عزل وتشخيص الفطريات المنتجة للسموم في عينات من الحبوب العلفية وإمكانية السيطرةعليها بأستخدام بعض المعاملات الكيمياوية والحيوية وتقليل سميتها.

*ندى احمد فيروز
عبد الأمير سمير سعدون
كلية العلوم /قسم علوم الحياة/ جامعة القادسية
Kraralbdyry165@gmai.com
Ameersameer2013@yahoo.com

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص الفطريات المرافقة للأعلاف وأختيار عزلات الفطر *Aspergillus.niger* المنتجة لسم الأوكراتوكسين A وأختبار تأثير المعاملات الحيوية والكيمياوية ضد الفطر المختبر وتقييم كفاءتها في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر ،كما تم تشخيص الفطرالمختبر جزيئيا بأستخدام تقنيةPCR.

أثبتت النتائج المختبرية فعالية المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط معدلات النمو الشعاعي للفطر المختبرفي الوسط الزرعي PDA وبنسبة تثبيط100% عند التركيزين2 و3غم /لتر بينما بلغت أعلى معدل تثبيط للفطر في معاملة كاربونات الكالسيوم عند التركيز 30 ملغم /ملليتر 55.5% في حين بلغ قطر الفطر في معاملة السيطرة 90 ملم.اما بالنسبة للتجربة الخزنية فقد أوضحت النتائج أن جميع المعاملات المستعملة كانت كفوءة في خفض نسب الاصابة بالفطر *A.niger*، إذ بلغت صفربالنسبة لمعاملة الأعلاف (حنطة ، ذرة صفراء ملوثة بالفطر *A.niger*) والمعفرة بالمستحضر الحيوي الفلوراميل 4 غم / كغم بذور ومعاملة التداخل للفلوراميل 2غم/كغم بذوروكاربونات الكالسيوم 15 غم/كغم بذور. ومن جانب آخر بينت نتائج حساب أعداد بكتريا *Psedomonas.fluorescns* على سطوح البذور وبحيوية عالية بعد مرور مدة خزن 30 يوم إذ وصلت أعداد البكتريا في معاملة الحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي ومعاملة التداخل للحبوب المعفرة بالمستحضر الحيوي الفلوراميل وكاربونات الكالسيوم والملوثة بالفطر *A.niger* 1,716 $\times 10^{10}$ و1,348 $\times 10^{10}$وحدة تكوين مستعمرة/غم حبوب على التوالي.

الكلمات المفتاحية : سم الأوكراتوكسين , تقنيةPCR , بالفطر *A.niger* , المستحضر الحيوي الفلوراميل

***البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول**

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)، كما تعدّ السموم الفطرية من أقوى السموم المعروفة ويرجع السبب في قوة السموم الفطرية 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 المستخدمة في طهي الطعام، إضافة إلى أنها تنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر إلى الأغذية لذلك فأن إزالة الجزء المصابة بالفطر من 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، 2010). استعملت عدة وسائل منها الوسائل الفيزياوية كالحرارة الجافة لغرض خفض المحتوى الرطوبي للحبوب الإقتصادية كالذرة والحنطة والشعير وغيرها كما استعملت بعض المواد الكيمياوية لإزالة الأفلاتوكسينات من الأغذية عند تلوثها واهم هذه المواد نترات الأمونيا(حسين,2000) ،كما استعملت الطرق البايلوجية والمتمثلة بتوضيف 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 أستخدمت هذا النوع في تصنيع المستحضر الحيوي الفلوراميل الذي حضر لأول مرة في العراق من قبل الباحث الجميلي في عام 2002 (مطوق ،2005) ولغرض تحقيق هذا الهدف تم تنفيذ هذه الدراسة وذلك بعزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض الحبوب المستخدمة كأعلاف للدواجن والطيور والحيوانات الاخرى وأختبار الفطر *A.niger* وتشخيصه بأستخدام تقنية PCR ودراسة تأثير أحد العوامل الحيوية وهو المستحضر الحيوي الفلوراميل وكاربونات لكالسيوم في السيطرة على نمو الفطر وحماية الأعلاف أثناء الخزن.

