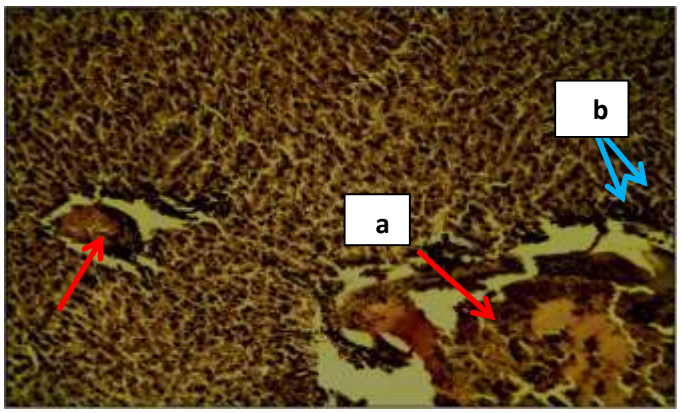
٧,٤:الدراسة النسجية

١,٧,٤ :تأثير سم الأوكراتوكسين A في بعض اعضاء ذكور الجرذ الأبيض

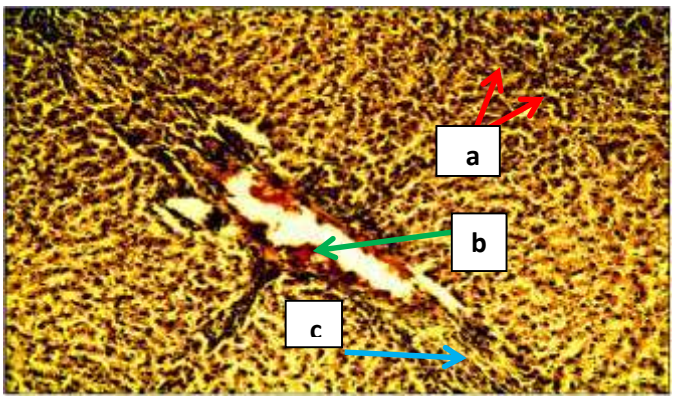
١,١,٧,٤:الكبد Liver

أظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من أكباد ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A وجود تغيرات مرضية واضحة في أنسجة الكبد منها وجود أحتقان شديد في نسيج الكبد مع فقدان الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي ،التوسع واضح في الجيبانيات الكبدية مع تكاثر في خلايا كوبفر(Kupffer cell).أما القنوات الصفراوية يلاحظ فيها فرط تنسج مع أحتقان.

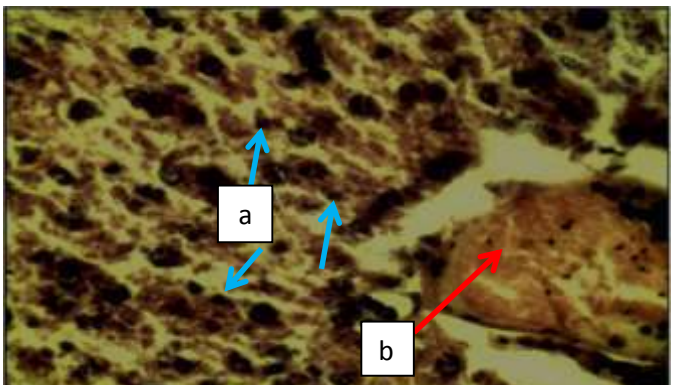
شكل (٣,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض (سيطرة)، (10X H&E)



شكل (٤,٤) مقطع عرضي في كبد ذكور الجرذ الأبيض معامل بسم الأوكراتوكسين A، (10X H&E).a - وجود أحتقان شديد في نسيج الكبد، b– توسع في الجيبانيات الكبدية



شكل (٥,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم الاوكراتوكسينA، (10X H&E)، a- فقدان الترتيب الشعاعي للكبد مع تنكس واضح في الخلايا الكبدية،b- يلاحظ احتقان شديد c- فرط تنسج واضح في القنوات الصفراوية .

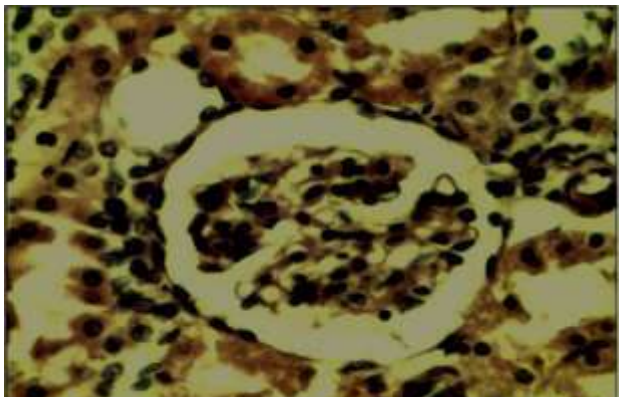


شكل (٦,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم الأوكروكسين A (40X H&E)،a - تكاثر في خلايا كوبفر،b – أحتقان في نسيج الكبد

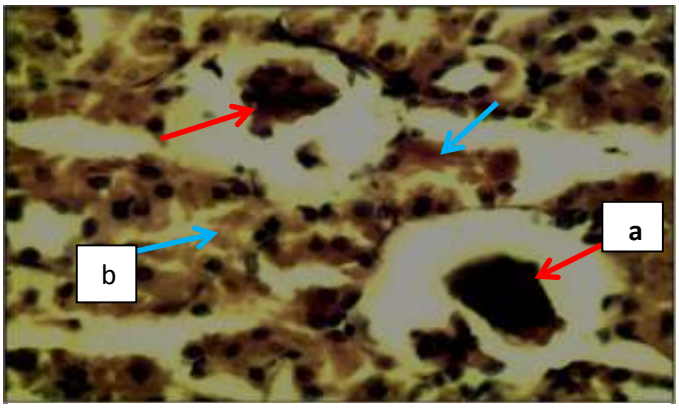
٢,١,٧,٤:الكلى Kidney

تشير نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من كلية ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A وجود تغيرات مرضية في انسجة الكلية تمثلت بضمور واضح في الكبيبات الكلوية

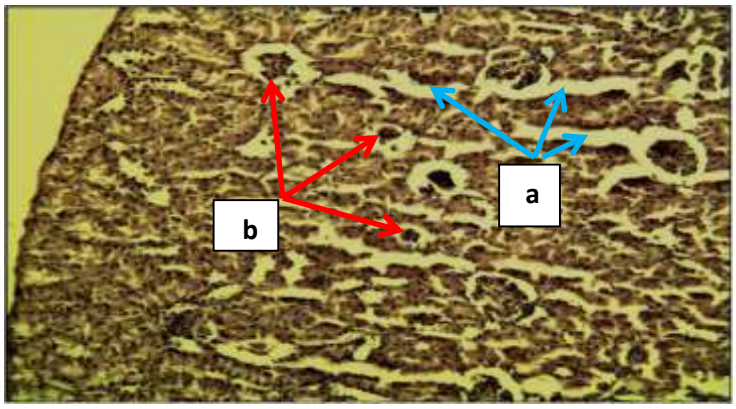
وتوسع في النبيبات الملتوية الكلوية ، تنكس (Degeneration) مع أنسلاخ واضح في الخلايا المبطنة للنبيبات الملتوية الكلوية.



شكل (٧,٤) مقطع عرضي في كلية لذكور الجرذ الأبيض (سيطرة) ،(40X H&E).



شكل (٨,٤) مقطع عرضي في كلية جرذ معامل بسم أوكراتوكسينA ،(40X H&E) ، a- وجود ضمور واضح في الكبيبات الكلويةb- وجود تنكس وانسلاخ في الخلايا المبطنة للنبيبات الكلوية الملتوية.

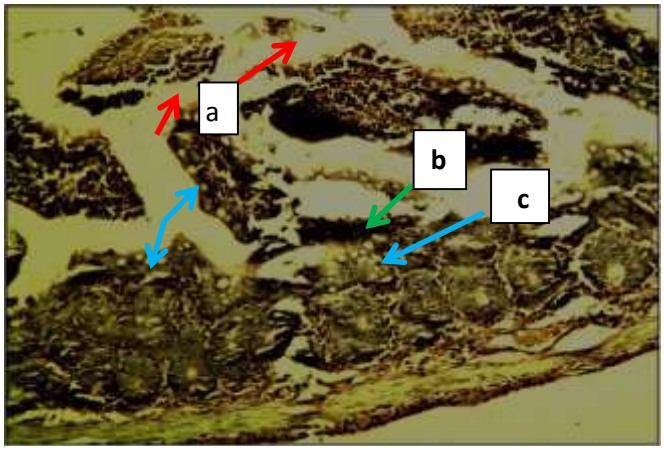


شكل (٩,٤) مقطع عرضي في كلية لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين A ،(10X H&E)، a- ظهور توسع في النبيبات الملتوية الكلوية،b- وجود ضمور واضح في الكبيبات الكلوية.

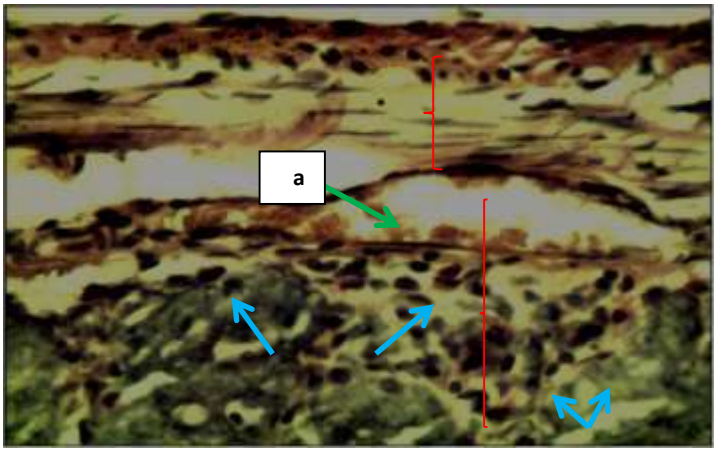
٣,١,٧,٤:الأمعاء الدقيقة Intestine

أحد ث سم الأوكراتوكسين A تغيرات مرضية في انسجة الأمعاء الدقيقة لذكور الجرذ الأبيض من خلال ظهور تحطم في الزغابات مع توسف (Desquemation) ويلاحظ ايضا تكاثر الخلايا الكأسية على طول الزغابات مع أرتشاح واضح للخلايا الألتهابية وخاصة البلعم الكبير(Macrophage)، بعض الزغابات تظهر قصيرة ذات نهايات عريضة والسبب في ذلك يعود إلى ضمور الزغابات (Atrophy) أما الطبقة تحت المخاطية فيظهر فيها أحتقان مع ضمور في الطبقة العضلية الملساء وتثخن في الطبقة المصلية.

