



جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم – قسم علوم حياة

القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي
لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين
والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة
وإمكانية السيطرة عليها

أطروحة مقدمة الى

مجلس كلية العلوم – جامعة القادسية

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في فلسفة علوم الحياة / الأحياء المجهرية

من قبل

عدنان محمد ملحان السلامي

ماجستير علوم حياة / جامعة القادسية / ٢٠٢١

بإشراف

أ.د. عبد الامير سمير سعدون

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

(وَإِنْ تَعُدُّوا نِعْمَةَ اللَّهِ لَا تُحْصُوهَا إِنَّ اللَّهَ لَغَفُورٌ رَحِيمٌ)

صدق الله العلي العظيم
سورة النحل
الاية (١٨)

إقرار المشرف

أشهد أن أطروحة الدكتوراه الموسومة بـ: (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها) المقدمة من الطالب (عدنان محمد ملحان السلامي) أعدت بأشرافي ، وهي من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم حياة – احياء مجهرية .

الامضاء :

الاسم : أ.د. عبد الامير سمير سعدون

المرتبة العلمية : أستاذ

التاريخ : / / ٢٠٢٦

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية المقدمة من الأستاذ المشرف أحيل هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.

الامضاء :

المرتبة العلمية :استاذ

الاسم : أ.د. ليث سريع مطر

التاريخ: / / ٢٠٢٦

إقرار المقوم اللغوي

اشهد انه قد تم التقويم اللغوي لأطروحة الطالب عدنان محمد ملحان الموسومة (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها) .

الامضاء: _____

الاسم: _____ وائل فاضل عزيز

المرتبة العلمية: مساعد دكتور

التاريخ: _____ ٢٠٢٦ / /

إقرار المقوم الاحصائي

اشهد انه قد تم التقويم الاحصائي لأطروحة الطالب عدنان محمد ملحان الموسومة (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها) .

الامضاء: _____

الاسم: _____ فاضل حميد هادي

المرتبة العلمية: استاذ مساعد

التاريخ: _____ ٢٠٢٦ / /

إقرار المقوم العلمي

اشهد انه قد تم التقويم العلمي لأطروحة الطالب عدنان محمد ملحان الموسومة (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها).

الامضاء:

الاسم: علي عبد الواحد قاسم

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

التاريخ: ٢٠٢٦ / /

إقرار المقوم العلمي

اشهد انه قد تم التقويم العلمي لأطروحة الطالب عدنان محمد ملحان الموسومة (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعزولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها).

الامضاء:

الاسم: ماجد كاظم عبود

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

التاريخ: ٢٠٢٦ / /

إقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة المناقشة اننا اطلعنا على الاطروحة الموسومة (القدرة السمية والتوصيف المظهري والجزيئي لعزلات فطر *Aspergillus flavus* المنتجة لسموم الأفلاتوكسين والمعرولة من بعض الفواكه الطازجة والمجففة وإمكانية السيطرة عليها) المقدمة من طالب الدكتوراه (عدنان محمد ملحان) وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه. وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ماله علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول للحصول على شهادة الدكتوراه في علوم الحياة / احياء مجهرية بتقدير (امتياز).

التوقيع

التوقيع

رئيس اللجنة

عضو اللجنة

الاسم: ا.د. نيران عبيد جاسم

الاسم: ا.د. كوثر محمد علي

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

العنوان: كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل

التاريخ: / / ٢٠٢٦

التاريخ: / / ٢٠٢٦

التوقيع

التوقيع

عضو اللجنة

عضو اللجنة

الاسم: ا.د. سعاد عبد فزاع

الاسم: ا.م. د. سولاف حامد تيموز

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠٢٦

التاريخ: / / ٢٠٢٦

التوقيع

التوقيع

عضو اللجنة

عضو (المشرف)

الاسم: ا.م. د. ضحى مهدي جابر

الاسم: ا.د. عبد الامير سمير سعدون

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

العنوان: كلية العلوم/ جامعة القادسية

التاريخ: / / ٢٠٢٦

التاريخ: / / ٢٠٢٦

إقرار مجلس الكلية

اجتمع مجلس كلية العلوم بجلسته المنعقدة في / / ٢٠٢٦ وقرر منح درجة الدكتوراه في علوم الحياة/ الاحياء المجهرية.

التوقيع:

العميد :

التاريخ:

الإهداء

الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات، والصلاة والسلام على سيد الخلق أجمعين، سيدنا محمد صلى الله عليه وآله وسلم، الذي بلغ الرسالة، وأدى الأمانة، ونصح الأمة، وكشف الله به الغمة، فكان نوراً للعالمين ورحمةً للخلق أجمعين.

إلى من كان اسمه في حياتي نعمة، وبقيت ذكراه نبراساً يضيء دربي، إلى صاحب القلب الكبير والوجه الطيب والأفعال الكريمة، إلى والدي العزيز رحمه الله تعالى، وأسأل الله أن يجعل هذا العمل في ميزان حسناته.

إلى من وهبني من عمرها وصحتها ودعائها، إلى من كانت سندي في كل خطوة، ولم تدخر جهداً أو تضحية في سبيل إسعادي ونجاحي، إلى نبع الحنان والعطاء الذي لا ينضب، أمي الحبيبة، حفظك الله وأدام عليك الصحة والعافية.

إلى إخوتي وأخواتي الأعزاء، الذين كانوا لي عوناً وسنداً وفخراً واعتزازاً، فبهم تزداد الأفراح، ومعهم تهون الصعاب، وإليهم يمتد خالص الامتنان والمحبة.

إلى زوجتي العزيزة، رفيقة الدرب وشريكة الحياة، التي كانت خير معين لي بالصبر والدعم والتشجيع، فكان لوقوفها إلى جانبي أثرٌ كبير في إتمام هذا العمل.

إلى أساتذتي الأفاضل الذين أناروا لي طريق العلم والمعرفة، وإلى كل من ساهم في إنجاز هذا العمل أو كان له أثرٌ طيب في مسيرتي العلمية، أتقدم بخالص الشكر والعرفان.

إلى أستاذي الفاضل الأستاذ الدكتور **عبد الأمير سمير سعدون** المحترم، تقديرًا لعلمه وتوجيهه ودعمه الكريم، واعترافاً بفضلته في مسيرتي البحثية.

وإلى كل من يفرحه نجاحي ويشاركني فرحة هذا الإنجاز، أهدي هذا العمل المتواضع، راجياً من الله تعالى أن يجعله خالصاً لوجهه الكريم، وأن يوفقنا جميعاً لما فيه الخير والصلاح والفلاح.