المواد وطرائق العمل :

عزل الفطريات المرافقة للأعلاف

جمعت الأعلاف (الحنطة والذرة الصفراء) من مناطق متفرقة (مخازن الأعلاف الحكومية والأسواق المحلية) في مدينة الديوانية وبواقع 1كغم لكل عينة ، وضعت العينات في أكياس ورقية وعلمت وجلبت للمختبر. عزلت الفطريات المرافقة لبذور الحنطة والذرة الصفراء المستخدمة في هذه الدراسة كالاتي :قسمت البذور إلى مجموعتين ،الأولى عقمت سطحيا بأستخدام محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2%لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم 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 كل طبق وبثلاثة مكررات لكل مجموعة ووضعت الأطباق في الموصدة بدرجة حرارة 25مْ ولمدة سبعة أيام (ميخائيل وبيدر ،1982) إذ فحصت الاطباق لمعرفة الفطريات النامية وتم حساب النسبة المئوية لتردد الفطر.

تشخيص الفطريات المعزولة :

التشخيص بأستخدام المفاتيح التصنيفية :

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

طريقة التشخيص بأستخدام تفاعل السلسلة المتبلمر (PCR) :

تم أجراء فحص PCR وذلك للتحري عن الفطر*A.niger* وذلك بأستخدام البادئ الخاص بتشخيص الفطر المختبر،ويتكون الفحص من عدة خطوات:

1- أستخلاص الحامض النووي DNA extraction :

أستخلص الحامض النووي DNA من عينات مستعمرات الفطر المختبر بأستخدام عدة ال EZ- 10 Spin Column (Fungal Genomic DNA Mini – Preps Kit) المجهزة من شركة Bioneer الكورية (1.5مايكرولتر Forward primer و1.5 مايكرولتر من Reverse primer) ، تم تحضير مزيج تفاعل حيث وضعت مكونات مزيج تفاعل PCR في أنابيب حجم 0.2ml خاصة بعدة فحص ال PCR (Accupower ® PCR Premix) والحاوي على بقية مكونات تفاعل الPCR ، ثم نقلت جميع الأنابيب إلى جهاز الطرد المركزي المازج Vortex (Exispin) centrifuge بسرعة 3000 rpm لمدة ثلاثة دقائق ثم وضعت في جهاز PCR Thermocycler .

2- الدورات الحرارية لفحص PCR Thermocycler conditions:

تم إجراء فحص تفاعل سلسلة البلمره بأستخدام جهاز PCR Thermocycler كما في الجدول ادناه:

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**

وفي الجدول أدناه البادئ الذي أستخدم في هذه الدراسة مع التسلسل النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR :

Primer		Sequence (5'-3')	Amplicon
A.niger	F	TTGTACCCTGTTGCTTCGGC	503bp
	R	TTCAGCGGGTATCCCTACCT	

تحليل نتائج فحص ال PCR

الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis :

تم اجراء الترحيل الكهربائي Agrose gel electrophorsis بأستخدام هلام الاكاروز بنسبة 1% وكذلك قراءة نتيجة تفاعل سلسلة البلمره PCR product analysis حسب طريقة (Sambrook and Russel,2001.

أختبار قابلية عزلات الفطر *A.niger* على انتاج سم الأوكراتوكسين A

1- تنمية عزلات الفطر *A.niger*

تم تهيئة أطباق حاوية على وسط (PDA) معقمة ثم زرعت فيها أقراص من عزلات الفطر المعزول وبمعدل قطر 5 ملم وبواقع ثلاث مكررات لكلّ عزلة وضعت هذه الأقراص في مراكز الأطباق بعدها حضنت بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة عشرة أيام .