شكل (١٠,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكور الجرذالأبيض(سيطرة)،(10X H&E)



شكل (١١,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين A ،(10XH&E) ،a- توسف ،b- وجود تحطم في الزغابات ،c- تكاثر في الخلايا الكأسية على طول الزغابات .



b

شكل (١٢,٤) مقطع عرضي في أمعاءلذكورالجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين A ،(10XH&E) ،a- أحتقان واضح في الطبقة تحت المخاطية ،b- وجود ارتشاح للخلايا الألتهابية وخاصة البلعم الكبير.

أشارت منظمة الصحة العالمية (WHO,1990) إلى أن سم الأوكراتوكسين A يعد من أهم السموم الفطرية المسؤولة عن احداث إعتلال الكلى المزمن (Chronic nephropathy) لدى الأنسان والحيوان وفي ما يخص التأثيرات التي تصيب الأنسان فتشمل أضرار تطال كلّ من الكبد والكلية ومن الممكن أن تؤدي إلى تسرطنهما فضلا عن ذلك فهناك دليل على انه يعمل على تخريب الجهاز المناعي للأنسان (Martello, 2006) فقد سجلت حالات حصل فيها فشل كلوي حاد بعد اربعة وعشرين ساعة نتيجة تناول أغذية ملوثة بهذا السم (Peraica *et al* 1999).

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما ذكره Martello (2006) من أن سم الأوكراتوكسين A يسبب تغايرات نسجية في الكبد قد تؤدي إلى التسرطن.وفي دراسة محلية وجدت الربيعي (٢٠٠٧) أن سموم الفطرين *Penicillium digitatum* و *Penicillium italicum* سببا أحتقان وعائي في الكبد وهذا يماثل النتيجة في هذه الدراسة .

وفي دراسة أجراها الغزالي (٢٠١٤) تسبب سم الأوكراتوكسين A في تأثير شديد في الأمعاء الدقيقة لذكور الجرذ الأبيض تمثلت بوجود تحلل خلوي ووجود ملحوض للخلايا الألتهابية في مناطق متعددة وهي مشابهة للتأثيرات التي حدثت في أمعاء حيوانات الجرذ الأبيض المعاملة بسم الأوكراتوكسين A في هذه الدراسة.

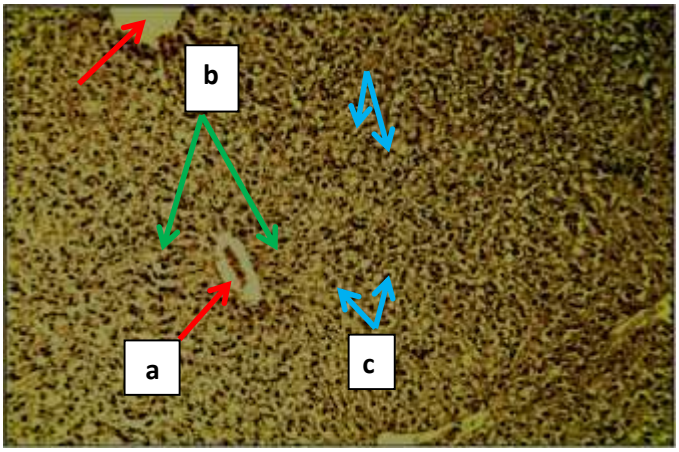
وفي دراسة أجرتها الربيعي (٢٠٠٧) سببت سموم الفطرين *P.digitatum* و *P.italicum* في سقوط الزغابات وتنخرها Necrosis في بعض مناطق الأثنى عشري فضلا عن حدوث احتقان في الأوعية الدموية مع وجود خلايا التهابية وتخريب طبقة الميوكوزا .

٨,٤:تأثير المستحضر الحيوي الفلوراميل في حماية بعض أعضاء ذكور الجرذ الأبيض من سم الأوكراتوكسين A :

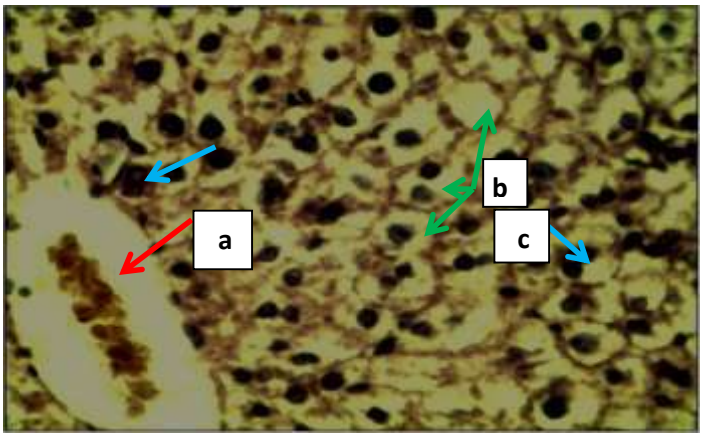
١,٨,٤:الكبد Liver

تشير نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من أكباد الجرذ الأبيض في معاملة سم الأوكراتوكسين A والفلوراميل وجود وريد مركزي طبيعي مع وجود الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية حوله .الخلايا الكبدية تظهر متفجة (Vaculated) مع تكاثر في بعض هذه الخلايا حيث يلحظ الشكل الأنقسامي فيها اذ تظهر بعض الخلايا الكبدية حاوية على نواتين (Binucleated hepatocyte) ،اما القنوات الصفراوية فتظهر طبيعية وغير متكاثرة .

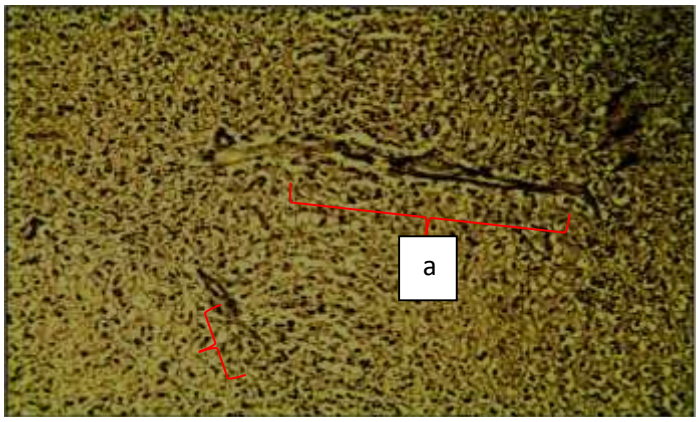
شكل (١٣,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض(سيطرة) (10X H&E)،



شكل(١٤,٤) مقطع عرضي في كبد جرذ معامل بسم ألاوكراتوكسين A + الفلوراميل ،(10XH&E)،a- وجود وريد مركزي طبيعي ،b- ظهور الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية،c- ظهور الخلايا متفجة



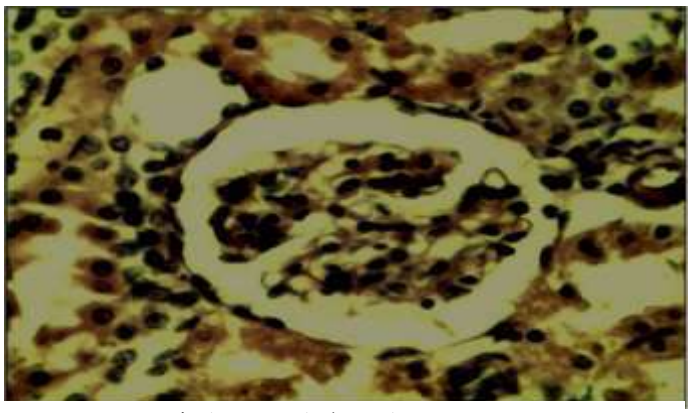
شكل (١٥,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ معامل بسم أوكراتوكسين A + الفلوراميل ،(40X H&E)،a- وجود وريد مركزي طبيعيb- ظهور الترتيب الشعاعي للخلايا الكبدية مع وجود خلايا متفجة ،c- وجود تكاثر في بعض الخلايا بوجود الأنقسام فيها حيث تحتوي على نواتين.



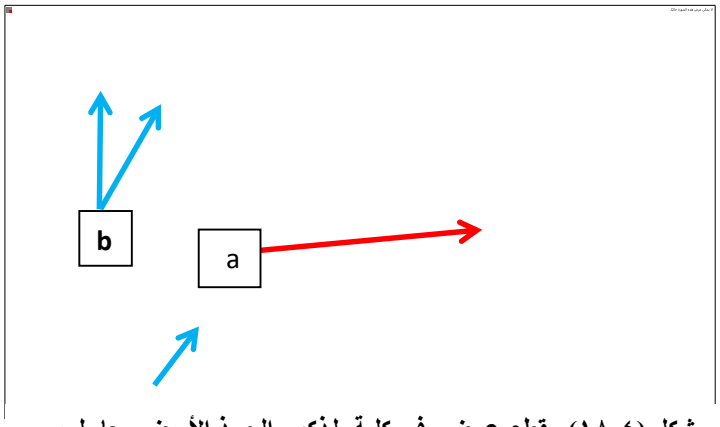
شكل (١٦,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم الأوكراتوكسين A +الفلوراميل،(10X H&E)،a – وجود قنوات صفراوية طبيعية في النسيج الكبدي .

٢,٨,٤:الكلية Kidney

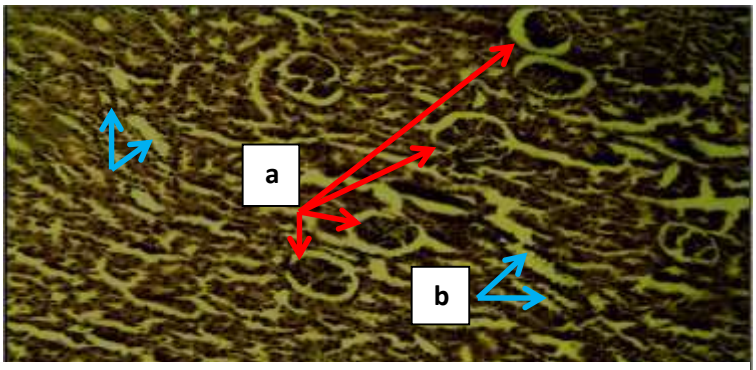
يلاحظ وجود كبيبات متوسعة، مستديرة وطبيعية.التوسع بسيط من النبيبات الكلوية الملتوية مع وجود النبيبات الألفة للحمضة(Tubular basophilia).



شكل (١٧,٤) مقطع عرضي في كلية لذكور الجرذ الأبيض (سيطرة)، (40X H&E).



شكل (١٨,٤) مقطع عرضي في كلية لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين A+الفلوراميل (40X H&E)،a- وجود كبيبات متوسعة مستديرة وطبيعية،b- وجود النبيبات الآلفة للحمضة.



