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

عزل وتشـــخيص الفطريات المرافقة لبعض المنتجات الغذائية المحلية والمســـتورده وامكانية السيطره على أحد الفطريات المنتجة للسموم بأستخدام بعض المعاملات الحيوية والكيمياوية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم – جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم حياة/ احياء مجهرية

في علوم الحياة /الاحياء المجهرية

من قبل

غالب حسين عبيد السعيدي

بكالوريوس علوم حياة (جامعة القادسية)

2010

بإشراف

أ.م.د. عبد الامير سمير سعدون

2018 م تموز ذي القعده 1439 هـ

الخلاصة **Summary**

تضـمنت الدراسـة عزل الفطريات المرافقة والملوثة للمنتجات الغذائية المحلية والمسـتوردة في مدينة الديوانية التي جمعت للفترة من تشـرين الاول – كانون الاول / 2017, حيث تم تشـخيص عدد من الفطريات وهي : *Aternaria alternata*, *Aspergillus* spp. , *Penicillium*. spp. ,*Fusarium oxysprum* , *Cladosporium* spp. , *Alternar*ia sp. *Rhizopus stolonifer* , *Stemphylum* sp وحسـبت النسـبة المئوية لتكرارها لها حيث لوحظ أن نسـبة الفطريات السـطحية المرافقة للعينات الغذائية غير المعقمة عالية بلغ التكرار النسـبي للفطر *A. niger* (19.81%) بالمقارنة مع العينات الغذائية المعقمة سـطحياً التي بلغ التكرار النسـبي للفطر *A.alternata* أعلى تكرار أذ بلغ (16.54%) من الفطريات الاخرى , وتم الكشـف عن السـموم الفطرية في رواشـح العزلات الفطرية لأحد هذه الفطريات وهو الفطر *A. alternata* الذي تم تشـخيصـه مظهرياً و وراثيا بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR , وتم التحليل بأسـتعمال تقنية HPLC وأظهرت النتائج عن قدرة الفطر *A. alternata* لإنتاج السموم أذ كان أعلى تركيز هو Altratoxin II والذي بلغ 7.5499 µg/ml . أستعمل في الدراسـة الفطرالمحاري *Pleurotus ostreatus* لاجراء المقاومة الحيوية للفطر الممرض لتقليل أعداد و سميته الفطر *A. alternata* , وأعطى الفطر *P. ostreatus* قدرة تضادية عالية للفطر الممرض *A. alternata* عند اختبار التضـاد بينهما . وأظهرت نتائج الدراسـة قدرته على تثبيط نمو الفطر الممرض في الاوسـاط الصـلبة والسـائلة , كما تم دراسـة تحديد تأثير المعاملات الكيميائية المتمثلة $CaCO_3$على النمو الشعاعي في الوسط الصلب والوزن الجاف في الوسط السـائل وأكدت النتائج أنه كلما زاد تركيز راشـح الفطر المحاري و مادة $CaCO_3$ في الوسـط الزرعي انخفض نمو الفطر الممرض مما يعني وجود تناسـب عكسـي بين المادتين ونمو الفطر الممرض .

وفي نتائج اختبار تأثير التداخل لراشح فطر المقاومة الأحيائية و كربونات الكالسيوم في النمو الشعاعي للفطر *A.alternata* لوحظ انخفاض معدلات أقطار المستعمرات للفطر الممرض حيث بلغت نسبة التثبيط 73.17 % عند تركيز 30% , وبلغ الوزن الجاف 70.60 % عند تركيز 30% في الأوساط الزرعية فكلما زاد تركيز المعاملتين كلما زادت نسبة التثبيط نمو الفطر الممرض . أوضحت نتائج تأثير راشح العزلة السامة للفطر الممرض داخل جسم الكائن الحي تأثيرها السام في ذكور و أناث الفئران المختبرية البيضاء من سلالة , BALB / c albino species : Mouse Mus musculus حيث أحدثت تغيرات بأنسجة الحيوانات المختبرية بعد تجريعها وحدوث فروق معنوية بين أوزان الفئران خلال مدة التجربة , وأثر على مستويات أنزيمات الكبد (ALT , GPT , GOT) اذ بلغ مستواه IU/ L (88, 84 , 264) على التوالي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغت IU/L (35 , 22 , 146) على التوالي كذلك , و احدثت فعالية في تحلل خلايا الكبد التي تحتوي على الانزيمات وأدت الى تحررها في مصل الدم , وكذلك سببت وجود تغيرات نسيجية مرضية واضحة في المقطع العرضي لنسيج الكبد ومنها حدوث تفجج (*Vaculation*) للخلايا الكبدية ووجود فقاعات في هيولى الخلايا وتوسع في الجيبانيات الكبدية مسببا حدوث التنكس الاستسقائي Hydropic degeneration.