الباحث: **عبدان محمد السلامي**

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين، على ما أنعم به عليّ من توفيق وعونٍ وسداد، وما أولاني من فضلٍ وإحسانٍ في مسيرتي العلمية، فله سبحانه الحمد أولاً وآخراً وظاهراً وباطناً.

وبعد إتمام هذه الدراسة، يطيب لي أن أتقدم بخالص الشكر والتقدير والامتنان إلى عمادة كلية العلوم، ممثلةً بالسيد عميد الكلية الأستاذ الدكتور **سلوان علي عبيد الحمزاوي** المحترم، وإلى السيد رئيس قسم علوم الحياة الأستاذ الدكتور **ليث سريع مطر** المحترم، لما قدّموه من دعمٍ وتسهيلاتٍ أسهمت في إنجاز هذا العمل. كما أتقدم بجزيل الشكر والعرفان إلى جميع أساتذة الكلية الذين كان لهم دورٌ علمي ومعنوي في مسيرتي الدراسية، فكانوا خير معينٍ ومرشد.

ويسعدني أن أتقدم بأسمى آيات الشكر والتقدير والامتنان إلى أستاذي الفاضل ومشرفي الأستاذ الدكتور **عبد الأمير سمير سعدون** المحترم، الذي كان له الفضل الكبير في اقتراح موضوع الدراسة والإشراف عليها، ولم يدخر جهداً في تقديم النصيح والتوجيه والمتابعة العلمية الدقيقة، فضلاً عن دعمه المستمر وتشجيعه وصبره الكريم، وما زودني به من خبراتٍ ومعلوماتٍ علمية قيّمة كان لها الأثر البالغ في إتمام هذه الدراسة وإخراجها بالشكل المطلوب.

كما أتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى زملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا في كلية العلوم / جامعة القادسية، دفعة (٢٠٢٤-٢٠٢٥)، لما أبدوه من تعاونٍ ومساندةٍ وروح أخوية طيبة طوال مدة الدراسة.

وأخيراً، أتوجه بالشكر والامتنان إلى كل من أسهم في إنجاز هذا العمل، أو قدم لي المساعدة والدعم بأي صورة كانت، وأخص بالشكر أولئك الذين لم تسعفني الذاكرة بذكر أسمائهم، راجياً منهم قبول اعتذاري، ومؤكداً لهم بالغ تقديري وامتناني.

والله وليّ التوفيق.

عدنان محمد ملحان السلامي

الخلاصة:-

تُعد سموم الأفلاتوكسين Aflatoxin، ولاسيما الأفلاتوكسين B1 (AFB1)، من أخطر السموم الفطرية التي تنتجها بعض أنواع جنس *Aspergillus*، وخاصةً *Aspergillus. flavus*، والتي قد تلوث الفواكه الطازجة والمجففة تحت ظروف التخزين غير الملائمة. وتكمن خطورتها في تأثيراتها السمية، ولاسيما على الكبد والكلية، مما قد يؤدي إلى اضطراب المؤشرات الحيوية وحدوث تغيرات نسيجية في الأنسجة المتأثرة.

لذلك، ركزت الدراسة الحالية على عزل وتشخيص الفطريات المرافقة للفواكه الطازجة والمجففة المحلية والمستوردة، والكشف عن الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين B1 وتقدير مستوياته، فضلاً عن دراسة تأثيره مخبرياً وحيوياً ونسجياً، وتقييم إمكانية الحد من تأثيراته باستخدام راسح فطر *Pleurotus ostreatus* وكربونات الكالسيوم.

جُمعت عينات التين والعنب والمشمش من مناطق مختلفة في مركز مدينة الديوانية وقضائي الشامية وعفك خلال المدة من شباط إلى تموز 2025. وعُزلت الفطريات المرافقة للعينات وشُخصت مظهرياً ومجهرياً، وتمثلت الأنواع الفطرية المعزولة في الآتي:

A. niger, *A. flavus*, *Penicillium expansum*, *A. parasiticus*, *Rhizopus stolonifer*, *P. italicum*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Alternaria alternate*. وظهر حساب التكرار النسبي لهذه الأنواع وجود فروق معنوية، إذ سجل فطر *A. niger* أعلى نسبة تكرار بلغت (17.72% ، 20.29)، في حين بلغت نسبة تكرار فطر *A. flavus* (15.8% 17.99%) في العينات غير المعقمة والمعقمة على التوالي.

ثم اختيرت العزلات الأكثر تردداً والقادرة على إنتاج الأفلاتوكسين B1 لإجراء الفحوص اللاحقة. وأجري التشخيص الجزيئي لعزلات *A. flavus* باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction, PCR)، تلاه تحليل تتابع القواعد النتروجينية (Sequencing analysis) ورسم شجرة النشوء والتطور الوراثي (Phylogenetic tree analysis) لمقارنة العزلات قيد الدراسة مع العزلات العالمية المسجلة في قاعدة بيانات NCBI.

كما تم الكشف باستخدام تقنية PCR عن الجينات المرتبطة بالتخليق الحيوي للأفلاتوكسين، وهي *aflD*، *aflR*، *aflP*. وأظهر تحليل تتابعات القواعد النتروجينية تطابقاً عالياً تراوح بين 98.37-100% بين عزلات *A. flavus* وجينات تخليق الأفلاتوكسينات قيد الدراسة والتتابعات المرجعية المسجلة في قاعدة البيانات الجينية.

وللتحري عن قدرة العزلات الفطرية على إنتاج الأفلاتوكسين B1 (AFB1) وتقدير تركيزه، استُخدمت تقنية كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC).

(HPLC). وأظهرت النتائج أن أعلى تركيز لـ AFB1 بلغ (215.9 ppb)، وسُجل في عزلة *A. flavus* المعزولة من عينات العنب المجفف غير المعقم.

وتم استخدام الفطر المحاري *P. ostreatus* في السيطرة الحيوية وكربونات الكالسيوم (CaCO_3) للسيطرة الكيميائية، لتثبيط نمو الفطر الملوث في الأوساط الزرعية الصلبة والسائلة المستخدمة لتنمية الفطر السام *A. flavus* وكذلك لتقليل التأثير السمي لـ AFB1 على الفئران البيضاء المختبرية. وعند استخدام راشح فطر *P. ostreatus* في السيطرة الحيوية، ثبت بأن له قدرة تضادية ضد فطر *A. flavus*، وأظهرت الدراسة أن راشح الفطر المحاري له القدرة على تقليل النمو الشعاعي والوزن الجاف بشكل ملحوظ، عند اختبار تأثيره على الفطر السام *A. flavus* في الأوساط الصلبة (PDA) والأوساط السائلة (PDB)، وقد ازداد تأثير راشح الفطر المحاري مع زيادة التركيز.