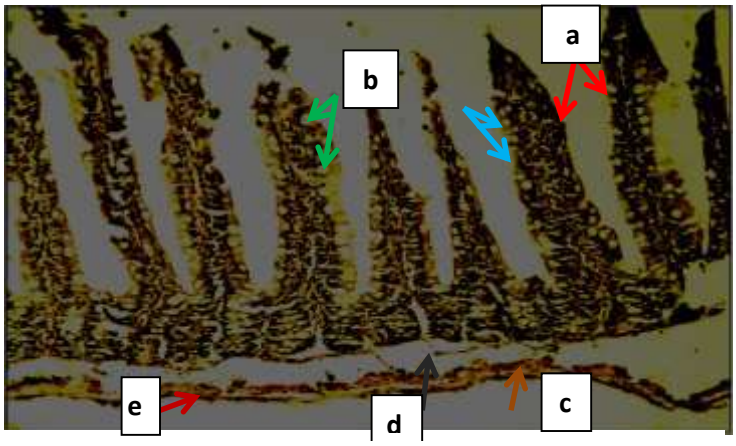
شكل (١٩,٤) مقطع عرضي في كلية لذكور الجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين A + فلوراميل، (10X H&E)،a- وجود كبيبات متوسعة وطبيعية،b- وجودتوسع بسيط في النبيبات الكلوية الملتوية مع وجود النبيبات الآلفة للحمضة(Tubular basophilia) .

٣,٨,٤:الأمعاء الدقيقة Intestin

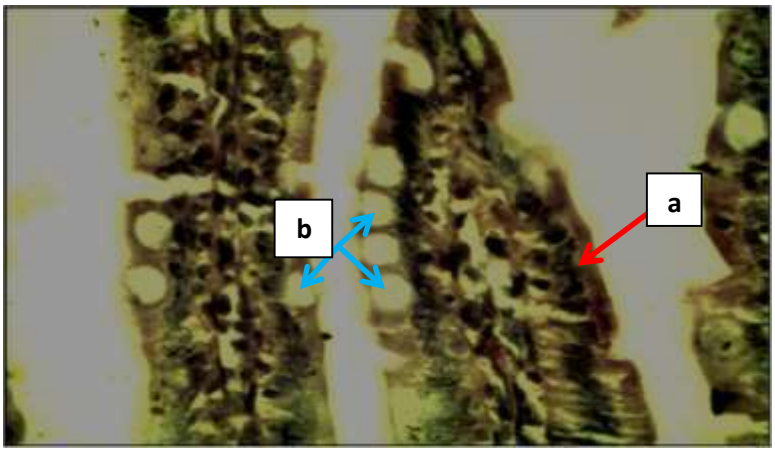
الزغابات طبيعية ذات نهايات مدببة ومبطنة بخلايا عمودية طبيعية مع تكاثر في الخلايا الكأسية الطبقة تحت المخاطية تظهرطبيعية مع ضمور بسيط في الطبقة العضلية ،اما الطبقة المصلية فتظهر نحيفة.

كما كان للمستحضر الحيوي لبكتريا *Psedomonas fluorescens* دور في حماية أعضاء ذكور الجرذالأبيض(الكبد ،الكلية ،الأمعاء الدقيقة) المعاملة بسم الأوكراتوكسين مع المستحضر الحيوي الفلوراميل من الأثار السمية للأوكراتوكسين A مع وجود تغيرات نسجية طفيفة في أعضاء الجرذان المعاملة بها.

شكل (٢٠,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكور الجرذ الأبيض(سيطرة)، (10X H&E)



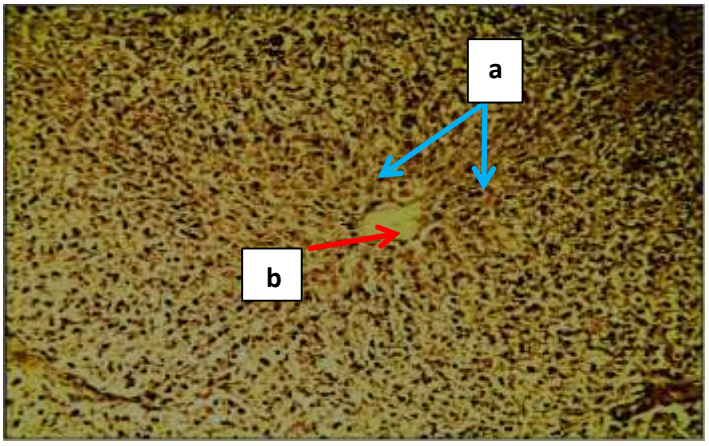
شكل (٢١,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكورالجرذ الأبيض معامل بسم أوكراتوكسين + الفلوراميل ، (10X H&E)،a- ا لزغابات طبيعية ذات نهايات مدببة ومبطنة بخلايا عمودية طبيعية ،b- تكاثر في الخلايا الكأسية ،c – ضمور بسيط في الطبقة العضلية ،d – الطبقة تحت المخاطية طبيعية ،e – الطبقة المصلية تظهر نحيفة .



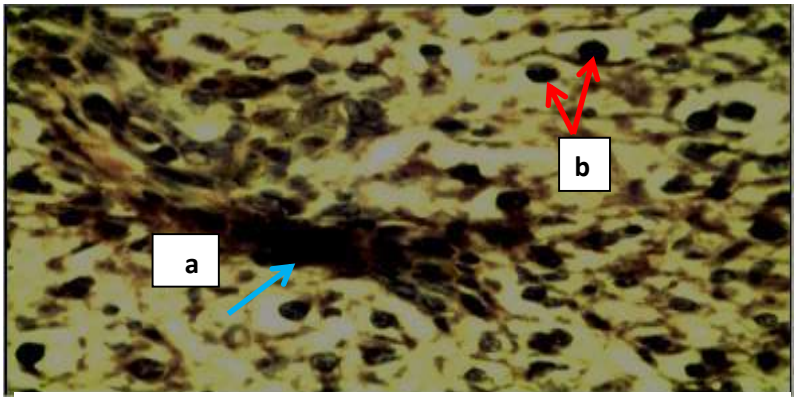
شكل (٢٢,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكورالجرذ الأبيض معامل بسم اوكراتوكسين A،(40X H&E)،a- الزغابات طبيعية ذات نهايات مدببة ومبطنة بخلايا عمودية طبيعية،b- تكاثر الخلايا الكأسية.

أما بالنسبة إلى تأثير المستحضر الحيوي في أنسجة الكبد والكلية والأمعاء الدقيقة فقد أشارت نتائج الفحص والتشخيص المختبري للمقاطع النسجية للأعضاء المذكورة إلى عدم حدوث تغير نسيجي مرضي في معاملة المستحضر الحيوي فقط وهي تماثل المقاطع النسجية لمعاملة المقارنة والتي أشارت إلى عدم وجود تغايرات مرضية وكما موضح في الأشكال.

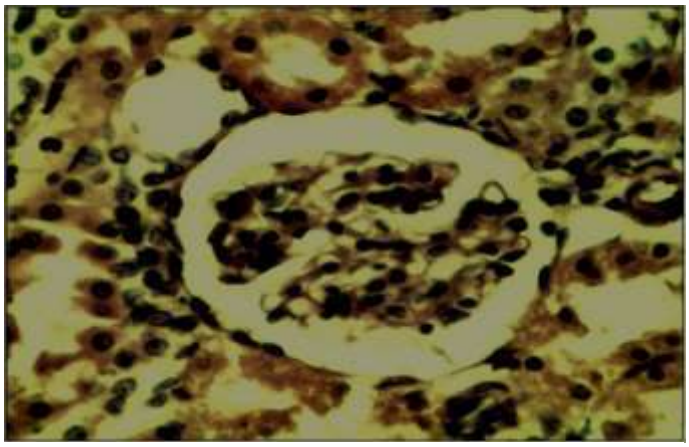
شكل(٢٣,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذ الأبيض (سيطرة) (10X H&E)



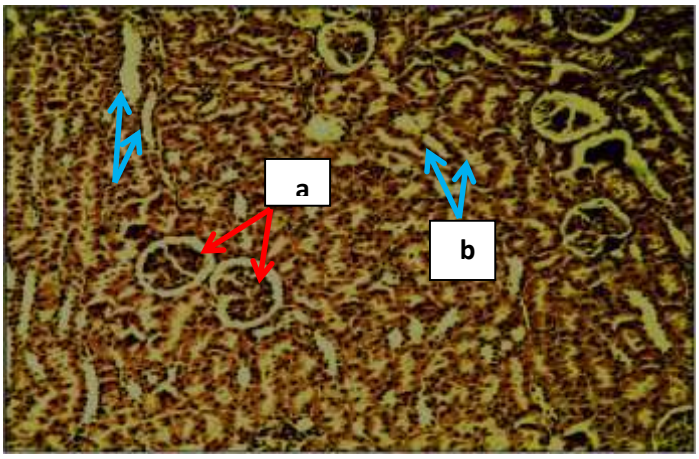
شكل(٢٤,٤) مقطع عرضي في كبد لذكور الجرذالأبيض معامل بالفلوراميل(10X H&E). a - الخلايا الكبدية مرتبة بشكل شعاعي ، b- وجود الوريد المركزي الكبدي .



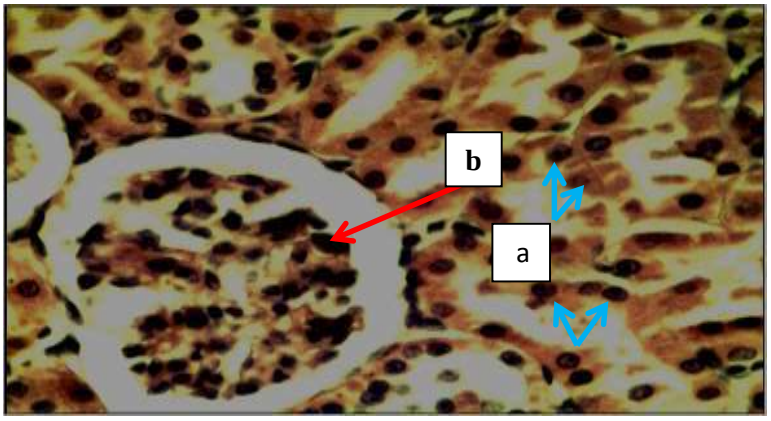
شكل (٢٥,٤) مقطع في كبد لذكورالجرذ الأبيض معامل بالفلوراميل (40X H&E)،a- القنوات الصفراوية تظهر طبيعية وغير متكاثرة ،b- الشكل الهندسي الطبيعي لنسيج الكبد وتظهر الخلايا الكبدية طبيعية وسداسية الشكل .