وأظهرت نتائج الفحص المختبري لوظائف الكلية حدوث فروق معنوية في زيادة مستوى تركيز اليوريا والكرياتنين في مصل الفئران المختبرية المعاملة به إذ بلغ مستوى اليوريا (59 mg/dl) و الكرياتنين (1.73 mg/dl) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغت (29 *mg/dl*) و(0.70 mg/dl) على التوالي , ووجد تأثير واضح داخل انسجة الكلية مؤديا الى ضمور في الكبيبات وارتشاح في الخلايا اللمفاوية ونزف , بالإضافة الى وجود تحلل لخلايا النبيبات البولية يؤثر في وظائف الكلية مؤديا الى فشل كلوي . وأوضحت نتائج إحصائية لعزل الفطريات الانتهازية المعزولة وتشخيصها من العينات السريرية للمرضى المراجعين لمستشفيات محافظة الديوانية والمصابين بأمراض الربو , وداء السكري , والتدرن الرئوي أن نسبة اصابة الاطفال بالفطريات أعلى من الكبار , وارتفاع نسبة ظهور الفطريات المرضية يشير الى وجود علاقة بين الاصابات الفطرية للإنسان والجهاز المناعي وتم عزل الفطر *Alternaria*

alternata مع مجموعة من الفطريات الانتهازية وهذا مؤشـر لخطورة هذا الفطر على الانسـان وصحته .

قائمةالمحتويات

التسلسل	الموضوع	الصفحة
	قائمة المحتويات	
	قائمة الجداول	
	قائمة الاشكال	
	قائمة الصور	
	قائمة الملاحق	
	قائمة المختصرات	
	الخلاصة	
1	الفصل الاول : المقدمةIntroduction	3-1
1-1	المقدمة و أهداف الدراسة	3-1
2	الفصل الثاني : استعراض المراجعLiterature review	4
1-2	السموم الفطرية	4
2-2	الفطريات المسؤولة عن انتاج السموم	6
3-2	تأثير السموم الفطرية على الكائن الحي يعتمد على عدة عوامل	7
1-3-2	نوع السم	7
2-3-2	نوع الحيوان وجنسه	7
3-3-2	تركيز السم في الغذاء	7
4-3-2	مدة فترة التغذية	8
5-3-2	تنوع السموم المنتجة	8
4-2	تقسيم السموم الفطرية	8

2-4-1	تقسم الفطريات على اساس موقع الاصابة	8
2-4-2	تقسيم أو تصنيف السموم الفطرية على اساس ما تسببه من أضرار	8
2-4-3	تقسم السموم على اساس شدة السمية	9
2-4-4	تقسيم السموم الفطرية من الناحية الكيميائية	9
2-4-5	تقسيم على اساس حجم الابواغ الكونيدية التي تنتجها	10
2-5	السموم الفطرية وتأثيرها في صحة الانسان	10
2-6	تشخيص الفطريات باستعمال تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي	13
2-7	فطر *Alternaria*	14
2-7-1	التاريخ التصنيفي لفطر *Alternaria*	14
2-7-2	الصفات العامة للفطر Alternaria alternata	16
2-8	طرائق التخلص من السموم الفطرية في الأغذية	21
2-9	طرائق الكشف عن السموم الفطرية	23
2-9-1	الكشف عن السموم الفطرية في رواشح عزلات *Alternaria alternata* باستعمال تقنية *HPLC*	23
2-9-2	الطرائق البايلوجية	24
2-9-3	الطرائق الجزيئية Molecular methods	25
2-9-4	الطرائق التقليدية	25
2-10	السيطرة على الفطريات السامه Toxic fungai control	25
2-10-1	تثبيط للفطريات الممرضة باستعمال رواشح فطرية للمكافحة الحيوية	25
2-10-2	تثبيط الفطريات الممرضة باستعمال المواد الكيمياوية	29
2-11	علاقة السموم الفطرية بمعايير الدم الفسلجية والكيموحيوية و أمراضية الفطر *Alternaria alternata* للإنسان	30
3	الفصل الثالث المواد وطرائق العملMaterials and methods	الصفحة
3-1	الاجهزة والمواد Apparatus & Materials المستعملة للدراسة	34
3-1-1	الأجهزة Apparatus	34
3-1-2	المواد	35
3-1-3	البادئات Primers	39
3-1-4	العامل الأحيائي والعامل الكيمياوي	39
3-2	طرائق العمل	39
3-2-1	جمع العينات الغذائية	39
3-2-2	الأوساط الزرعية والمحاليل	41
3-2-2-1	تحضير الأوساط الزرعية	41
3-2-2-2	المحاليل	42
3-2-3	عزل الفطريات المرافقة و الملوثة للعينات الغذائية	43
3-2-4	تشخيص الفطريات المعزولة	44
3-2-4-1	التشخيص المظهري والمجهري	44