وُدُرِسَ تأثير كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على النمو الشعاعي في الأوساط الصلبة (PDA) والوزن الجاف في الأوساط السائلة (PDB). وأظهرت النتائج فعالية كربونات الكالسيوم في تثبيط النمو الشعاعي والوزن الجاف للفطر السام *A. flavus*. وبينت النتائج أن معدل تثبيط الفطر السام *A. flavus* ازداد مع زيادة تركيز كربونات الكالسيوم.

وأجرِيَ اختبار التأثير التآزري بين راشح الفطر المحاري وكربونات الكالسيوم (CaCO_3) على النمو الشعاعي والوزن الجاف للفطر السام *A. flavus*. وقد أشارت النتائج إلى أن متوسط أقطار مستعمرات فطر *A. flavus* قد انخفضت بنسبة عالية عند تركيز 30 ملغم/مل، بنسبة تثبيط بلغت 74.8% في الأوساط الصلبة. وبلغت نسبة تثبيط الوزن الجاف عند تركيز 30 ملغم/مل في الأوساط السائلة 70.8%، وأنه مع زيادة تركيز كربونات الكالسيوم وراشح الفطر المحاري زادت نسبة التثبيط نتيجة التأثير التآزري.

وأظهرت النتائج أن إعطاء راشح الفطر السام *A. flavus* ، لذكور فئران المختبر البيضاء، أدى إلى اختلافات ملحوظة في أوزان الحيوانات بعد عشرة ايام من الإعطاء، وكما لوحظت هذه الاختلافات أيضاً قبل التضحية بها.

حيث أثر راشح الفطر السام على مستويات إنزيمات الكبد Alanine Aminotransferase (ALT) و Aspartate Aminotransferase (AST) و Alkaline phosphatase (ALP) حيث بلغت (281.3، 194.4، 152.7) U/L على التوالي، بينما كانت مستويات نفس الأنزيمات في مجموعة السيطرة (120.8، 85.6، 34.9) U/L على التوالي.

وأشارت النتائج إلى أن راشح فطر *A. flavus* تسبب في تغيرات نسيجية، بما في ذلك اختفاء البنية النسيجية لخلايا الكبد، ولم تعد مرتبة في حبال تفصلها الجيوب الكبدية، ولم تكن تشع من الوريد المركزي. لوحظ احتقاناً دموياً، ونخراً في خلايا الكبد في بعض المناطق، وتسلاً طفيفاً للخلايا

اللمفاوية في منطقة البوابة الكبدية. بينما مجموعة السيطرة لم تظهر أي تغيرات مرضية في خلايا وأنسجة الكبد حيث البنية النسيجية الطبيعية للخلايا الكبدية المرتبة في حبال مفصولة بجيوب كبدية ومنتشرة من الوريد المركزي.

وأجري اختبارات وظائف الكلى (الكرياتينين واليوريا) واختبارات مستويات البروتين الكلي والبيليروبين في مصل الفئران المختبرية والتي كشفت عن اختلافات معنوية كبيرة في المستويات التي تم تجريعها براشع فطر *A. flavus*. حيث بلغت مستويات الكرياتينين واليوريا والبروتين الكلي والبيليروبين (0.88mg/dL, 72.1mg/dL, 4.9g/dL, 1.24mg/dL) على التوالي، مقارنةً بمجموعة السيطرة التي بلغت فيها مستويات (0.41 mg/dL, 38.8 mg/dL, 6.8 g/dL, 0.30mg/dL) على التوالي.

يدل هذا على تدهور واسع النطاق للخلايا المبطنية للأنايب الكلوية وتوسعاً في مساحة محفظة بومان المحيطة بالكبيبة، إلى جانب نزيف حاد. تُعزى هذه التغيرات إلى تأثير الأفلاتوكسين B1 على خلايا وأنسجة الكلى. في المقابل، لم تُظهر مجموعة السيطرة أي تغيرات مرضية في خلايا وأنسجة الكلى، حيث كان الشكل الطبيعي للكلى يتكون من كبيبة مستديرة طبيعية محاطة بمحفظة بومان وأنايب ملتوية قريبة وبعيدة مبطنه بخلايا مكعبة.

أما المجموعة التي تم تجريعها براشع فطر *A. flavus* وراشع الفطر *P. ostreatus*، فقد أظهرت أنابيب كلوية وخلايا طلائية طبيعية، مع ارتشاح طفيف للخلايا البلعمية وتضخم، بالإضافة إلى تساقط طفيف لبعض خلايا بطانة الأنايب. في المجموعة التي عوملت براشع فطر *A. flavus* وكربونات الكالسيوم، شملت التغيرات توسعاً ملحوظاً في الأنايب الكلوية الملتوية، وزيادة في تضخم خلايا بطانة الأنايب، واحتقاناً في مناطق متعددة. أظهرت نتائج مجموعة حيوانات المختبر التي عوملت براشع فطر *A. flavus*، وراشع الفطر المحاري، وكربونات الكالسيوم، نخرًا طلائياً طفيفاً جداً وتضخماً ضئيلاً مقارنةً بالمجموعات المذكورة سابقاً. بدت الكبيبة طبيعية، ولم يُلاحظ أي نزيف أو احتقان.

تشير هذه النتيجة إلى قدرة راشع الفطر المحاري، عند استخدامه مع كربونات الكالسيوم، على تثبيط التأثيرات السامة لراشع فطر *A. flavus* ويتصف تفاعل هاتين المادتين بفعالية عالية في خفض تأثيرات السموم الفطرية على أنسجة الكبد والكلى لدى حيوانات المختبر.