شكل (٢٦,٤) مقطع في كلية لذكور الجرذ الأبيض(سيطرة 40X (H&E)(

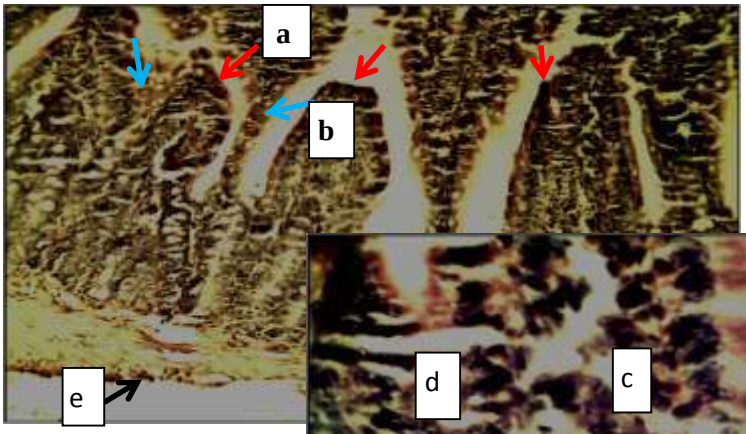


شكل (٢٧,٤) مقطع في كلية لذكورالجرذ الأبيض معامل بالفلوراميل (10X H&E)،a- وجود نسيج كلوي طبيعي حيث تظهر الكبيبات متكاثرة ومستديرة ، b- النبيبات الكلوية الملتوية طبيعية ومبطنة بخلايا عمودية واطئة طبيعية .



شكل(٢٨,٤) مقطع في كلية لذكورالجرذ الأبيض معامل بالفلوراميل ، (40X H&E).a- النبيبات الملتوية تظهر طبيعية ومبطنة بخلايا عمودية واطئة طبيعية .b- نسيج كلوي طبيعي تظهر الكبيبة متكاثرة ومستديرة

شكل (٢٩,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكور الجرذ الأبيض (سيطرة)،(10X H&E)



لـذكورالجرذ الأبـيض معامـل
ابـات متطاولـة ومبطنـة بخلايـا
،c- الطبقـة العضـلية سـليمة
طبيعيـة ،e- الطبقـة المصـلية

شكل (٣١,٤) مقطع عرضي في أمعاء لذكور الجرذ الأبيض معامل بالفلوراميل ،(40X H&E)،a- وجود خلايا كأسية ،b– وجود زغابات متطاولة ومبطنة بخلايا عمودية طبيعية

تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسات أخرى ،حيث أثبتت دراسات سابقة أجريت على المستحضرات الحيوية لبكتريا *Bacillus* spp سلامة تلك المستحضرات من الناحية الصحية فقد أشار العاشور(٢٠٠٥) في دراسة أجراها على المستحضر الحيوي Bacillin المصنع من لقاح بكتريا *B.cereus* المحمل على مادة كاربونات الكالسيوم حيث أثبتت تلك الدراسة سلامة المستحضر صحيا من خلال الأختبارات النسجية التي أجريت على مقاطع الكبد والطحال للأرانب البيض .

وفـي دراسـة أخـرى أجرتهـا الربيعـي (٢٠٠٧) أثبتـت السـلامة الصـحية للمستحضـر الحيـوي Bacitrin AS المتكون من لقاح البكتريا *B.circulans* وكاربونـات الكالسيوم وذلك بتجريع ذكور الجرذان البيض من عالق المستحضر الحيوي وبعد أجراء الفحوصات المختبرية لم تظهر للمستحضر الحيوي أي مؤشرات مرضية أو خطورة على صحة الحيوانات المختبرة .

الأستنتاجات Conclusion

١.سجل الفطر *A.niger* أعلى نسبة تردد في بذور الحنطة أما الفطر *A.flavus* فكان هو الأعلى تردد في بذورالذرة الصفراء.

٢.بلغت نسبة عزلات الفطر *A.niger* المنتجة للسم اوكراتوكسين A ٣٥% من مجموع العزلات المختبرة.

٣. أحتوت جميع العزلات المنتجة للأوكراتوكسين A على الجين *PKS* المسؤول عن أنتاج السم.

٤. تفوق المستحضر الحيوي الفلوراميل على كاربونات الكالسيوم في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A.niger* طيلة فترة الخزن البالغة ٣٠ يوم .

٥. أعطت معاملة التداخل للمستحضر الحيوي الفلوراميل وكاربونات الكالسيوم كفاءة عالية في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A. niger*

٦. أحدث سم الأوكراتوكسين A آثارا سمية عالية فسلجية وكيموحيوية ونسيجية لذكورالجرذ الأبيض.

٧. وفر المستحضر الحيوي الفلوراميل حماية فسلجية وكيموحيوية ونسيجية وكان كفوءا في أختزال سم الأوكراتوكسين A .

التوصيات Recommendation

١.أهمية التثقيف الصحي حول موضوع السموم الفطرية من قبل وزارة الصحة والمؤسسات العلمية لما لها من مخاطر على الحيوان والأنسان لاسيما سم الأوكراتوكسين A الذي هو أحد اسباب الأعتلال الكلوي .

٢.أجراء فحص دوري للأعلاف الموجودة في المخازن للتأكد من خلوها من السموم الفطرية .

٣. توعية أفراد المجتمع حول عدم تناول الأحشاء الداخلية للدواجن والحيوانات الأخرى كالكبد و الكلية لاحتوائها على تراكيز عالية من السموم الفطرية .

٤.ضرورة وضع قوانين تحدد الكميات المسموح بها من السموم الفطرية لاسيما سم الأوكراتوكسين A في الأغذية والأعلاف من قبل الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية .

٥. أستعمال المستحضر الحيوي الفلوراميل لما له من كفاءة في أختزال السموم الفطرية.

٦.أجراء دراسات حول الجينات المسؤولة عن انتاج السموم الفطرية ومنها الجين (*PKS* gene)وتحديد كمية السموم التي ينتجها.

٧.أختبار فعالية الفلوراميل في أختزال سموم أخرى ودراسة الية الأختزال هذه.

٨. أجراء دراسات آخرى لمعرفة آلية تأثير التداخل فيما بين المستحضرات الحيوية والمواد الكيميائية في الفطريات.

٩.أجراء دراسة أخرى حول تأثير سم الأوكراتوكسين A في انسجة أخرى مثل الدماغ للحيوانات المختبرية.

المصادر العربية:

- **إبراهيم ،إسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري (١٩٩٨).** السموم الفطرية ،مركز أباء للأبحاث الزراعية ، الطبعة الثانية ، ٣٤٣ صفحة.
- **أبو هيلة عبد الله ناصر (١٩٨٧).** علم الفطريات ، مطبعة الرياض ،٤٤٧.صفحة .
- **أبو شبع ، رائد علي حسين (٢٠٠٣) .** دورالتأثير السمي للأفلاتوكسينات التي يفرزها *Aspergillus flavus* و*Aspergillus niger* على بعض أنسجة الفأر الأبيض وأمكانية حماية حاصل الذرة الصفراء من الأصابة بهما . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة الكوفة.
- **اسماعيل، عدي نجم. (٢٠١٤).** السموم الفطرية النظرية والمفهوم العام. كلية الزراعة- جامعة بغداد.
- **أنكولد، س.** ت. (١٩٨٠). بايلوجيا الفطريات (ترجمة إسماعيل ، عبد اللطيف سالم). مطبعة جامعة البصرة .٣٣١ صفحة .
- **البلداوي (٢٠٠٩)، منير سعد محسن ، حسين ، حليمة زغير والعادل ، خالد محمد (٢٠٠٩).** فاعلية اليوريا والفايلكس ومساحيق بعض النباتات الطبية في تثبيط نمو نوعين من فطر الأسبرجلس في الأوساط الزرعية . مجلة العلوم الزراعية العراقية .
- **البلداوي ، منير سعيد محسن .(٢٠١٢).** فاعلية بعض النباتات الطبية والمركبات الكيميائية في إزالة وتحطيم سمي الأوكراتوكسين والDeoynivalenol خارج جسم الكائن الحي وفي عليقة طير السمان .أطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد .جمهورية العراق.
- **الجميلي ،سامي عبد الرضا وضياء سالم الوائلي.(٢٠٠٠).**دراسة كفاءة سلالة البكتريا *Pseudomonas fluorescens* pf-5 في مقاومة الفطر *Rizoctonia solani*, *Fusarium graminearum* وزيادة النمو في محصول الحنطة. مجلة البصرة للعلوم الزراعية.٢ (١٣).
- **الجميلي ، سامي عبد الرضا علي . (٢٠١٤).** السموم الفطرية (Mycotoxins) . دار الكتب للطباعة والنشر – العراق ، صفحة ٤٢٣.

- **الجميلي، سامي عبد الرضا وابو شبع، رائد علي حسين. (٢٠٠٥).** تقييم كفاءة بعض العوامل الكيمياوية والحيوية في حماية حاصل الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* . مجلة جامعة كربلاء، العدد الخاص بمؤتمر كلية العلوم ١٦-١٧-٢٠٠٥.

- **الجميلي ،سامي عبد الرضا ونبيل سليم تويج (٢٠٠٦).** تقييم كفاءة بعض المعاملات الكيميائية والأحيائية في حماية درنات البطاطا من الأصابة بالفطر *Fusarium solani* . مجلة البصرة للعلوم الزراعية.٥ (١٤).
- **الجميلي ، سامي عبد الرضا (١٩٩٦).** المقاومة المتكاملة ضد الأصابة بالفطر *Aspergillus Flavus* والتلوث بسم أفلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل . أطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .
- **الجميلي ،سامي عبد الرضا وأبتسام بشير الساعدي .**(٢٠١٢). التحطيم الحيوي لسم الأفلاتوكسين B1 داخل جسم الكائن الحي .مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة.
- **الجميلي ،سامي عبد الرضا علي وعذراء حرجان .**(٢٠٠٦).التأثيرات السمية لحبوب الحنطة المصابة بالفطرين *A.flavus* و*A.niger* في الجهاز التناسلي لأناث الجرذ الأبيض.المجلد (١)العدد(٢).
- **الجنابي، بيداء عبود حسن. (٢٠٠٩).** دراسة التاثيرات السمية للفطر *Aspergillus flavus* في بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية والنسيجية لدى اناث الجرذ الابيض وأمكانية السيطرة على الاضرار الناجمة عنها. رسالة ماجستير- كلية العلوم - جامعة الكوفة.

- **الخلخالي، هدى جميل باقر. (٢٠٠٥).** تقييم كفاءة بعض المعاملات الكيمياوية والحيوية في حماية حاصل البطاطا من الإصابة بالفطر *Fusarium solani* وتاثير راشحه في بعض المعايير الفسلجية والكيموحيوية للدم في ذكور الجرذان. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة الكوفة.

- **الخالدي، بهيجة عبيس حمود. (٢٠١٠).** التوصيف الوظيفي والجزئي لبعض عزلات الفطر *Geotrichum* spp والكشف عن بعض تأثيراتها الوظيفية والنسجية المرضية في ذكور الجرذ الأبيض .أطروحه دكتوراه-كلية العلوم- جامعة الكوفة.