2- **أستخلاص سم الأوكراتوكسين A**

استخلص سم الأوكراتوكسين A وفقا لطريقة(Mac Donald وآخرون، 1999)

3- الكشف عن سم الأوكراتوكسين A

تم الكشف عن سم الأوكراتوكسين A حسب طريقة (Sobolev and Dorner,2002).

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

1- أختبار كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

حضر الوسط لغذائي PDA المعقم في5 دوارق سعة 250مل كل منهما كل منهاحاوية على 200 مل من وسط PDA، عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 20 دقيقة ، وبعد إنخفاض درجة الحرارة أضيفت

التراكيز (0.5 ،1،2 ، 3)غم /لترمن المستحضر الحيوي الفلوراميل ،أما الدورق الخامس فترك بدون أضافة بوصفه معاملة سيطرة ،ثم رجت الدوارق الحاوية على الوسط الزرعي والمستحضر الحيوي ، بعدها صبت محتويات كل دورق في ثلاث أطباق بتري معقمة قطر كل منها 9 سم وكذلك معاملة السيطرة .حضنت الأطباق بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة 48 ساعة ،ثم لقحت الأطباق بالفطر بقرص قطره (5) ملم من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* منمى على وسط PDA بعمر سبعة أيام وضع في مركزالطبق وحضنت الأطباق جميعها بدرجة 30 مْ ولمدة 7أيام . بعدها تم حساب مقدار التثبيط للنمو الشعاعي بأخذ معدل قطرين متعامدين الواردة في(شعبان والملاح،1993).

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{R1- R2}{R1} \times 100$$

حيث أن :

R1= أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر (معاملة السيطرة)

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

2 - أختبار كفاءة كاربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

لتحديد فاعلية كاربونات الكالسيوم المختبرة في النمو الشعاعي للفطريات للفطر *A.niger* ، تم تحضير أربعة تراكيزمن ملح كاربونات الكالسيوم وهي (30،20،10،5) ملغم /مل في الوسط الزرعي المعقم PDAمع أضافة المضاد الحيوي الكلورامفينيكول بتركيز 250 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 (5) ملم من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* منمى على وسط PDA بعمر سبعة أيام وضع في مركز الطبق وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 25مْ ولمدة (7) أيام بعدها تم حساب النسبة المئوية للتثبيط كما ورد في الفقرة (1).

أختبار كفاءة المعاملات الحيوية والكيميائية في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر *A.niger* أثناء فترة الخزن

تضمنت الدراسة 6 معاملات وبثلاث مكررات حيث تم تهيئة 18 كغم من الأعلاف (الحنطة والذرة الصفراء) ، وطبقت عليها المعاملات كما في ادناه :

ت	رمز المعاملات	التوصيف
1	A.N	حبوب ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* فقط
2	F+A.N	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* ومعاملة بالمستحضر الحيوي 4 غم/ كغم بذور.
3	CaCo3 +A.N	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* ومعاملة بكاربونات الكالسيوم 30 غم / كغم بذور
4	F+A.N+CaCo3	أعلاف ملوثة بلقاح الفطر *Aniger* ومعاملة بالمستحضر الحيوي 2 غم / كغم بذور+كاربونات الكالسيوم 15 غم / كغم بذور.
5	CaCo3	أعلاف معاملة بكاربونات الكالسيوم 30 غم / كغم بذور .
6	Control	أعلاف غير ملوثة بلقاح الفطر *A.niger* وغير معاملة بالمستحضر الحيوي أو كاربونات الكالسيوم.