الصفحة	الموضوع	التسلسل
أ-ج	الخلاصة	
دل	قائمة المحتويات	
ن-س	قائمة الجداول	
ع-ص	قائمة الاشكال	
ق-ش	قائمة الاختصارات	
	قائمة الملاحق	
الفصل الاول المقدمة: Introduction		
1-4	المقدمة	:1-1
الفصل الثاني: Literature Review		
5	السموم الفطرية: Mycotoxins	:1-2
5	تعريف السموم الفطرية وأهميتها	:1-1-2
8	الخصائص العامة للسموم الفطرية	:2-1-2
9	العوامل المؤثرة في إنتاج السموم الفطرية	:3-1-2
11	الآثار الصحية للسموم الفطرية على الإنسان والحيوان	:4-1-2
12	طرق دخول السموم الفطرية إلى الجسم	:5-1-2
13	عبر الجهاز الهضمي (التعرض عن طريق الفم)	:1-5-1-2
13	عبر الجهاز التنفسي (التعرض عن طريق الاستنشاق)	:2-5-1-2
14	التعرض عبر الجلد: Dermal exposure	:3-5-1-2
14	الآثار الصحية بعد دخول السموم الفطرية للجسم	:6-1-2
14	الفطريات المنتجة للسموم الفطرية	:2-2

15	أهم الفطريات المنتجة للسموم الفطرية	:1-2-2
15	أنواع الرشاشيات المنتجة للسموم	:2-2-2
16	جنس <i>Aspergillus</i> sp	:1-2-2-2
18	نوع: <i>A. flavus</i>	:1-1-2-2-2
20	الأمراض المرتبطة بفطريات الرشاشيات	:3-2
22	السموم التي تنتجها الرشاشيات	:4-2
24	الأفلاتوكسينات: Aflatoxins	:1-4-2
26	التخليق الحيوي للأفلاتوكسين	:5-2
27	الأهمية الصحية للأفلاتوكسينات	:6-2
29	التلوث الغذائي بالسموم الفطرية في الفواكه والمنتجات الزراعية	:7-2
29	الفطريات المرتبطة بالفواكه	:8-2
29	الفطريات في الفواكه الطازجة	:1-8-2
30	الفطريات في الفواكه المجففة	:2-8-2
31	طرق الكشف والتشخيص	:9-2
31	طرق الكشف عن السموم الفطرية	:1-9-2
31	الطرق البيولوجية: Biological methods	:1-1-9-2
32	الطرق التحليلية /الكيميائية: Analytical /Chemical methods	:2-1-9-2
32	كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء: High-Performance Liquid (HPLC) Chromatography	:1-2-1-9-2

32	الكشف الفلوري: (FLD) Fluorescence Detector	:2-2-1-9-2
32	مطياف الكتلة: Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	:3-2-1-9-2
32	الطرق المناعية: Immunological methods	:3-1-9-2
33	الطرق الجزيئية: Molecular methods	:4-1-9-2
33	التشخيص الجزيئي للفطريات	:2-9-2
34	طرق السيطرة على الفطريات والسموم الفطرية	:10-2
34	المكافحة الكيميائية	:1-10-2
35	المكافحة الحيوية	:2-10-2
36	فطر: <i>P. ostreatus</i>	:1-2-10-2
37	استراتيجيات الوقاية والسيطرة العامة	:11-2
38	تنشيط نمو الفطريات	:12-2
40	تحلل السموم الفطرية في الأغذية	:13-2

الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل: Methods and Material		
42	الاجهزة والمواد: Apparatus & Materials	:1-3
42	الاجهزة والادوات: Apparatus and Tools	:1-1-3
45	المواد: Materiald	:2-1-3
47	المواد المستخدمة في الدراسة الجزيئية	:3-1-3
48	البادئات: Primers	:4-1-3
49	عوامل المعاملة الاحيائية والكيميائية: Biological and chemical resistance factors	:5-1-3
49	طرائق العمل: Methodolog	:2-3
49	جمع العينات الغذائية: Sample collection	:1-2-3
50	الأوساط الزرعية والمحاليل: Culture Media and Solutions	:2-2-3
50	تحضير الأوساط الزرعية: Media Preparation of Cultures	:1-2-2-3
50	1- وسط أجار دكستروز البطاطس: Potato's Dextrose (PDA) Agar	
50	2- وسط مرق البطاطا ديكستروز: Potato's Dextrose (PDB) Broth	
51	المحاليل	:2-2-2-3
51	1- محلول صبغة اللاكتوفينيل الزرقاء: Lacto phenol blue	

51	2- الفورمالين: Formalin	
51	3- محلول البومين: Meyer's albumin	
51	4- صبغة الهيماتوكسيلين هارس: Hematoxylin Stain, Harris Modified و صبغة الأيوسين: Eosin stain	
51	عزل الفطريات المرافقة و الملوثة للعينات الفواكه الطازجة والمجففة	3- 2-3:
52	تشخيص الفطريات المعزولة	4-2-3:
52	التشخيص المظهري والمجهري	1-4-2-3:
52	التشخيص الجزيئي لفطر <i>A. flavus</i> باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR)	2-4-2-3:
52	استخلاص الحامض النووي DNA من عزلة فطر <i>A. flavus</i> المعزولة في هذه الدراسة	1-2-4-2-3:
53	قياس نقاوة وتركيز مستخلص الحامض النووي DNA	2-2-4-2-3:
54	تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction	3-2-4-2-3:
54	أعداد PCR Master Mix	1-3-2-4-2-3:
55	شروط التدوير الحراري لأختبار تفاعل البوليمريز المتسلسل PCR	2-3-2-4-2-3:
56	الترحيل الكهربائي: Gel electrophoresis	3-3-2-4-2-3:
56	طريقة تحليل تسلسل الحامض النووي: DNA Sequencing Analysis	4-3-2-4-2-3:

56	Laboratory experiments: التجارب المختبرية:	:5-2-3
56	الكشف عن السموم الفطرية في رواشح عزلات فطر <i>A. flavus</i> باستعمال تقنية (HPLC) High-Performance Liquid Chromatography	:1-5-2-3
58	تحضير راشح العزلة الفطرية للفطر المحاري: Preparation of Fungal Culture Filterate <i>P. ostreatus</i>	:2-5-2-3
58	تحضير راشح العزلة الفطرية لفطر <i>A. flavus</i> : Preparation of extract Culture Filerate	:3-5-2-3
58	تأثير فطر <i>P. ostreatus</i> في نمو الفطر السام <i>A. flavus</i> بتقنية الزرع المزدوج (Dual culture) على الوسط الغذائي الصلب PDA	:4-5-2-3
59	تأثير راشح الفطر <i>P. ostreatus</i> على النمو الشعاعي للفطر <i>A. flavus</i> في الوسط PDA	:5- 5-2-3
59	تأثير تراكيز كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على النمو الشعاعي للفطر <i>A. flavus</i> في وسط PDA	:6-5-2-3
60	تأثير تداخل المعاملات الكيميائية كربونات الكالسيوم (CaCO_3) وراشح الفطر المحاري <i>P. ostreatus</i> في النمو الشعاعي للفطر <i>A. flavus</i> على الوسط الصلب PDA	:7-5-2-3
60	تأثير الفطر المحاري <i>P. ostreatus</i> على الوزن الجاف للفطر الممرض <i>A. flavus</i> في الوسط السائل PDB	:8-5-2-3