- **الخويلدي ، أحمد جاسم شوالة . (٢٠٠٨) .** تأثير الفطريات المعزولة من البذور والثمار المتعفنة ورواشحهما في إنبات ونمو نباتي الطماطة Lycopersicon esculentum والماش Phaseolus aureus. رسالة ماجستير – كلية التربية – جامعة كربلاء.
- **الراوي ، خاشع الطبعة محمود وعبد العزيز خلف الله .(٢٠٠٠).** تصميم وتحليل التجارب الزراعية، الثانية . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .
- **الربيعي ، عبير فوزي مراد (٢٠٠٧) .**التأثيرات السمية للفطرين *Penicillium aliticum* و *Penicillium digitatum* في بعض المعاييرالفسيولوجية والكيموحيوية والنسجية لذكور الجرذ الأبيض وامكانية السيطرة عليهما في المخزن.أطروحة دكتوراه .كلية العلوم . جامعة بابل .
- **الربيعي ، عبير فوزي مراد . (٢٠١٢) .** الكشف عن الجينات المنتجة لسموم الأوكراتوكسين في عزلات الفطر *A.niger* والفطر *A.flavus* . مجلة جامعة كربلاء للعلوم الصرفة – العدد ١١ ،ص ٣٥- ٤١ .
- **الزيادي ،صبا عبد الأمير كاظم . (٢٠١١).**تقييم كفاءة بعض المستخلصات النباتية والراشح الزرعي لبعض الفطريات في السيطرة الحيوية لنمو بعض الفطريات المرافقة لبذور نباتي الطماطة والباميا . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة القادسية.
- **الطويل ، رؤى عبد جيثوم (٢٠١٤).** تقيم كفاءة بعض القلويدات لنباتي الداتورة والثلثان وتوافقهما مع المبيدات الفطرية في السيطرة على الفطرين *Fusarium solani* و *Alternaria alternata* المرافقين لبذور وجذور نباتي الخيار والباذنجان . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة القادسية .
- **الفهد ،معاذ عبد الوهاب عبد العالي (١٩٩٩). أستخدام** بعض العوامل الأحيائية والطبيعية في حماية محصول الطماطة من الأصابة بذبابة التبغ البيضاء Bemisia tabaci (Genum) وفايروس تجعد وأصفرار أوراق الطماطة Leaf Cural Tomato Yellow Virus (Bigeminiviridae) . رسالة ماجستير – كلية الزراعة جامعة البصرة .
- **العروسي ، حسين وسمير ميخائيل ومحمد علي عبد الرحيم . (٢٠٠١).** أمراض النبات ،منشأت المعارف الأسكندرية.
- **العاني ،فائز .(١٩٩٨).** الأحياء الدقيقة في الأغذية والتقنيات الحديثة في الكشف عنها . قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة أهل البيت،الطبعة الأولى .

- **العاشور،علي جابر جاسم (٢٠٠٥)** .امكانية انتاج مستحضر حيوي من بكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات .رسالة ماجستير – كلية العلوم - جامعة الكوفة.
- **العـــزاوي، بتـــول زينل. (١٩٧٧).** دراســـــة مدى تلوث العلائق الحيوانية بالافلاتوكسين والفطريات المنتجة له والمعزولة منها. رسالة ماجستير- كلية العلوم - جامعة بغداد.
- **العبيـــدي ،أثيـــر باســـل عبـــاس .(٢٠١١).** تصـــنيع مستحضـــر حيـــوي مـــن البكتريـــا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الأفلاتوكسين في علائق الدواجن.أطروحة دكتوراه .كلية العلوم جامعة الكوفة .
- **الغزالـي ،محمـد طالـب بـدر وسـامي عبـد الرضـا علـي . (٢٠١٤)**. دراسـة التـأثيرات السـمية للأوكراتوكسين A المنتج من عزلـة الفطـر *Aspergillus niger* المحليـة فـي بعض المعـايير الكيموحيوية والنسجية لذكور واناث الجرذ الأبيض . مجلـة جامعـة الكوفـة لعلـوم الحيـاة . مقبـول النشر ٣(٤). جمهورية العراق .
- **الكرخي ، عناء داوود خماس (٢٠٠١)**. تأثير بعض العوامل الفيزياوية والحياتية على نمو سلالة CHAO *Psedomonas flurescens* وكفائتها التثبيطية للفطر *Rizoctonia solani*(Kuhn) c المسبب لموت بادرات الطماطة. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة .
- **الكبيسي ، نوري حمد ارزيك (١٩٨٦)** . تأثيركاربونـات الكالسيوم علـى بعض صـفات التربـة الفيزياوية والمعدنية . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة – جامعة بغداد . صفحة ٩٤ .
- **المختـــار ، كواكـــب عبـــد الـــرزاق ، ســـهيلة محمـــود والعطـــار ،عـــدنان عبـــد الله. (١٩٨٢)** .التحضيرات المجهرية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد .٣٣٥ صفحة .
- **الموسوي ،أحمد علي حسين .**(2015) .تأثير بعض المعاملات الحيوية والكيمياوية في السيطرة على نمو أحد الفطريات الممرضة المعزولة من بذور وجذور نبات الطماطة .رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة القادسية.
- **المصلح، رشيد محجوب. (١٩٩٠).** الاحياء المجهرية في الاغذية، الطبعة الثانية. مطابع التعليم العالي في الموصل. صفحة ٥٥٤.
- **الموسوي ،هدى رحيم هاشم (٢٠١٥)**.دراسة علاقة بعض الفطريات وسمومها بحالات الفشل الكلوي غير معروف الأسباب .أطروحة دكتوراه .كلية التربية .جامعة القادسية.

- **الهيتي ,أياد عبد الواحد . (١٩٩٢).**السموم الفطرية –المفهوم العام . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد .ص١٩٠.

- **الهيتي ، أياد عبد الواحد ومحمد عامر فياض وعلي سالم الغالبي (١٩٩٦) .** تطبيق تقنيةالتلقيح البكتيري *Psedomonas flurescens* على نباتات الرز وتأثيره على القدرة الأنتاجية . مجلة اباء للأبحاث الزراعية . ٦(١) : ٧٧ – ٨٣ .

- **الورشان ،سالم حسن وإسماعيل عباس الدليمي وكمال برزان ندا. (٢٠٠٢).** التحري عن الفطريات السامة الملوثة للفواكه المجففة في الأسواق المحلية .مجلة القادسية للعلوم الصرفة ،المجلد ٧،العدد ١، صفحة ٧.

- **بلكرامي ، ك . س . و .ن . ر. وفيرما (١٩٨٨) .** فسلجة الفطريات (ترجمة سرحان ، عبد الرضا طه و فياض محمد شريف) . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل.

- **جبر ،كامل سلمان (٢٠٠٤).** الكشف عن الفطريات المنقولة عن طريق بذور السمسم في العراق وأهميتها الأمراضية ومقاومتها . مجلة العلوم الزراعية ، المجلد ٣٥ ، العدد ٣ :١٠٣- ١١٠ .

- **جاسم ، ناجي سالم (١٩٩٩).** المقاومة الحيوية والكيمياوية لفطر *Fusariu graminearum* Schwab المسبب لمرض لفحة الفيوزاريوم في الحنطة . رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة البصرة .

- **حسن ،بيداء عبود.(٢٠١٢).**دراسة فسلجية للفطرين*Penicillium sp* و*Apergillus niger* المعزولين من فستق الحقل وقدرة بكتريا *Pseudomonas fluorescens* في تثبيط النمو الشعاعي للفطرين موضع الدراسة.مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة – المجلد ٤ الأصدار:١ الصفحات ٦٥ -٧٨.

- **حسين ، حليمة زغير . (٢٠٠٠).** أستعمال اليوريا في مقاومة فطريات ما بعد الجني وسمومها على الذرة المخزونة .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد.

- **حميد، سميرة كاظم ، (٢٠٠١).**تقنية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة CHAO *Psedomonas fluorescence* رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة الكوفة . ٦٦ صفحة .

- **ديوان ، مجيد متعب ويحيى ، عبد الرحمن حسن .(١٩٨٤) .** أمراض النبات العملي . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، هيئة المعاهد الفنية ، العراق .

- **سرحان ،عبد الرضا طه . (١٩٩٥)** . الفطريات المصاحبة للحبوب المخزونة في سايلو

محافظة القادسية مجلة القادسية ،المجلد ، العدد ١٩:٢٤ .

- **سرحان، عبد الرضـا طه؛ محسن، خلدون ياسر وسعدون، عبد الأمير سمير (٢٠٠١).** دراسة كفاءة بذور الحنطة والشعير في عدة مناطق في محافظتي القادسية وواسط. مجلة القادسية، المجلد ٦, العدد ٣: ٨٣-٩٤.
- **سعدون ، عبد الأمير سمير .(٢٠٠٥).**أستخدام مسحوق جذور الجت وهايبوكلورات الصوديوم كبدائل عن أستخدام المبيدات الكيميائية لمكافحة الفطريات المرافقة لبذور الحنطة قبل زراعتها . مجلة القادسية ، المجلد ١٠ ، العدد الخاص ببحوث البيئة.
- **سـود رومنيـك (١٩٩٢).** تقنيـة المختبـر الطبـي . طرائـق وتفسـيرات (ترجمة د. صالح خميس ، د. عبد الرزاق جبار ود. باقر عبيس) . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – بغداد ، العراق.
- **شعبان ،عواد ونزار مصطفى الملاح . (١٩٩٣).** المبيدات .**دار الكتب للطباعة والنشر** ، جامعة الموصل صفحة ٥٢٠.
- **عبد الحميد ،محمد عبد الحميد .(٢٠٠٠).** الفطريات والسموم الفطرية .دار الكتب للجامعات . مصر.
- **عبد الجليل ، عدنان حمد (٢٠٠٤) .** مقاومة مرض تعفن بذور وموت بادرات الطماطة المتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum(*Edson)Fitz. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة الكوفة ،٩٧ صفحة.
- **علـي ،صـادق محمـد وسـامي عبـد الرضـا الجميلـي وصـباح لطيـف علـوان (٢٠١٥).**تقيـيم مستخلص السمسم (الراشي) في اختزال سمية الفطر *Aspergillus niger* في ثمار التمر.مجلة الكوفة للعلوم الزراعية ،المجلد٧ ،العدد٤.
- **علي ،سامي عبد الرضا وسعاد وحيد كاظم (٢٠١٢)** .دراسة التأثيرات السمية لأيض الفطر *Bipolaris holmii* في بعض الأنظمة الحيوية لذكور الجرذ الأبيض . مجلة جامعة الكوفة .كلية العلوم .قسم علوم الحياة .المجلد (٤) العدد (٢).
- **عواد ، كاظم مشحوت . (١٩٨٦) .** مبادئ كيمياء التربة . دار الكتب للطباعة والنشر – جامعة الموصل . ٢٩٦ صفحة.
- **قاسـم ، منـال محمـود (١٩٩٨)** . دراسـة كفـاءة كاربونـات الكالسـيوم ومسـتخلص سـلالة *Pseudomonas fluorescens* pf5 في حماية حاصل الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر L

*Aspergillus flavus*والتلوث بسموم الأفلاتوكسين B1 ،B2 في المخزن . رسالة ماجستير . كلية الزراعة – جامعة البصرة.