وبعد مرور 15 يوم و30 يوم من خزن الأعلاف تم حساب وتقدير ما يلي :

تقدير أعداد البكتريا في الغرام الواحد من الأعلاف :

أخذت عينات من الأعلاف المخزنة مقدارها 1غم عشوائيا من كل مكرر من مكررات كل معاملة عوملت بالمستحضر الحيوي وبالتركيز المستعمل وكلا على حدة ثم وضع هذا الوزن (1غم) من الأعلاف في أنبوبة اختبارزجاجية معقمة بحجم 20مل حاوية على 9مل ماء مقطر معقم ،رجت محتويات كل أنبوبة جيدا وأخذ منها 1مل وأضيف الى أنبوبة اختبار أخرى حاوية على الكمية نفسها من الماء المقطر المعقم وهكذا تم عمل سلسلة تخافيف عشريةحتى 10 تحت ظروف التعقيم التام مع أستعمال ماصة نظيفة معقمة لكل تخفيف على أنفراد ،نقل 1مل من كل تخفيف من التخافيف 10^{10} و10^{11} و10^{12} الى أطباق زجاجية معقمة قطرها 9سم حاوية على الوسط الزرعي nutrient agar وبثلاث مكررات لكل تخفيف ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 35 مْ لمدة 24 ساعة الواردة في (حميد،2001).أختبرت الأطباق الحاوية على عدد مستعمرات تتراوح بين 30 و300مستعمرة بكتيرية ومن ثم طبقت معادلة (Clark,1965) لحساب أعداد البكتريا .

عددخلايا البكتريا /غم = معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

حساب نسبة الإصابة بالفطر *A. niger* في الأعلاف :

أخذت 20 غم من حبوب كل مكرر ولكل معاملة بصورة عشوائية وعقمت سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% بعدها غسلت بالماء المقطر المعقم ، ثم جففت الحبوب ونقلت إلى أطباق بتري حاوية على وسط PDA بمعدل 5 حبوب /طبق وبثلاث مكررات لكل معاملة ، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25مْ لمدة أسبوع بعدها تم حساب نسبة الحبوب المصابة .

$$\text{نسبة الأصابة (\%)} = \frac{\text{عدد الحبوب المصابة}}{\text{العدد الكلي للحبوب المزروعة على الوسط الزرعي}} \times 100$$

التحليل الأحصائي Statistical Analysis

أخضعت النتائج للتحليل الأحصائي لتحديد الفروق المعنوية عند مستوى أحتمال 5% ،إذ شمل التحليل الأحصائي تحليل التباين الثنائي (TowWay Analysis of Variance) ANOVA ، كما تم أختبار الفروق المعنوية بين المتوسطات بواسطة أختبار أقل فرق معنوي L.S.D (الراوي وخلف الله ،2000).تم تحليل النتائج احصائيا بواسطة برنامج spss في الكمبيوتر.

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطريات

عزلت في هذه الدراسة الأنواع التالية *Aspergillus niger* ،*Aspergillus flavus, Aspergillus ochraceus* ، *Aspergillus terrus* ، *Fusarium.oxysporum*، *Alternaria alternate* ، *Penicillium sp*، *Curvilaria lunata*، *Rhizopus stolanifer*.

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 وبأستخدام البادئ (18S rRNA gene ITSI region) المصمم بواسطة برنامج التصميم primers 3 plus ،حيث بلغت مسافة الترحيل الكهربائي الموضحة في الشكل(1) **(503bp)**.أن استخدام البادىء المذكور في المواد وطرائق العمل بينت نجاحه في عملية التضخيم مع عزلات الفطر *A.niger* إذ أظهرت الحزمة 500 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 (2016) الذين عملو على تضخيم منطقة ITS في تشخيص الفطر كشفرة وراثية عالمية.

شكل(1) الترحيل الكهربائي(Electrophoresis) بأستخدام هلام الأكاروز والذي يظهر نتائج فحص الPCR لجين 18S rRNAوالخاص بتشخيص الفطر *A.niger* . حيث يمثل (M:Marker (1500 -100bp , الحفر من (7-1) عزلات الفطر الموجبة للفحص بناتج 503 bp.