61	تأثير كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على الوزن الجاف للفطر السام (<i>A. flavus</i>) في الوسط السائل PDB	:9-5-2-3
61	تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم (CaCO_3) وراشح الفطر المحاري (<i>P. ostreatus</i>) في الوزن الجاف للفطر <i>A. flavus</i> في الوسط السائل PDB	:10-5-2-3
61	دراسة تأثير سم Aflatoxin B1 داخل جسم الكائن الحي In vivo	:6-2-3
61	حيوانات الدراسة: Laboratory Animals	:1-6-2-3
62	قياس وزن الجسم Body weight measurement	:2-6-2-3
62	تصميم التجربة: Experimental design	:3-6-2-3
64	الفحوص الكيموحياتية: Biochemical Tests	:7-2-3
64	قياس مستويات إنزيمات الكبد (AST، ALT، ALP)، واليوريا، والكرياتينين، والبروتين الكلي، والبيليبروبين في مصل الدم	:1-7-2-3
64	تحضير المقاطع النسيجية	:8-2-3
66	التحليل الإحصائي	:3-3

الفصل الرابع: النتائج والمناقشة: Results & Discussion		
67	Isolation and Identification of fungi عزل الفطريات وتشخيصها:	:1-4
70	التشخيص المظهري المجهرى, والجزئي للفطر المعزول <i>A. flavus</i> في هذه الدراسة	:2-4
70	التشخيص المظهري والمجهرى	:1-2-4
70	Diagnosis by Polymerase Chain Reaction (PCR) التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل:	:2-2-4
72	Results of DNA : ITS Sequencing for the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region نتائج تسلسل الحمض النووي لمنطقة ITS :	:1-2-2-4
75	O- نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين <i>aflP</i> ناقل ميثيل methytransferase (omtA) المسؤول عن تخليق الأفلاتوكسين	:2-2-2-4
77	نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين تخليق الأفلاتوكسين (<i>aflD</i>):	:3-2-2-4
79	نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين تخليق الأفلاتوكسين (<i>aflR</i>):	:4-2-2-4
82	نتائج التجارب المختبرية	:3-4
82	استخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) للكشف عن سم Aflatoxin B1 الذي ينتجه فطر <i>A. flavus</i>	:1-3-4
83	تأثير فطر <i>P. ostreatus</i> على نمو فطر <i>A. flavus</i> الملوث باستخدام تقنية التضاد Dual culture على وسط PDA الصلب	:2-3-4
84	تأثير المعاملات في النمو الشعاعي لفطر <i>A. flavus</i>	:4-4
84	تأثير راسح فطر <i>P. ostreatus</i> على النمو الشعاعي Radial growth للفطر <i>A. flavus</i> على الوسط الصلب PDA	:1-4-4
85	تأثير كربونات الكالسيوم $CaCO_3$ على النمو الشعاعي للفطر الممرض <i>A. flavus</i> على الوسط الصلب PDA	:2-4-4

86	تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم CaCO_3 وراشح الفطر المحاري في النمو الشعاعي للفطر <i>A. flavus</i> على الوسط الصلب PDA	:3-4-4
87	تأثير المعاملات في الوزن الجاف للفطر للفطر <i>A. flavus</i>	:5-4
87	تأثير راشح الفطر المحاري <i>P. ostreus</i> على الوزن الجاف للفطر <i>A. flavus</i> في الوسط السائل PDB	:1-5-4
88	تأثير كربونات الكالسيوم CaCO_3 على الوزن الجاف لفطر <i>A. flavus</i> الملوث في الوسط السائل PDB	:2-5-4
88	تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم CaCO_3 وراشح الفطر المحاري <i>P. ostreus</i> في الوزن الجاف للفطر <i>A. flavus</i> في الوسط السائل PDB	:3-5-4
90	دراسة تأثير سم Aflatoxin B1 داخل جسم الكائن الحي	:6-4
90	قياس تغيرات أوزان الجسم في الفئران البيضاء المختبرية خلال فترة المعاملة	:1-6-4
93	فحوصات الدم الكيموحياتية	:2-6-4
93	تقدير فعالية إنزيمات الكبد ALT, AST, ALP	:1-2-6-4
95	تقدير مستويات الكرياتينين واليوريا والبروتين الكلي والبيليروبين في دم الفئران البيضاء المختبرية	:2-2-6-4
95	مؤشر وظائف الكلى وتشمل الكرياتينين واليوريا والبروتين الكلي والبيليروبين	:1-2-2-6-4
98	نتائج دراسة التغيرات النسيجية	:3-6-4
98	تأثير راشح الفطر السام <i>A. flavus</i> في بعض أعضاء الفئران البيضاء المختبرية	:1-3-6-4
98	1- الكبد Liver	
103	2- الكلية Kidney	
الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات		
108	الاستنتاجات: Conclusions	-1-5
109	التوصيات: Recommendations	-2-5
110	المصادر: References	
	Summary	

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	رقم الجدول
42	الأجهزة المستعملة في الدراسة	:1-3
43	الأدوات المستعملة في الدراسة	:2-3
44	المواد الكيميائية Chemical Materials المستعملة في الدراسة	:3-3
46	الأوساط الغذائية المستعملة في الدراسة	:4-3
47	مكونات مجموعة استخلاص الحامض النووي DNA الفطري	:5-3
48	المواد المستخدمة في تضخيم الحامض النووي (DNA amplification) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وترحيل نواتج الحامض النووي المضاعفة	:6-3
48	بادئات DNA الامامية والخلفية المستعملة لأثبتات تشخيص <i>A. flavus</i>	:7-3
49	البادئات الجينية للكشف عن الجينات المنتجة Aflatoxin B1	:8-3
55	يبيين حجوم المواد التي استخدمت في تحضير PCR Master mix	:9-3
55	شروط الدورة الحرارية لاختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)	:10-3
63	توزيع مجاميع الفئران البيضاء المختبرية وتراكيز المعاملات	:11-3
69	الفطريات المعزولة من الفواكه الطازجة والمجففة ونسبة تكرارها	:1-4
75	نسبة تطابق تسلسل التماثل باستخدام برنامج NCBI-BLAST بين عزلات فطر <i>A. flavus</i> المحلية وعزلات الفطريات القريبة منها في برنامج NCBI-BLAST	:2-4
76	تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني لجين <i>aflP</i>	:3-4
78	تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني لجين <i>aflD</i>	:4-4
80	تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني لجين <i>aflR</i>	:5-4
83	تقدير سموم Aflatoxin B1 (AFB1) التي ينتجها الفطر <i>A. flavus</i>	:6-4
87	تأثير راشح الفطر <i>P. ostreatus</i> و كربونات الكالسيوم CaCO_3 والتداخل بينهما على النمو الشعاعي لفطر <i>A. flavus</i>	:7-4