- **محمد،ماهر نعيم وعلاء حسن عيدان (٢٠١٦).**التنميط الوراثي لبعض العزلات الفطرية على التغاير في منطقة ITS (internal transcribed spacer) كشفرة وراثية عالمية .
- **محسن ، عذراء حرجان (٢٠٠٦).** دراسة التأثيرات السمية لبذور الحنطة الملوثة بالفطرين *A. flavus* و *A.niger* في الجهاز التناسلي لأناث الجرذ الأبيض وأمكانية السيطرة عليها في المخزن. ٦٨ صفحة .
- **ميخائيل ، سمير وتركي بيدر (١٩٨٢).** أمراض البذور ،دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .
- **مطوق ، زهراء يوسف خضير (٢٠٠٥).** تأثير بعض الفطريات في معايير الدم الفسلجية والتغيرات النسيجية المرضية للجرذ الأبيض ودور المبيد الحيوي الفلوراميل في حماية حاصل الرز من الأصابة بها . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة الكوفة .
- **مرجان ، علي فاضل رزوقي .(٢٠٠٦) .** المكافحة المتكاملة للمسببات الفطرية المرافقة لبذور الذرة الصفراء . رسالة ماجستير / قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة بغداد.
- **نخيلان ،عبد العزيز مجيد (٢٠١١).** السموم الفطرية Mycotoxine دار دجلة ،عمان– الأردن ،ط١،ص ٣٢٠.
- **وهبة ، ناهدمحمد والنسر ،نيفين عبد الغني .(٢٠١٠).** السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها ،الخطر والوقاية . مجلة أسيوط للدراسات الحديثة ،العدد الرابع والثلاثون.

المصادر باللغة الأنكليزية

- **Abbas, H. K.; C. J. Mirocha, R. A.; Meronuck, J. D.; Pokorny, S. L.; Gould, and Kommedahl, T. (1988).** Mycotoxins and *Fusarium* spp Associated with infected Ears of corn in Minnesota. Appl . Enviromental . Microbiology. 54 (8): 1930 – 1933.

- **Abbott,W.S. (1925).** A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology – 18 :265- 267.

- **Abdel Wahhab , M .A.(1999)** .Ochratoxicosis Prevention of Developmental toxicity by L- methionine in rats .J.Appl.Toxicol .19:7-12.

- **Abedelhamid ,A. M .; Hala , S. M . and Dorra .S . M.(1995).**Effect of Some Dietary Supplement to Aflatoxic Diets of Chickens .J . Agric .Sci. Mansoura Univ .20(7):3227-3250.

- **Agarwal, V. K. and Sinclair, J. B. (1997).** Principles of Seed Patholgy.2nd .LEWS Publishers, CRC Pres, Inc. pp.539.k .

- **Agrios, G. N .(2005).** Plant pathology . 5th. Ed., pp: 948. Academic press, New York **.**

- **Aldera, G. A. (2005).** Trichothecene toxins in different ages in Chiken. Journal of food composition and analysis. 6(7): 24-26.
- **Amara, M. A. Robie; K. A. and Talkham, A. (1996).** Activity of *Pseudomonas flourescens* mutant in relation to growth regulators production and biological control in tomato plant. Annals of Agriculture Sciences Cairo. 41(1): 111-124 . (Abstract).
- **Asao, T.; Buchi, G.; Abdel-Kader, M.; Chang, S. B.; Wick, E. L. and Wogan, G. N. (1963).** Aflatoxin B and G . J. Am. Chem. Soc., 85: 1706-1707.
- **Asker, A. A. (2004).** Physiological effect of aflatoxins on production and reproduction of rabbits. Review Articles Zagazig University.pp,12-14.
- **AST, D. A. (2003).** Survey of mycotoxin effects animals in an area of South west Germany .Mycopathologia. 147 (1): 49-57.
- **Baily, C. A.; Gibson, R. M.; Kubena, L. F.; Huff, W. F. and Harvey, R. B. (1989).** Ochratoxin A and Dietry Protein. Effects on hematology and Various clinical Chemistry measurements. Poult. Sci. 68: 1664.
- **Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1982).** Theory and Practice of Histological technique. Churchill Living stone, New York.pp, 117.
- **Barkai – Golan ,R. and Paster ,N.(2008).** Mycotoxin in fruits and vegetables ,Academic press is an imprint of Elsevier ,PP.395.
- **Barnett, H. L. and Barry, B. H. (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi . 3rd ed. Burgess publishing compamy.

- **Bauer, J.; Niemiec, J. and Scholtyssek, S. (1988).** Ochratoxin A in Legehennen Futter. 2. Mitteilung: Ruckstaande In serum, Leber und Ei,Arch. Ge fluegelked 52:71.

- **Belgin , M .; Ozlem , K. and Halukcelik ,T.(2004).** Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA. Food control . J.15(1):45 – 49.

- **Bendele, A. M.; Neal, S. B.; Oberly, T. J.; Thompson, C. Z.; Bewsey, B. J.; Hill, L. E.; Rexroat ,M. A.; Carlton, W. W. and Probst, G. S. (1985).** Evaluation of Ochratoxin A for mutagenicity in a battery of Bacterial And mammalian cells assays. Food Ch-em. Toxicol., 23:911-918.

- **Benkerroum, S. and Elaraki, T. A. (2001).** Study of toxigenic moulds and Mycotoxin in poultry feed.Review.Med.Vet.,125(4):335- 342.

- **Bennett , J.W. and Klich ,M.(2003).Mycotoxins** . Clin.Micrrobio.Rev .16:497- 516.

- **Beretta, B.; Dedomenico, A.; Gaiaschi, C.; Ballabio, C. L.; Galli, C. and Restani, P. (2002).** Ochratoxin A in Cereal- based baby Food : Occcurrence and safety evaluation. Food Additives and Contaminants 19 :70 –75 .

- **Biggs, A. R.; El-koholi, M. M.; El-Neshawy, S. and Nickerson , R. (1997).** Effect of calcium salts on growth polygalacturonase activity , and infection of peach fruit by *Monillinia fructicola*. Plant Dis., 81: 399-403.

- **Bodine, E. H. and Mertens .(2004).** The effect of Ochratoxin on mature Rabbits, Mycopathologia .12 (4): 12-14.

- **Brown ,B .A.(1976).**Hematology :Principles and procedures .2nd-ed .,Lea And Febiger .Philadelphia .

- **Calori –Domingues ,M.A.and Fonseca , H.(1995) .**Laboratory evalution Of chemical control of aflatoxin production in unselled peanuts (Arachis hypogarca L) Food additives and contaminating . 12 : 334- 350.

- **Casino, A.S.; Goins , T .D. and Walker ,M. E . (1984) .**Involvement of nutrition and fungi in the peanut pod rot complex . Plant Dis ., 68:65 – 67.

- **Cast, H. (2003)**. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. (Council for Agricultural Science and Technology).Task Force Report,Ames low, USA, No. 139, PP: 45-60.

- **Chang, S. B. ; Abdel-Kader, M.M. ; Wick, E.L. and Wagon, G.N. (1963).** Aflatoxin B2 :Chemical identity and biological activity Scince. 142:1191-1192.

- **Ciegler,A. B.;Ve sconder,H. R. and Hesseeltine,C.W. (1981).** Mycotoxins and N-nitoso compound: Environmental risks. (Shank, R. C.Ed). (RC. Press Vol.1: 1-15).

- **Clark , F.E. (1965).**Ager – plants methods for microbial (C.F:Black,1965 Methods of soil snslysis .part 2 publisher madeson , Wisconsing UAS .Pp1572).

- **Christensen ,C.**M.(1965) .Fungi in cereal grains and their products in food stuffs . Press . Cambridg . Massachusetts.

- **Cocker,R.D.;Jones,B.D.;Nagler,M.J.;Gillman,G.A.;Walbridge,G.A. And Pangrahi, A.J. (1984).**Mycotoxin training manual tropical development And research institute overseas development,p.35.

- **Cole, K. E. ; Hsu, I. C. and Trump, B.F. (1986).**Comparative Ultastural effect of aflatoxin B1 on mouse , rate and human gepatocytes in primary culture .Cancer Research . 46:1290-1296 .

- **Cole, R. J. and Cox. R. H. (1981).** Handbook of toxic fungal metabolites. Academic. press,NewYork.pp,233-256.

- **Collee,J.G.Fraser , A .G.Marmion ,B .P. and Simmons, A.(1996).**Parctical Medical Microbiology .14thed .Makie and MaCarthy,Pearson Professional Limited.

- **Creppy, E. E. (2002).**Update of survey,regulation and toxic effects of Mycoyxins in Europe. Toxicol.Lett. 127(1-3):19-28.

- **Creppy, E. E.; Stormer, F. O.; Roschenthaler, R. and Dirheimer, G. (1983).** Effect of two metabolites of ochratoxin A (4R) -4-hydroxy-Ochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice. Infect. Immun., 39:1015-1018.

- **Dixit ,S.N.and Tripathy , S.C.and Upadhyey ,R.R.(1976).**The antifungal Substance of flower (*Rose indica*).Economic Botany .30pp:71-73.

- **Domusch,K.H.;Games ,W. and Anderson ,T.(1980).** Compendium of Soil Fungi Academic press ,p.85.

- **Duarte,S.C.; Lino, C.M. and Pena,A .(2010)**. Mycotoxin food and feed Regulation and the specific case of Ochratoxin A , Food Additives & Contaminants , 27 (10) : 1440- 1450 .

- **Duffy, B.K. and Defago ,G .(1997).**Zinc improves biocontrol of Fusarium Crown and root of tomato by *pseudomonas flurescens* and represses The Production of pathogen betabolites inhibitory to bacterial Antibiotic biosynthesis .Phytopathology ,87:1250 – 1257.