أختبار قابلية عزلات الفطر *A.niger* على أنتاج الأوكراتوكسين A بطريقةصفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC).

أظهرت نتائج التحليل الكيميائي بتقنية صفائح الكروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) أن 7 عزلات من مجموع 20 عزلة للفطر A.niger ، عزلت من الأعلاف كانت منتجة للسم اوكراتوكسين A وبنسبة أنتاج 35%.كما تباينت عزلات الفطرفي 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 25% من عزلات الفطر A. niger المعزولة من التمر قادرة على إنتاج الاوكراتوكسين A.ومع ما ذكره الغزالي وعلي (2014) واللذان أشارا إلى أن 24% من عزلات الفطر A.niger المعزول من ثمار التفاح والكمثرى منتجة للسم أوكراتوكسين A .

جدول (1) عزلات الفطر *A.niger* المنتجة وغير المنتجة للأوكراتوكسين A

العزلة	القدرةعلى أنتاج الأوكراتوكسين A	العزلة	القدرة على أنتاج الأوكراتوكسين A	العزلة	القدرة على أنتاج الأوكراتوكسين A	العزلة	القدرة على أنتاج الأوكراتوكسين A
An1	-	An6	++	An11	-	An16	+++
An2	-	An7	++	An12	-	An17	-
An3	++	An 8	-	An13	-	An18	-
An4	-	An9	+	An14	-	An19	++
An5	-	An10	+	An15	-	An20	-

تأثير المعاملات الحيوية والكيميائية في عزلة الفطر *A.niger* المنتجة لسم الأوكراتوكسين A

أختبار كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (1) 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 2 غم /لتر ، 3 غم / لتر (100%) أما بالنسبة للتركيزين 0.5 غم /لتر و 1 غم /لتر أنخفضت النسبة وبفارق معنوي (75.83%)، (85%) على التوالي .تتفق هذه النتائج مع العديد من الدراسات التي بينت أن بكتريا *P.fluorescens* تستخدم بشكل كبير في السيطرة الحيوية على بعض الأمراض النباتية الناتجة عن الأصابة بالفطريات المرضة وخاصة الأجناس *Aspergillus* ، *Penicillium* (Giriji وKumar 2005)، وتعود القابلية التثبيطية لهذا المستحضر إلى قدرة البكتريا *Pseudomonas flurescens* على إنتاج العديد من المركبات المضادة لنمو الفطريات، أذ تم تشخيص عدة أنواع من المضادات الحيوية مثل (HCN) و

-CarboxylicAcid و Oomycin و Oligomycine
Phenazinel و Pyoluterin) Pymolnitrin) وغيرها من المضادات (Duffyl و Defago وآخرون 1998 ، Thrane وآخرون، 1999) .ولكل 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}) الأمر الذي يعمل على إختزال ايونات الحديد الذائبة فيقلل من جاهزيته للأحياء الدقيقة التي تحتاجها لنموها (Zodor و Anderson، 1992).تتفق هذه النتائج .مع حسن (2012).إذ أشارت ان لهذه البكتريا قدرة على تثبيط نمو الفطر *Aniger* والمعزول من.فستق الحقل بنسبة 100%عند التركيز 2غم /لتر.

الجدول (2):كفاءة المستحضر الحيوي الفلوراميل في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

المعاملات	التركيز (غم / لتر)	معدل قطر مستعمرة الفطر *A.niger*	نسبة التثبيط (%)
المستحضر الحيوي الفلوراميل	0	9	0
	0.5	24.16	75.83
	1	15	85
	2	0	100
	3	0	100

-تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات .

قيمة LSD بين التراكيز عند مستوى أحتمال 0.05% = 3.016

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

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) أن أعلى نسبة تثبيط ظهرت في الوسط الحاوي على 30 ملغم /مللبترمن كاربونات الكالسيوم إذ بلغ معدل أقطار المستعمرات 55.5سم بينما بينما لم يؤثر التركيز 5 ملغم / مللبتر في نمو الفطر المختبر إذ بلغ معدل أقطار المستعمرات 9 سم 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 10 ملغم /مللبتر،20 ملغم /مللبتر بلغ معدل أقطار المستعمرات 21.33 و 34.16 سم على التوالي .تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما أشار إليه قاسم (1998) حيث ذكر أن أضافة كاربونات الكالسيوم إلى الوسط الزرعي بتركيز 20 % ثبط نمو الفطر *A.flavus* بنسبة 38% وقد يعود سبب ذلك إلى أحداث تغير pH الوسط الزرعي ،فمادة كاربونات الكالسيوم تغير الوسط إلى الظروف القاعدية عند تحللها مائيا بإعطائها ايونات الهيدروكسيل السالبة.

الجدول(3) كفاءة كاربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A.niger*

المعاملات	التركيز ملغم /مللتر	معدل نمو مستعمرة الفطر *A.niger*	نسبة التثبيط (%)
كاربونات الكالسيوم	0	90	0
	5	90	0
	10	78.66	21.33
	20	65.83	34.16
	30	44.5	55.5

- تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات.

قيمة LSD بين التراكيز عند مستوى أحتمال 0.05% = 1.61

التجربة الخزنية

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

أظهرت النتائج الموضحة في جدول (4) (5) 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 73.33%،80 % على التوالي بعد مرور 15 يوم من الخزن ،كما حدثت زيادة في نسب الأصابة بعد مرور 30 يوم من الخزن إذ بلغت نسب الأصابة 100%، 100% ،في حين كانت في معاملة السيطرة (بذورغير ملوثة بلقاح الفطر *A.niger*) 53.33%، 60% على التوالي بعد مرور 15 يوم و30 يوم من الخزن . كماأظهر المستحضر الحيوي فعالية عالية في حماية الأعلاف من الأصابة بالفطر المذكور وتمثل بأختزال نسب الأصابة من 73.33%،80% و 100%،100% في البذور.الملوثة با لفطر فقط إلى 0%،0% في معاملة (بذور ملوثة صناعيابلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي) ومعاملة التداخل(بذورملوثة بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي +كاربونات الكالسيوم) بعد مرور 15 يوم و 30 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 73.33 %،80 %في معاملة (بذورملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger*فقط) إلى 20%،26.66% بعد مرور 15 يوم كما حدثت زيادة في نسب الأصابة بعد مرور 30 يوم من الخزن إذ بلغت نسب الأصابة26.66%، 33.33%،وبالرغم من ارتفاع نسب الأصابة للبذور إلا أن المظهر الخارجي يوحي أنها سليمة. كما تشير النتائج إلى أن معاملة (بذور لم تلوث صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بكاربونات الكالسيوم) كانت لها القدرة على أختزال نسب الأصابة إلى13.33%، 20% على التوالي بعدمرور15 و 30 يوم من الخزن . يعزى سبب أمتلاك المستحضر الحيوي القدرة على حماية الأعلاف من الأصابة الفطر *A.niger* في المخزن إلى القدرة التضادية لبكتريا *P. fluorescens* والفعل المثبط لمادة كاربونات الكالسيوم فضلا عن خفض المحتوى الرطوبي للحبوب ،تتفق هذه النتائج مع الجميلي وأبوشبع (2005) ومحسن (2006) ،أذ وجدوا أن لبكتريا*P.fluorescens* قدرة عالية على حماية بذور الحنطة والذرة الصفراء من الأصابة بالفطريات .