قائمة الجداول

89	تأثير راشح الفطر <i>P.ostreatus</i> وكربونات الكالسيوم CaCO_3 وتداخلهما على الوزن الجاف للفطر الملوثة <i>A. flavus</i> في الوسط السائل PDB	8-4:
92	يوضح تأثير سم Aflatoxin B1 في أوزان الفئران البيضاء	9-4:
94	تأثير سم Aflatoxin B1 في معدل مستويات إنزيمات الكبد في مصل دم الفئران البيضاء المختبرية	10-4:
97	تأثير سم Aflatpxin B1 في معدل مستويات اليوريا والكرياتينين والبروتين الكلي والبيليروبين في دم الفئران البيضاء المختبرية	11-4:

قائمة الاشكال

الصفحة	عنوان الشكل	الشكل
6	التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات B1 و B2 و G1 و G2	1-2:
25	التركيب الكيميائي لسم Aflatoxin B1	2-2:
70	يبيّن لون وشكل مستعمرات فطر <i>A. flavus</i>	1-4:
71	صورة الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز لنتائج الحمض النووي PCR product، المضاعف بواسطة تفاعل PCR وباستخدام زوج البوادي ITS1 و ITS4	2-4:
72	يوضح الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز بنسبة 1%. للكشف عن جينات <i>aflR</i> و <i>aflP</i> و <i>aflD</i> في الحمض النووي الجينومي المستخلص من فطر <i>A. flavus</i> باستخدام تفاعل PCR باستخدام البرايمرات الخاصة بكل جين	3-4:
73	يبيّن تحليل محاذاة التسلسل المتعدد (Multiple sequence alignment analysis) لجين الحمض النووي الريبوزي (RNA) للفواصل المنسوخة الداخلية (Internal transcribed spacer ribosomal RNA gene) في عزلات <i>A. flavus</i> المحلية وأنواع <i>Aspergillus</i> ذات الصلة في قاعدة بيانات NCBI-Genbank	4-4:
74	تحليل شجرة التطور الجيني (Phylogenetic tree analysis) بناءً على التسلسل الجزئي لجين الحمض النووي الريبوزي للفواصل المنسوخ الداخلي (Internal transcribed spacer ribosomal RNA gene) في عزلات <i>A. flavus</i> المحلية	5-4:
75	تحليل محاذاة التسلسل المتعدد لجين O-methyltransferase (omtA) في عزلات محلية من فطر <i>A. flavus</i> وسلالة <i>A. flavus</i> ذات الصلة من بنك الجينات NCBI	6-4:
77	تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي من O-methyltransferase gene (omtA) في عزلات محلية من فطر <i>A. flavus</i> . تم استخدام هذه العزلات للتحقق من الهوية الجينية	7-4:
78	تحليل محاذاة التسلسل المتعدد لجين <i>aflD</i> (Multiple sequence alignment analysis of <i>aflD</i> gene) في عزلات <i>A. flavus</i> المحلية وسلالة <i>A. flavus</i> ذات الصلة في قاعدة بيانات NCBI-Genbank	8-4:

79	تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي لجين <i>aflD</i> في عزلات <i>A. flavus</i> المحلية المستخدمة في التحقق الجيني	:9-4
80	تحليل محاذاة التسلسل المتعدد (Multiple sequence alignment) analysis لجين <i>aflR</i> في عزلات محلية من فطر <i>A. flavus</i> وسلالة <i>A. flavus</i> ذات الصلة من بنك الجينات NCBI	:10-4
81	تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي لجين <i>aflR</i> في عزلات محلية من فطر <i>A. flavus</i> . تم استخدام هذه العزلات للتحقق من الهوية الجينية	:11-4
84	نمو فطر <i>P. ostratus</i> ضد الفطر السام <i>A. flavus</i>	:12-4
100	مقطع عرضي من كبد المجموعة السيطرة تُظهر بنية الكبد الطبيعية	:13-4
100	مقطع عرضي من كبد فأر معاملة بـ AFB1	:14-4
101	مقطع عرضي من كبد فأر من المجموعة المعاملة بالفطريات الحيوية	:15-4
101	مقطع عرضي من كبد المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 والفطريات الحيوية	:16-4
102	مقطع عرضي من كبد فأر المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + كربونات الكالسيوم	:17-4
102	مقطع عرضي من كبد المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + الفطريات الحيوية + كربونات الكالسيوم	:18-4
105	مقطع عرضي للكلى من المجموعة السيطرة	:19-4
105	مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1	:20-4
106	مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالفطريات الحيوية	:21-4
106	مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + <i>P. ostreatus</i>	:22-4
107	مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + كربونات الكالسيوم	:23-4
107	مقطع عرضي الكلى في المجموعة المعاملة بالتركيبة (أفلاتوكسين B1 + الفطريات الحيوية + كربونات الكالسيوم)	:24-4

Abbreviation	Key
ABPA	Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis
AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	Aflatoxin B1, B2, G1, G2
<i>aflD</i>	Aflatoxin biosynthesis gene D
<i>aflP</i>	Aflatoxin biosynthesis gene P
<i>aflR</i>	Aflatoxin Regulatory gene
AFM1, AFQ1	Aflatoxin M1, Q1
ALP	Alkaline phosphatase
ALT	Alanine Aminotransminase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartate aminotransminase
a_w	Water activity
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CaCl ₂	Calcium Chloride
CaCO ₃	Calcium Carbonate
CPA	Chronic Pulmonary Aspergillosis
CPA	Cyclopiazonic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxynivalenol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	European Union
FAO	Food and Agriculture Organization