- **Duijff**, **B. J. (1994).** Suppression of *Fusarium* wilt by *Pseudomonas spp.* mechanism, influences of environmental factors and effects on plant iron nutrition. Univ. Utrecht Press. Netherlands. pp.95.
- **Eaton, D. L. and Gallagher,E.P.(1994).**Mechanisms of aflatoxin Carcinogenesis. Annu, Rev, Pharmacol.Toxicol.34(5):135-172.
- **Ellis , D .H.(1994).**Clinical mycology. The human opportunistic mycoses Gillingham printers Ltd . Australia .pp:166.
- **Ellis , D.Davi ,S . Alexiou ,H .Handke ,R .and Bartly , R .(2007).**Description of medical fungi.2nd.ed . Adelaide .Australia.
- **EMAN, European Mycotoxin Awareness Network . (2011).** Fact Sheet 1 Ochratoxin A. www.emanleatherheadfood.com .
- **Erik, D. (2004).**Mycotoxin Regulation,Implication for International Agricultural Trade. Economic research service,United State Department of Agricultural .
- **Esser, K. and Lemke,P.A.(1996).**Series preface.In D.H.Howard and J.D. Miller (Eds).The Mycota. Vol. Vl. Springer Verlag. Berlin, Germany.
- **Ezekiel, C. N.; Odebode.; Fapohunda,G.O.; Tayo,O.J.; Olawuyi, O.B. and Adeyemi, O. O. (2011).** Toxigenic Potential of Co- occurring Aflatoxin and Ochratoxin A Detected in Poultry feed on Clarias Gariepinus Larvae . Nature and Science , 9 (5) : 186- 192 .
- **FAO, Food and Agriculture Organization. (1999).** Prevention mycotoxin contamination. Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP concept .23:49.

- **FAO, Food and Agriculture Organization.(2003).** Worldwide regulations For mycotoxins in food and feed. FAO Food and Nutrition Paper 81.

- **FAO, Food and Agriculture Organization.(٢٠١١).**Mycotoxins , Food Safety and Quality. www.fao.org

- **Forbish, R. A.; Bradley, B.D. ; Wagner, D.D.; Bardly, P.E. and Hairston, H. (1986).** Aflatoxin residues in milk of dairy Cows after ingestion of Naturally contiaminated grain . J. Food Prot. 44: 781-785 .

- **Fung, F. and Clark, R. (2004).**Health effect of mycotoxins: Toxicological. Overview. Toxicol; 42:217-234.

- **Gallagher, J. C. (2003).** Antifungal pharmmaco therapy for invasive Mould infections .Expopin pharma .cother.4:147.

- **Galtier ,P.;Comguilhim,R.and Bodin,G.(1980).** Evidence for invetro And invivo interaction between Ochratoxin A and three acidic drugs,Food Cosmet .Toxicol.18:493-6

- **Gareis ,D.M.;Samson,R.A.;Varga,J.;Rokas,A.**and Witiak,S.M**.(2008).** Areview of molecular phylogenetics in *Aspergillus* ,and prospects for a Robust genus–wide phylogeny.In:*Aspergillus* in the Genomic in *Aspergillus* , and Samson ,R,A.,eds.(Netherland:Wagening Academic Pubs),PP.17 -32.

- **Gareis ,M .and Scheuer ,R .(2000).**Ochratoxine A in meet and Products .Archiv fur Lebensmittelhygiene 51:102 – 104.

- **Garrido, N. S.; Iha, M. H.; Santos, M. R. and Duarte, R. M. (2003).** Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirao Preto –SP, Brazil. Food Addit.Contam.20:30-70.

- **Gherbawy ,A. Y ;H .M . Elhariry and A.S Bahobial.(2012).** Mycobiota And Mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxins) Associated With some Saudi Date Palm Fruits Food Born Pathogens and Disease.9(6): 561-567.
- **Girija, G. and Kumar, A. M. (2005).** *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases, Journal of Plant Interaction, 1: 123-134.
- **Glavits, R. and Vanyi, A. (1995).** More important mycotoxicoses in pigs, Comprehensive clinicopathological communication. Hungarian Magyar Allatorvosok lopja. 50(7): 407-420.
- **Govan, J. R. W. (1997).** *Pseudomonas* of non fermenters In: Sreen Wood, D. Slack, R. F. Peuther, J.(eds). Medical Microbiolgy A Guide to Microbial Infections, Pathogenesis, Immunity , Laboratory Diagnosis of Control, 15th ed. Churchill Living Ston, Tokyo. P.284-289.
- **Groopman ,A.M.;Stevan,M.A. and Cole , M.N.(2003)**.Astudy about Effect of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* in cheicken ,Journal.45(9):5-12.
- **Guyton,A.(1986).**Text book of medical physiology .7th Ed . W.B . Saunnders Company.
- **Hamilton, P. B.; Huff, R. D.; Wyatt and Harris, J. R. (1982) .** Natural occurrence of Ochratoxicosis in poultry. poult . Sci. 61: 1832 – 1841.
- **Hartley, R.D. ; Nesbitt, B.F. and O'kelly, J. (1963).**Toxic metabolites of Veterinary toxicology . Litte Rock, Arkansas, USA .PP.231-235 .
- **Harvey, R. B.; Elissalele, M. H.; Kubena, L. F.; Weaver, E. A.; Corrier, D. E. and Clement, B. A. (1992).** Immunotoxicity of ochratoxin A to Growing gilts. Am. J. Vet. Res., 53: 1966-1970.

- **Hawcksworth, D. L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: Biodiversity: Magnitude, Significance, and Conservation.. Mycol. Res 95:641–655.

- **Haworth, S. R.; Lawler, T. E.; Zeiger, E. and Park, D. L. (1989).** Mutagenic potential ammonia-related aflatoxin reaction ptoducts in a model system.J. Am.Oil Chem.Soc.66:102-104.

- **Hendry,KM.and Cole,EC.(1993).**Areview of mycotoxins in indoor air .Toxicology and Enviromental health .38(2):183-198.

- **Henry, S. H.; Bosch, F. X. and Bowers. J. S. (2001**). Aflatoxin,Hepatitis And worldwide liver cancer risk.Adv.Exp.Med.Biol.504:229-333.

- **Heroshi ,A.;Dayi.;Makota,M.;Yukihiro ,G.and Masatake ,T.(1997).**A Rapid analysis of Ochratoxin A in coffee beans and cereals.J.Food Hyg.Soc.Japan. 38:406 – 561.

- **Hoking ,A. D and Pitt , J.I.(1997).**G Fungi and food spoilage (second) Shampan and Hill .UK.pp989.h.

- **Huwing ,A .; Freimund , S. ;Kappeli ,O. and Dutler , H . (2001).** Mycotoxins detoxication of animal feed by different adsorbents . Lett **.** 122:179 – 188.

- **IFST, Institute of Food Science and Technology. (2006).** Institute of Food Science and Technology Information Statement Mycotoxins. pp:34-89.

- **Jawetz,C.; Melink,A.; Adelbengs,S.; Brooks,G.; Butei,J.and Morse,S. (2004).**Medical Microbiology .20th ed .Exclusive rights by McGraw Itill .Eduction (Asia).

- **Jorgensen ,K.; Rasmussen , G.and Thorup ,I.(1996).**Ochratoxin A in Danish Cereals 1986 – 1992 and daily intake by the Danish population . Food add it Contam.13:95 – 104.

- **Jouany, J. P.; Yiannikouris, A. and Bertin, G. (2005).** The chemical Bonds between mycotoxins and cell wall components of animals have Been identified. Research Centre of Clermont-Theix. France.pp:78-90.

- **Kabak, B. (2012).** Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation. Food Control , 26 (1): 182-187.

- **Kane,A.;Creppy,E.E.;Rochenthaler,R. and Dirheimer,G.(1986).** Changes in urinary and renal tublular enzymes caused by subchronic administration of ochrotoxin A in rats. Toxicology, 42:233-243.

- **Koller ,W.C; Allan ,C.R, and Kolahukudy ,P.E .(1982)** .protection of *Pisum sativum* from *Fusarium solani* .f.sp *bpisi* by inhibition of cutinase Phytopathology.,72: 1425-1430.
- **Kown- Chung, K. J. and Bennett, J. E. (1992).** Medical Mycology. Lea. and Febiqer. 745Pp.MoubPress.
- **Krishnamachari, K. A. V.; Bhat, R. V.; Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G. (1975).** Investigation into an break of hepatitis in part of western India .India J.Med.Rej . 63 :1036 – 1048.

- **Krogh,P . (1987).** Ochratoxin in Food .Mycotoxin in Food , edited by P Krogh .Academic Press London . p.p 79-121.
- **Kubena ,L.F.;Harvey ,R.B.;Corrier ,D.E.and Huff ,W.E.(1997).**Effect of Feeding (DON,Vomitoxin)- contaminated wheat to femal white leghorn Chicckens from day old through egg production . Poult .Sci.,66:1612- 1618(Medline).

- **Lai ,M.;Semeniuk ,G.and Hesseltine,C.W.(1970).** Condition for Mycotoxin Ochratoxin A by Aspergillus species in synthetic medium .Appl.Microb.19:542-544.
- **Leeman, M. (1994).** Supperssion of *Fusarium* wilt of radish by Fluorescent *Pseudomonas spp*. Induction of Disease Resistance, Co-inoculation With Fungi and Commuercial Application.Univ. Utrecht Press, Netherlands.118 pp.
- **Leisinger, T. and Margraff, R. (1979).** Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonas*. Microbiol Rev. 43: 422-442.
- **Leslie, J. F and, Summerell B. A.(2006).** The *Fusarium* Laboratory Manual. Photographs by Suzanne Bullock .
- **Mac Donald , S . Wilson ,p .; Barnes , K . ; Damant.;Massey ,R .;Mortby ,E .;Shepherd,M.(1999).**Ochratoxin A in dried fruit : method Development and Survey . Food .addit .cntam .16:253.
- **Macfaddin , J.F.(2000).**Biochemical tests for identification of medical Bacteria .(3rd ed) . Williams and willkins company .USA.,pp.912.
- **Madhyasta , S.M.;Marquardat , R.R.;Frolich ,A.A.;Plantford ,**G .**and Abramson ,D.(1990).** Effect of different cereal and oil seed substrates on the growth and the productions of *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium* Verrucosum.J.Agric. Food Chem.38:1506 -1510.
- **Makun, H . A.,S. T.Anjorin ,B. Moronfoye ,F.O. Adejo,O .A. Afolabil ,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.
- **Manolova, Y.; Manolov, G.; Parranova, L.; Castegnaro, M. and Chernozemsky, I.N. (1990).** Induction of characteristic chromosomal Abrrations, particularly X-trisomy, In cultured human lymphocytes

Treated by ochratoxin A, amycotoxin implicated in Blakan endemic Nephropathy. mutat.research, 231:143 - 149.

- **Mantle,P.G. and Chow,A. M.(2000).** Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference To spoilage of Coffee . International Journal of Food Microbiology 56: 105 – 109 .

- **Marasas,W.F.and Nelson,P.E.(1986).**Mycotoxicology, the Pennsylvania State university press ,university park.