جدول (4) كفاءة المعاملات الحيوية والكيمياوية في حماية الحنطة من الأصابة بالفطر *A. niger* أثناء الخزن بعد مرور 15 و30 يوم :

المعاملات	نسبة الأصابة بعد مرور 15 يوم	نسبة الأصابة بعد مرور 30 يوم
Control	53.33	53.33
A.N	73.33	100
F+A.N	0	0
F+A.N+Caco3	0	0
CaCo3+A.N	20	26.66
CaCo3	13.33	13.33
LSD (0.05)	16.26	21.6

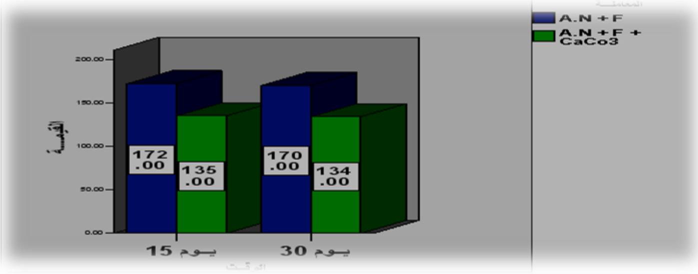
جدول (5) كفاءة المعاملات الحيوية والكيمياوية في حماية الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر *A.niger* أثناء الخزن بعد مرور 15 يوم و30 يوم:

المعاملات	نسبة الأصابة بعد مرور 15 يوم	نسبة الأصابة بعدمرور 30 يوم
Control	60	60
A.N	80	100
F+A.N	0	0
F+A.N	0	0
CaCo3+A.N	26.66	33.33
CaC03	20	20
LSD(0.05)	35.16	24.00

تقدير أعداد البكتريا *P.fluresecense* على حبوب الأعلاف :

أظهرت النتائج في الشكل (2) عدم وجود فرق معنوي في أعداد البكتريا بعد مرور 15 و30 يوم من الخزن ولكلا المعاملتين إذ بلغت أعداد البكتريا في معاملة (بذور ملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* والمعاملة بالمستحضر الحيوي) $1,72 \times 10^{10}$ و$1,716 \times 10^{10}$ وحدة تكوين مستعمرة /غم من البذورعلى التوالي في حين بلغت أعداد البكتريا في معاملة (بذور ملوثة صناعيا بلقاح الفطر *A.niger* + كاربونات الكالسيوم) $1,350 \times 10^{10}$ و$1,348 \times 10^{10}$وحدة تكوين مستعمرة /غم من البذوربعد مرور 15 و30 يوم من الخزن وحدة تكوين مستعمرة / غم

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 ، 1998 ؛حميد،2001) .



شكل (2) أعداد البكتريا المتواجدة على أسطح بذور الحنطة والذرة الصفراء والملوثة بالفطر *A.niger* والمعاملة بالفلوراميل وكاربونات الكالسيوم المخزنة لمدة 15 و30 يوم.

المصادر

- **وهبة ، ناهدمحمد والنسر ،نيفين عبد الغني .(2010).** السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها ،الخطر والوقاية . مجلة أسيوط للدراسات الحديثة ،العدد الرابع والثلاثون.
- **مطوق ، زهراء يوسف خضير (2005).** 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 .
- **حسين , حليمة زغير . (2000).** أستعمال اليوريا في مقاومة فطريات ما بعد الجني وسمومها على الذرة المخزونة .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد.
- **الراوي ، خاشع الطبعة محمود وعبد العزيز خلف الله .(2000).** تصميم وتحليل التجارب الزراعية، الثانية . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل .
- **حسين ، حليمة زغير . (2000).** أستعمال اليوريا في مقاومة فطريات ما بعد الجني وسمومها على الذرة المخزونة .اطروحة دكتوراه .كلية الزراعة .جامعة بغداد.
- **حميد، سميرة كاظم ، (2001).**تقنية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة *Psedomonas fluorescence* CHAO رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة الكوفة . 66 صفحة .
- **شعبان ،عواد ونزار مصطفى الملاح . (1993).** المبيدات .دار الكتب للطباعة **والنشر** ، جامعة الموصل صفحة 520.
- **محمد،ماهر نعيم وعلاء حسن عيدان (2016).**التنميط الوراثي لبعض العزلات الفطرية على التغاير في منطقة ITS (internal transcribed spacer) كشفرة وراثية عالمية .
- **محسن ، عذراء حرجان (2006).** دراسة التأثيرات السمية لبذور الحنطة الملوثة بالفطرين *A. flavus* و *A.niger* في الجهاز التناسلي لأناث الجرذ الأبيض وأمكانية السيطرة عليها في المخزن. 68 صفحة .
- **ميخائيل ، سمير وتركي بيدر (1982).** أمراض البذور ،دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل .

- **وهبة ، ناهدمحمد والنسر ،نيفين عبد الغني .(2010).** السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها ،الخطر والوقاية . مجلة أسيوط للدراسات الحديثة ،العدد الرابع والثلاثون.

- **Barnett, H. L. and Barry, B. H. (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi . 3rd ed. Burgess publishing compamy.
- **Clark , F.E. (1965).**Ager – plants methods for microbial (C.F:Black,1965 Methods of soil snslysis .part 2 publisher madeson , Wisconsing UAS .Pp1572).
- **Domusch,K.H.;Games ,W. and Anderson ,T.(1980).** Compendium of Fungi Academic press ,p.85.
- **Ellis , D.Davi ,S . Alexiou ,H .Handke ,R .and Bartly , R .(2007).**Description of medical fungi.2nd.ed . Adelaide .Australia.
- **Gallagher, J. C. (2003).** Antifungal pharmmaco therapy for invasive Mould infections .Expopin pharma .cother.4:147.
- **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).
- **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.
- **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.

Manual .3th ed .cold spring Harbor (NY) :cold spring Harbor Laboratory Press , N.Y.

- **Summerell, B. A. and Leslie, J. F .(2006).** The *Fusarium* Laboratory Manual. Photographs by Suzanne Bullock .

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

- **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.

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

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

- **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.
- **Sambrook ,J.and Russell , D.W.(2001)**Molecular cloning A laboratory

Isolating and Diagnosing The Toxin –Produsing Fungus in Samples of fodder seeds and the possibility of controlling them using some of the chemical and Vital Treatment and reduse their toxicity

Abdul-Amir S.Saadon Nada Ahmed Fairooz

College of Science /University of Al-QadisiyahAbstract

Absitract

The study has included isolation and diagnosis the fungus that accompanying the fodder and choosing the isolates of the fungus *A.niger* and examining the influence of the chemical and Vital treatments against the mentioned fungus , The labatory results have proved the effectiveness of the floramil in the average of inhibition of the radiative growth for the fungus that is examined in the (PDA) with percentage of inhibition 100% at the two concentrates(2,3) gm/L , whereas it reached the highest percentages of inhibition for the fungus in the treatment of the calcium carbonate at concentration of 30mg/ml 55.55% when the radius of the fungus in the control treatment 90mm.

While for the storing experiment the results have shown that in all the treatments that are used it was efficient in protecting fodder from injury of fungus infection *A.niger*, after 30 dayes from storage where it reached zero in matter of fodder treatment (wheat ,yellow corn contaminated with fungus *A.niger*) and coverd with bio formulation floramil 4gm / kg seeds and the intervene treatment of the floramil 2gm / kg seeds and calcium carbonate 15 gm/kg and on the other hand the results have shown counting the numbers of bacteria *P.flurescens* on the surfaces of seeds and vitality high after 30 days of storage in the treatment of seeds that coverd with floramil 4 gm /kg seeds and the treatment of interference for seeds coverd with floramil 2gm / kg seeds and calcium carbonate 15gm /kg seeds concentration and contaminated with fungus *A.niger* $1,716\times10^{10}$and $1,346\times10^{10}$acolony formation alone/gm seeds successively.

Key word: ochratoxin A , PCR Technology , fungus *A.niger*

* The Research in Apart of an MSC.Thesis in The first Research.