FB1, FB2	Fumonisin (FB1, FB2)
FLD	Fluorescence Detector
GC	Gas Chromatography
GFR	Glomerular Filtration Rate
HCC	Hepatocellular carcinoma
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSD	Honestly Significant Difference
IA	Invasive Aspergillosis
IARC	International Agency for Research on Cancer
IFI	Invasive fungal infection
ITS	Internal transcribed spacer
L.S.D	Least Significant Difference
<i>LaeA</i>	Loss of <i>aflR</i> ExpressionA
LC–MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass Spectrometry
LFAs	Lateral flow assays
MAP	Modified Atmosphere Packaging
MFO	Microsomal Mixed-Function Oxidase System
mg/dL	Milligram/deciliter
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OTA	Ochratoxin A
PAT	Patulin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato's Dextrose Agar

PDB	Potato's Dextrose Broth
pH	potential of Hydrogen
ppb	Parts per billion
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reactive Oxygen Species
SD	Standard deviation
SNPs	Single nucleotide polymorphisms
STC	Sterigmatocystin
T-2	T-2 toxin
TLC	Thin-layer chromatography
U/L	Unit/Liter
UPGMA	Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean
UV	Ultraviolet
VeA	Velvet A
VelB	Velvet-like protein B
ZEN	Zearalenone

الفصل الاول

المقدمة

Chapter one

Introduction

1. المقدمة (Introduction)

تُعدّ الفواكه الطازجة والمجففة مكونات أساسية في النظام الغذائي للإنسان، إذ تُوفّر عناصر غذائية هامة تشمل الفيتامينات والمعادن والألياف ومضادات الأكسدة. ومع ذلك، ورغم قيمتها الغذائية العالية، تُعتبر هذه المنتجات من بين أكثر المنتجات عرضةً للتلوث الفطري نظراً لمحتواها العالي من الماء، وغناها بالسكريات، وطريقة التعامل معها وتخزينها، لا سيما في البيئات الحارة والرطبة. كما تُعتبر بيئة مثالية لنمو الفطريات الخيطية في ظل توفر الظروف المناسبة من الرطوبة ودرجة الحرارة، وسوء التعامل معها، مما يزيد من احتمالية تلوثها بالسموم الفطرية (Miliordos et al., 2025).

تُعرّف السموم الفطرية (Mycotoxins) بأنها نواتج أيضية ثانوية ذات وزن جزيئي منخفض، تنتجها بعض أجناس الفطريات مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*. وتتميز هذه السموم بثباتها النسبي في ظل المعاملات الحرارية وطرق التخزين التقليدية، مما يجعل وجودها في الغذاء خطراً على الصحة حتى بعد إزالة العفن المرئي أو بعد الطهي (Gurikar et al., 2023).

وتشير تقارير منظمة الأغذية والزراعة (FAO) إلى أن نحو 25% من المحاصيل الغذائية في العالم قد تكون ملوثة بالسموم الفطرية، ولا تزال تشكل تحدياً عالمياً في السلسلة الغذائية، لا سيما في البلدان ذات المناخ الحار والرطب، حيث تُسهم الظروف البيئية في زيادة معدلات التلوث الفطري وإنتاج السموم (Eskola et al., 2020).

ومن بين السموم الفطرية المختلفة تعد الأفلاتوكسينات Aflatoxins الأكثر أهمية من الناحية الصحية والاقتصادية، وتُنتج بشكل أساسي من قبل فطريات جنس *Aspergillus sp.*، وخاصة من قبل الأنواع *A. parasiticus* و *A. flavus*. حيث تنتج عدة سموم ومنها الأفلاتوكسين B1 Aflatoxin B1 (B1)، الذي يُعد الأكثر سمية، وقد صنفته الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) ضمن المجموعة الأولى من المواد المسرطنة المؤكدة للإنسان، وذلك لارتباطه المباشر بسرطان الكبد، فضلاً عن آثاره السامة على الكلى والجهاز المناعي ونمو الخلايا (Cao et al., 2022; Cancer, 2012).

تكتسب هذه السمية أهمية خاصة في المواد الغذائية التي تُستهلك مباشرة، مثل الفواكه المجففة والمكسرات والحبوب، حيث يمكن أن تتراكم فيها تراكيز منخفضة ولكنها مستمرة، مما يؤدي إلى آثار صحية طويلة الأمد نتيجة التعرض المزمن لها (Benkerroum, 2020a).

تُعدّ الفواكه المجففة، كالتين والزبيب والمشمش، عرضةً للتلوث بسموم الأفلاتوكسين (Aflatoxin) نتيجةً لطرق التجفيف التقليدية أو التخزين غير السليم، مما يُتيح المجال لنشاط الفطريات وإنتاج السموم. ورغم أن انخفاض نسبة الماء في الفواكه المجففة يُفترض أن يُحدّ من نمو الميكروبات، إلا أن

بعض أنواع الفطريات قادرة على التكيف والنمو في ظل هذه الظروف، خاصةً إذا زادت الرطوبة أثناء النقل أو التخزين. وقد رصدت دراسات حديثة مستويات متفاوتة من السموم الفطرية في الفواكه المجففة المتداولة عالمياً، مما يؤكد على ضرورة المراقبة المستمرة لهذه المنتجات (González *et al.*, 2023).

يُعدّ التشخيص الدقيق للفطريات الملوثة خطوةً حاسمةً في تقييم المخاطر المرتبطة بها. إن اعتماد أساليب التشخيص التقليدية على الخصائص المورفولوجية والزراعية؛ قد لا يكون كافياً للتمييز بين الأنواع المتقاربة أو بين السلالات المنتجة للسموم وغير المنتجة لها. ولذلك، أصبح التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction, PCR) وتقنيات تسلسل الحمض النووي (DNA Sequencing analysis) أداةً رئيسيةً في هذا المجال (Meskini *et al.*, 2025).

أن أستخدم منطقة The internal transcribed spacer region (ITS) من الحمض النووي الرايبوسومي، يعد كعلامة قياسية لتحديد أنواع الفطريات، بينما تُستخدم جينات مسار التخليق الحيوي للأفلاتوكسين مثل *aflR* و *aflD* و *aflP* لتقييم قدرة العزلات على إنتاج السموم الفطرية (Okayo *et al.*, 2020; Saber *et al.*, 2022).