2-4-2-3	حفظ المزارع الفطرية	44
3-4-2-3	التشخيص الجزيئي لفطر *A.alternata* بتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة	45
5-2-3	التجارب المختبرية	48
1-5-2-3	الكشف عن السموم الفطرية في رواشح عزلات *alternata Alternaria* باستعمال تقنية HPLC	48
2-5-2-3	تحضير راشح المزرعة الفطرية للفطر المحاري	49
3-5-2-3	تحضير راشح المزرعة الفطرية لفطر *A. alternata*	50
4-5-2-3	تأثير فطر المقاومة الأحيائية في نمو الفطر الممرض *A. alternata* على الوسط الغذائي الصلب	50
5-5-2-3	تأثير تراكيز الفطر المحاري على النمو الشعاعي للفطر *A.alternata*	51
6-5-2-3	تأثير تراكيز المعاملة الكيمياوية Caco3 على النمو الشعاعي للفطر *A.alternata*	52
7-5-2-3	تأثير تداخل المعاملات الكيمياويةCaco3 وراشح الفطر المحاري في النمو الشعاعي للفطر A.alternata	53
8-5-2-3	تأثير فطر المقاومة الأحيائية المحاري *P.ostreayus* على الوزن الجاف للفطر الممرض في الوسط السائل	53
9-5-2-3	تأثير المعاملات الكيميائية CaCo3 على الوزن الجاف للفطر الممرض في الوسط السائل	54
10-5-2-3	تأثير التداخل بين المعاملات الكيمياوية وراشح فطر المقاومة الأحيائية في الوزن الجاف للفطر *A. alternata* في الوسط السائل	54
3-3	دراسة تأثير سم II Altratoxin داخل جسم الكائن الحي	55
1-3-3	حيوانات الدراسة	55
2-3-3	قياس وزن الجسم	57
3-3-3	التضحية بالحيوانات	57
4-3-3	تحضير الاعضاء للدراسة النسيجية	57
5-3-3	جمع عينات الدم Blood Collecting Samples من الحيوانات المختبرية	58
4-3	الفحوص الكيموحياتية	58
1-4-3	تقدير فعالية أنزيم الكبد ALT (GOT) Alanine Aminotransferase	58
2-4-3	تقدير فعالية أنزيم الكبد ALT (GPT)	59
3-4-3	تقدير فعالية أنزيم Alkaline Phosphatase	60
4-4-3	تقدير مستوى اليوريا في مصل دم الفئران البيض	60
5-4-3	تقدير مستوى الكرياتنين في مصل دم الفئران البيض	61
5-3	الدراسة النسيجية المرضية	62