- **Marin,D.E.;Taranu, I. R.;Bunacin,F.; Avram,N.;Sarca,M.; Cureu,I.; Criste, R. D.; Stuta, V. and Oswald, I. P. (2002).** Changes in performance, blood parameters , humoral and cellular immune Responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. J. Anim. Sci., 80: 1250-1257.

- **Marquardt ,R.R.and Frohlich ,A.A.(1992).**A review of recent advance In Understanding Ochratoxicosis .J.Anim Sci.70:3968-3988.

- **Martello,N.(2006).**Mycotoxins list (Articals).Biological decontaminat Resource center .United States.pp,12-45.

- **Meerdink,G.L.(2004).** Aflatoxins. In: Plumlee, K. H. (ed.). Clinical Veterinary toxicology. Little Rock, Arkansas, USA.pp:231-235.

- **Meisner,H.and Krogh ,P.(1986).** Phosphoenol pyrovate carboxikinase as A Selective indicator of Ochratoxin A induced nephropathy .Dev .Toxicol .Environ.Sci . 14:199.

- **Meulenberg, E. P. (2012)**. Immunochemical Methods for Ochratoxin A Detection: A Review, Toxins,4 : 244- 266 .

- **Mohiudin, S. M.; Warasi, S. M. A. and Reddy, M. V. (1993).** Haematological and biochemical chouges in broiler chicken. India. Vet. J., 70: 613-617.

- **Moss,M.O.(2002).**Mycotoxin Review - 2. *Fusarium*.Mycologist.16 part.p:45- 70.

- **Moustafa, A. F. (1982).** Taxonomic studies on the Fungi of Kuwait. J. unit. Kuwait. (Sci)., 9: 245-260.

- **Mukherjee,B.and Sen ,C.(1992).***Aspergillus* and *Penicillium* species Potential agent for biocontrol of *Macrophomina phaseolina*.Indian phyopath 45:39 – 43.

- **Northolot ,M.D.;Van Egmond ,H.P.and Paulsch ,W.E.(1979b).**Pencillic Acid Production by some fungal species relation to water activity and Temperature .J.Food Prot.12:485 – 490 .

- **Northolt,M .D.;Van Egmond,H.P.and Paulsch, W.E(1979a**). Ochratoxin A Production by some fungal species relation to water activity and Temperature .J.Food Prot.42:485 – 489.

- **Nwagu ,T . N .T . and F.S.Ire.(2011).**Ochratoxin in Cocoa, Health Risks and Methods of Detoxification, Int. J. of Agr. Res., 6 : 101- 118.

- **Perica,M.;Radic,B.; Lucie,A. and Pavlovic,M.(1999**).Toxic effect of mycotoxin s in human .Bulletin of The World Health Organization.

- **Peterson, D. S.; Hasan, D. E. and Tessier, C. H. (2001).** Aflatoxins in Food. An. Food Contami. 14:23-34.

- **Peterson, D. S.P.(1978).**Aflatoxin metabolism.InThomas,D.W.and Lawrence ,G.M.,Eds Mycotoxic fungi ,mycotoxin mycotoxicosis ,and

Encyclopedic handbook .V.I, Marcel Dekker,Inc.,New York ,p.p.151-174.

- **Pitt ,J.I and Hocking ,A.D.(1985).**The genus Aspergillus Fungi and Food Sopoilage .Academic Press ,Sydney,Australia.

- **Pitt ,J.I and Hocking ,A.D.(1997).**Fungi and food spoilage (second ed.) Shampan and Hill . U.K.PP:889.

- **Poapolathep, A.; Sugita-Konishi, Y.; Phitsanu, T.; Doi, K.and Kumagai, S.(2004).** Placental and milk transmission of trichothecene mycotoxins, Nivalenol and fusarenon-X, in mice. Toxicon 44(1):47-98.

- **Prescott,M.; Harley ,P. and Klein ,A.(2001).**Microbiology 2nd ed.,Printed in the united states of America by Wm.C.Brown communication .Inc .,2460 kerper ,Boulerard ,Dubuque.
- **Raaijmarkerrs**, **J. M. (1994).** Microbiol Interactions in The Rhizosphere Root Colonization by *Pseudomonas spp*. and Suppression of *Fusarium* Wilt. Univ. Utrech Press. Netherland. PP.126.
- **Raddy ,C.V.(1992).**Aflatoxins in feed :an enemy to poultry producers in The topics .Misset – World – Poultry .,8:19- 22.

- **Radovanovic, Z.; Jankovic, S. and Jevremovic, I. (1991).** Incidence of Tumors of urinary organs in a focus of Balkan endemic Nenpropathy.Kidney Int.34(Supp), 75-76.

- **Raper , K . B. and Fennel ,D . I. (1965) .**The Genus Aspergillus. Williams and Wilkins Company , Baltimore . pp686.

- **Ribes ,J.A.; Vanover –Sams,C.L.and Baker ,D.J.(2000).**Fungi and human Diseases. Clin.Microbiol .Rev.2000 ;13:236.

- **Rovira, A. B. and Sands, D. C. (1971).** Fluorescent *Pseudomonas* a residual component in the soil microflora. J. Appl. Bacteriol., 34: 252-259.
- **Salvaggio ,J . I.(2006).**Extrinsic allergic alveolitis (hypersensitivity -pneumonitis): Past , Present and future . Clin . EXP . Allergy 27 :18 – 25.
- **Sambrook ,J.and Russell , D.W.(2001)**Molecular cloning A laboratory Manual .3th ed .cold spring Harbor (NY) :cold spring Harbor Laboratory Press , N.Y.
- **Samson ,R.A.and Vagara, T.(2008).** *Aspergillus* systematic in the Genomic Eral Utrecht :CBS fungal .biodiversity center.
- **Sargeant ,k . ; Scheridan , A.; Kelly ,J .O. and Carnaghan, R.B.A.(1961).** Toxicity associated with certain samples of groundnuts.Nature.,192:1096 – 1097.
- **Scott,D.B.(1965).**Toxigenic Fungi isolated from cereal and legume Products Mycopath . Mycol . Appl . 25: 213 – 222 .
- **Shakere, P. S. (2007) .**Effect of toxiroak polyherbal feed supplement During induced aflatoxicosis,Ochratoxicosis and combind mycotoxicosis in broilers.Vet. Arhiv., 77:129-146.
- **Shotwell, O.; Hesseltine, C. W. and Goulden, M. (1969).** Note on the Natural occurrence of Ochratoxin A.J.A.O.A.C.52:81.
- **Siriacha, P.;Kawashima ,K.;Kawasngi , S.; Satio , M .and Tonboon – EK,P.(1989).** Post harvest contamination of Thai corn with *Aspergillus flavus* .Jornal of Cereal chemistry . 66 (6):445 -448.

- **Smith , JE ; Solomons ,G .; Lewis , G . and Anderson , JC.(1995).** Natural Toxins . Bio Sci. Biotechnol . 3 (4): 187- 192.

- **Smith,J.E. and Ross,I.C.(1991).**Mycotoxins and Animal Foods London: CRC Press (pp.31-61).

- **Sobolev , V ,S . and Dorner , J.W.(2002).** Cleanup procedure for Determination of aflatoxin in major agriculture Commodities by liquid Chromatography . j. of Associated of Official Analytical Chemist International .85 : 642-45.

- **Steyn,P.S.(1971).** Ochratoxin and other dihydro-isocoumarins . Microbial Toxins .VOL. VI:179-205.

- **Stoytocho,S.; Geno,A. and Dimitar,P.L. (1999).** Some antidotes and paraclinical investigations in experimental intoxication with ochratoxin A and penicillic acid in chicks. Veterinarski. Arhiv., 69(4): 179-189.

- **Sulaiman , E . D.(1977).** Comprehensives survey of fungi associated with in Iraq note on pathogenicity and control .M.Sc Thesis , college of Agriculture and Foresty ,Mosul ,Iraq.

- **Swamy,H.V.; Smith,T.K.; Cotter, P. F.; Boermans, H. G. and Sefton, A.E. (2002).** Effect of feeding blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on production and metabolism in broilers. Poult. Sci., 81: 966-975.

- **Sweeney,M.J.;S.White,S.and Dobson,A.D.(2000)**. Mycotoxin in agriculture and food safety. Irish J. Agrc. Food Res. 39: 235 - 244.
- **Thomashow, L. S. and Weller, D. M. (1988).** Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens*. orescens in biological control Gammannomyces graminis vartritici J. of Bacteriology, 170: 3494-3508.

- **Thrane ,C.,S.Olsson,T.H.Nielsen , and J.Resen. (1999).** Vital fluorescent Stains for detection of stress in Pythium ultimum and *Rhizoctenia solani* Challenged with viscosinamide from *Pseudomonas Fluorescens* DR54. FEMS Microbiology,Ecology.30:11-23.

- **Trucksess, M. W. and Wood, G. E. (1997).** Immunochemical methods For mycotoxins in food. Food test. Anal., 3 (4): 24-27 .

- **Turconi, G.; Guarcello, M.; Livieri, C.; Comizzoli, S.; Maccarini, L. and Castellazzi, A. M. (2004).** Evalution of xenobiotica in human milk and Ingestion by the newborn-an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). Eur.J.Nutr. 43(4), 191-197.

- **Turner, W. B. (1978).** Fungal Metabolites. Academic Press, London, U. K. Pp: 34- 70.
- **Ursula, S. K.; Arnaud, S.; Monika, M.; Cavolin, B.; Brion, D.; Cecile, G. B.; Cornelia, R.; Regina, N.; Genevieve, D.; Dieter, H. and Christoph, K. (2000).** Auto-induction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. Journal of Bacteriology, 182 (5) : 1215-1225.
- **Veradi, G. and Rosner, H. (1995).** Some reflections on establishing Acommunity legislation on mycotoxins . Natural Toxins. 3: 337 - 340.

- **Verma,R.J.(2004).** Aflatoxin cause DNA damage. Int.J. Hum. Genet. 4: 231-236.

- **Watanabe ,T .(2002).**Pictorial Atlas of soil and seed Fungi Morphologies OF cultured fungi and key to species .2nd ed .CRC Press . Boca Ratn , London ,New York, Washington .D.C.

- **Webester ,J.(1980).** Introduction of fungi .2nd .,Cambridge University Press .UK.
- **WHO, World Health Organization .(2003) .**World wide regulation for mycotoxins in food and feed in the international inquiry from 2002-2003 .
- **WHO,World Health Organization. (1990).** Food Additives Series.
- **Williams, J. H.; Philips, T. D.; Jolly, P. E.; Stiles, J. K.; Jolly, C. M. and Aggarwal, D. (2004).** Human aflatoxicosis in developing countries: a Review of toxicology,exposure, potential health consequences and Interventions. Am. J. Clin Nutr.80:1106-1122.
- **Zodor ,R.E.and Anderson ,A.J.(1992) .**Influence of root colonizing Bacteria on the defence of bean .plant and soil,140:99-107.