6-3	دراسة وجود بعض الفطريات الأنتهازية وعزلها وتشخيصها من العينات السريرية ومنها فطر *A. alternata* وعلاقته ببعض الحالات المرضية للأنسان	64
1-6-3	جمعت العينات من المرضى	64
2-6-3	عزل وتشخيص بعض الفطريات الانتهازية المعزولة من عينات قشع للمرضى	65
5-3	التحليل الإحصائي Statistical analysis	66
4	الفصل الرابع النتائج والمناقشةResults and Discussion	الصفحة
1-4	عزل الفطريات وتشخيصها Isolation and Identification of fungi	67
2-4	التشخيص باستعمال تفاعل السلسلة المتبلمرة	69
3-4	نتائج التجارب المختبرية	72
1-3-4	استعمال تقنية HPLC في الكشف عن السموم المنتجة من راشح الفطر *A. alternata*	72
2-3-4	تأثيرفطر المقاومة الأحيائية في نمو الفطر الممرض *A. alternata* على الوسط الغذائي الصلب P.D.A	73
3-3-4	تأثير الفطر المحاري على النمو الشعاعي للفطر الممرض *A. alternata* على الوسط الصلب	76
4-3-4	تأثير المعاملات الكيميائية كاربونات الكالسيوم على النمو الشعاعي للفطر الممرض *A. alternata* على الوسط الصلب	76
5-3-4	تأثير تداخل المعاملات الكيمياوية وراشح الفطر المحاري في النمو الشعاعي للفطر *A. alternata*	77
6-3-4	تأثير فطر المقاومة الأحيائية المحاري *P.ostreayus* على الوزن الجاف للفطر الممرض في الوسط السائل	80
7-3-4	تأثير المعاملات الكيميائية CaCo3 على الوزن الجاف للفطر الممرض في الوسط السائل	80
8-3-4	تأثير تداخل بين المعاملات الكيمياوية وراشح فطر المقاومة الأحيائية في الوزن الجاف للفطر *A. alternata* في الوسط السائل	81
4-4	نتائج دراسة تأثير سم Altratoxin II داخل جسم الكائن الحي	82
1-4-4	نتائج قياس أوزان الفئران البيض خلال مدة المعاملة	82
2-4-4	فحوص الدم الكيموحياتية	83
1-2-4-4	تقدير فعالية أنزيمات الكبد GPT,GOT.ALP	83
2-2-4-4	تقدير مستوى اليوريا والكرياتنين في دم الفئران	85
3-4-4	نتائج الدراسة النسيجية	86
1-3-4-4	تأثير سم راشح للفطر *A. alternata* في بعض أعضاء الفئران البيض	86
5-4	عزل وتشخيص بعض الفطريات الانتهازية المعزولة من عينات قشع للمرضى	96

5	الاستنتاجات والتوصيات :الفصل الخامس Conclusions and Recommendation	الصفحة
5-1	الاستنتاجات	99
5-2	التوصيات	100
	المصادر References	الصفحة
اولا	المصادر العربية	101
ثانيا	المصاد ر باللغة الانكليزية	107

الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
3-1	الأجهزة المستعملة في الدراسة	34
3-2	الأدوات المستعملة في الدراسة	35
3-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	36
3-4	الأوساط الغذائية المستعملة في الدراسة	37
3-5	محتويات عدة استخلاص الحامض النووي DNA الفطري	38
3-6	بادئات DNA الامامية والخلفية المستعملة لا ثبات تشخيص *A.alternata*	39
3-7	يمثل بعض أنواع العينات الغذائية المنتخبة للدراسة	40
3-8	يمثل توزيع الفئران البيض المختبرية والمعاملات	56
3-9	خطوات طريقة تقدير فعالية أنزيم الكبد GOT	59
3-10	خطوات طريقة تقدير فعالية أنزيم الكبد GPT	59
3-11	خطوات طريقة تقدير فعالية أنزيم ALP	60
3-12	تقدير مستوى اليوريا في مصل دم الفئران	61
3-13	تقدير مستوى الكرياتنين في مصل دم الفئران	61
4-1	النسب المئوية لتردد الفطريات في المواد الغذائية	68
4-2	تقدير سموم (ATX II) التي ينتجها الفطر A.alternata	73
4-3	تأثير المعاملة الكيمياوية والمقاومة الأحيائية على النمو الشعاعي لفطر *A. alternata*	78
4-4	تأثير المعاملات (الكيمياوية والمقاومة الأحيائية) على الوزن الجاف للفطر *A.alternata* في الوسط السائل	82
4-5	تأثير سم Altratoxin II في أوزان الفئران البيض	83
4-6	تأثير سم AltratoxinIIفي معدل مستوى أنزيمات الكلية في دم الفئران البيض	84
4-7	تأثير سم AltratoxinII في معدل مستوى اليوريا والكرياتنين في مصل دم الفئران البيض	86
4-8	يمثل معدل تردد و النسب المئوية للفطريات في قشع المرضى ومسحات البلعوم :	97

9-4	يمثل أعداد وأعمار المرضى المصابين التي أجريت الدراسة عليهم :	99

الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-4	يوضح الشجرة الوراثية لفطر *A.alternata*	71
2-4	التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي (PCR – amplified product) المضاعفة من الفطر *A.alternata*	71
3-4	مقطع عرضي لكبد فأر يمثل مجموعة (السيطرة)	88
4-4	مقطع عرضي لكبد فأر يمثل مجموعة المعاملة براشح *A. alternata*	89
5-4	مقطع عرضي لكبد فأر يمثل مجموعة المعاملة براشح الفطر المحاري فقط	89
6-4	مقطع عرضي لكبد فأر يمثل مجموعة المعاملة براشح *Alternaria alternata* و راشح الفطر المحاري	90
7-4	مقطع كبد فأر يمثل معاملة براشح الفطر *Alternaria alternata* ومعاملة كاربونات الكالسيوم Caco3	90
8-4	مقطع كبد فار يمثل معاملة براشح الفطر *Alternaria alternata* , راشح الفطر *P.ostreatus* , معاملة كاربونات الكالسيوم Caco3	91
9-4	مقطع عرضي في كلية فأر يمثل مجموعة السيطرة يوضح التركيب النسيجي الطبيعي للكلية	92
10-4	مقطع عرضي (الاول والثاني) كلية فأر يمثل المعاملة براشح فطر *Alternaria alternata* فقط	93
11-4	مقطع عرضي في كلية فأر يمثل مجموعة المعاملة براشح الفطر المحاري P.ostreatus فقط	94
12-4	يوضح كلية فأر يمثل المعاملة براشح فطر *Alternaria alternata* , وراشح الفطر *P.ostreatus*	94
13-4	مقطع كلية فأر يمثل المعاملة براشح فطر *Alternaria alternata* وكاربونات الكالسيوم Caco3	95
14-4	مقطع عرضي يوضح كلية فأر يمثل المعاملة براشح فطر *A.alternata* , راشح الفطر المحاري *P.ostreatus* , كاربونات الكالسيوم Caco3	95

الصور

رقم الصورة	عنوان الصورة	الصفحة
1-3	توضح كيفية التضحية بالفأر المختبري	57

1-4	نواتج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز (1%)	70
2-4	توضح كونيدات الفطر الممرض *A. alternata* تحت المجهر الضوئي المعزولة من عينة غذائية	74
3-4	توضح مراحل نمو الفطر المحاري ضد فطر *A.alternaria*	75
4-4	توضح سيطرة الفطر المحاري وتأثير على الفطر الممرض*A. alternata*	75
5-4	توضح تأثير راشح الفطر المحاري على النمو الشعاعي للفطر الممرض *Alternaria alternata* على الوسط الصلب	78
6-4	تأثير المعاملات الكيميائية كاربونات الكالسيوم CaCo3 على النمو الشعاعي للفطر الممرض *Alternaria alternata* في الوسط الصلب	79
7-4	تأثير تداخل المعاملات الكيميائية كاربونات الكالسيوم وراشح الفطر المحاري على النمو الشعاعي للفطر الممرض *Alternaria alternata* في الوسط الصلب	79

الملاحق

رقم الملحق	عنوان الملحق	الصفحة
1	**ملحق (1) لتحليل النتائج القياسية لتحليل Altratoxin II (ATX II) HPLC**	
2	**ملحق (2) تقدير سم Altratoxin II (ATXII) الذي ينتجة الفطر Alternaria alternata باستعمال تقنية HPLC**	

المختصرات

abbreviation	Key	No. page
FAO	**Food and Agriculture Organization**	

ppm	**Part per millions**	
HPLC	**High- Performance Liquid Chromatography**	
ppb	**Part per billions**	
DNP	**2,4- dinotrophenol**	
L.S.D	**Least Significant Differentation**	
ELISA	**Enzyme- linked immunosorbent assay**	