ولا يقتصر تحديد الجينات *aflR* و *aflD* و *aflP* على تأكيد الهوية الجينية فحسب، بل يساعد في التنبؤ أيضاً بإمكانية إنتاج السموم، وهو أمر بالغ الأهمية في برامج سلامة الغذاء. علاوة على ذلك، يتيح تسلسل الجينات ورسم خرائط الشجرة التطورية مقارنة العزلات المحلية والعالمية، مما يساعد في فهم التنوع الجيني والتوزيع الجغرافي للعزلات عالية الخطورة. وقد أكدت دراسات حديثة أن الجمع بين التشخيص التقليدي والجزيئي يُسفر عن نتائج أكثر دقة في رصد الفطريات السامة وتقييم مخاطرها (Samson *et al.*, 2014).

في المقابل، لا يكفي الكشف والتشخيص وحدهما للتخفيف من حدة المشكلة بل من الضروري أيضاً تطوير أساليب فعّالة للسيطرة على الفطريات المنتجة للسموم والحد من آثارها. وقد شملت هذه الأساليب استراتيجيات كيميائية وبيولوجية. وتُعدّ المعاملات الكيميائية، مثل استخدام كربونات الكالسيوم، خيارات آمنة نسبياً، إذ تُعدّل البيئة وترفع درجة الحموضة، مما يُثبّط نمو بعض الفطريات ويحدّ من نشاطها الأيضي (Hamad *et al.*, 2023). وقد أظهرت نتائج حديثة أن كربونات الكالسيوم قادرة على الحدّ من نمو بعض أنواع فطر الرشاشيات وخفض مستويات السموم المنتجة في ظروف المختبر وفي الأغذية (Lizárraga-Paulín *et al.*, 2013).

أصبحت مكافحة البيولوجية من أسرع اتجاهات البحث تطوراً، لا سيما في ظل الحاجة إلى بدائل آمنة وصديقة للبيئة. ويُعد الفطر المحاري (*P. ostreatus*) كائناً واعداً في هذا المجال لقدرته على إنتاج مركبات حيوية مضادة للفطريات ومزيلة للسموم (Zapaśnik et al., 2025).

وأن رُاشح هذا الفطر يمتلك فعالية تثبيطية واضحة ضد فطر *A. flavus* ، ويمكن أن يُسهم في الحد من إنتاج الأفلاتوكسين عبر آليات إنزيمية واستقلابية متعددة (Kermasha and Sami, 2020). وتكمن أهمية هذا الفطر أيضاً في كونه صالحاً للأكل، ومنخفض التكلفة، وقابلاً للتطبيق في برامج مكافحة الآفات المستدامة.

لضمان فعالية هذه المعاملات، أصبح من الضروري تقييم آثارها ليس فقط على الفطريات المنتجة للسموم، بل أيضاً على الأنظمة البيولوجية. ولذلك، تُستخدم النماذج الحيوانية لدراسة التأثيرات الفيزيولوجية والكيميائية الحيوية والنسجية للتدخلات هذه المعاملات، بما في ذلك تأثيرها على وزن الجسم، وإنزيمات الكبد، ووظائف الكلى، والتغيرات النسيجية في الأعضاء الحيوية. توفر هذه الاختبارات أدلة عملية على سلامة وفعالية التدخلات المقترحة في الحد من السمية وتحسين المؤشرات الصحية (Velazhahan et al., 2024).

تهدف هذه الدراسة إلى التحقق من وجود الفطريات السامة في بعض الفواكه الطازجة والمجففة، مثل التين والعنب والمشمش، المحلية والمستوردة، والتي تنتج الأفلاتوكسين B1، ويتم التحقيق عن السموم التي تنتجها الفطريات باستخدام تقنيات تحليلية مثل كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)، ثم تقييم سميتها وخصائصها الجزيئية، مع اختبار طرق مكافحة البيولوجية والكيميائية الفعالة. وكذلك من خلال دراسة سمية الفطريات المرتبطة بهذه الفواكه، وإمكانية السيطرة على نمو الفطريات المنتجة للسموم، والحد من سميتها وتأثيرها على البيئة، وكذلك، تقليل سميتها باستخدام المعاملات البيولوجية والكيميائية. ولتحقيق أهداف الدراسة، تم اتباع الخطوات التالية.

1. عزل وتحديد الفطريات المرتبطة ببعض الفواكه الطازجة والمجففة المحلية والمستوردة التي جُمعت من أسواق محافظة الديوانية، باستخدام الطرق التقليدية والمجهريّة والجزيئية.

2. تم إجراء التشخيص الجزيئي للفطر السام *A. flavus* المنتج لسم الأفلاتوكسين B1 (Aflatoxin B1) باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)، وتحليل تسلسل الحمض النووي (DNA Sequence Analysis)، ورسم الشجرة التطورية (Phylogenetic Tree)، فضلاً عن تحديد درجة التشابه الوراثي بين العزلات المحلية المدروسة والعزلات العالمية المسجلة في بنك الجينات (GenBank). كما شملت الدراسة الكشف الجزيئي عن الجينات المرتبطة بمسار تخليق الأفلاتوكسين

- B1، والمتمثلة في *aflR* و *aflP* و *aflD*، بهدف التحقق من وجود هذه الجينات في العزلات المدروسة ودراسة علاقتها بقدرتها على إنتاج سم الأفلاتوكسين B1.
3. الكشف عن أنواع السموم الفطرية التي تنتجها الفطريات المعزولة وتحديدًا مختبرياً باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC).
4. دراسة تأثير راسح الفطر المحاري *P. ostreatus* وكربونات الكالسيوم على نمو *A. flavus* في الأوساط الغذائية الصلبة والسائلة في المختبر.
5. التحقيق في تأثير المعاملات لراسح الفطر المحاري *P. ostreatus* وكربونات الكالسيوم، وتأثيراتها الكيميائية الحيوية والفسولوجية على حيوانات المختبر الحية، وتحديدًا تأثيرها على وزن الجسم وأنسجة الكبد والكلى، وتأثير هذه المعاملات على اختبارات الكيمياء الحيوية للدم في ذكور الفئران البيضاء.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

2-1: السموم الفطرية: Mycotoxins

2-1-1: تعريف السموم الفطرية وأهميتها:

تُعد السموم الفطرية (Mycotoxins) من أخطر الملوثات الطبيعية التي تهدد سلامة الغذاء وصحة الإنسان والحيوان على مستوى العالم، وهي نواتج أيضية ثانوية تنتجها بعض أنواع الفطريات الخيطية، لاسيما تلك التابعة لأجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*. وتتميز هذه المركبات بقدرتها العالية على الثبات الكيميائي والحراري، مما يجعلها مقاومة لعدد من عمليات معالجة الأغذية والطهي، وبالتالي تستمر في السلسلة الغذائية حتى بعد المعاملة أو التخزين (Eskola et al., 2020).

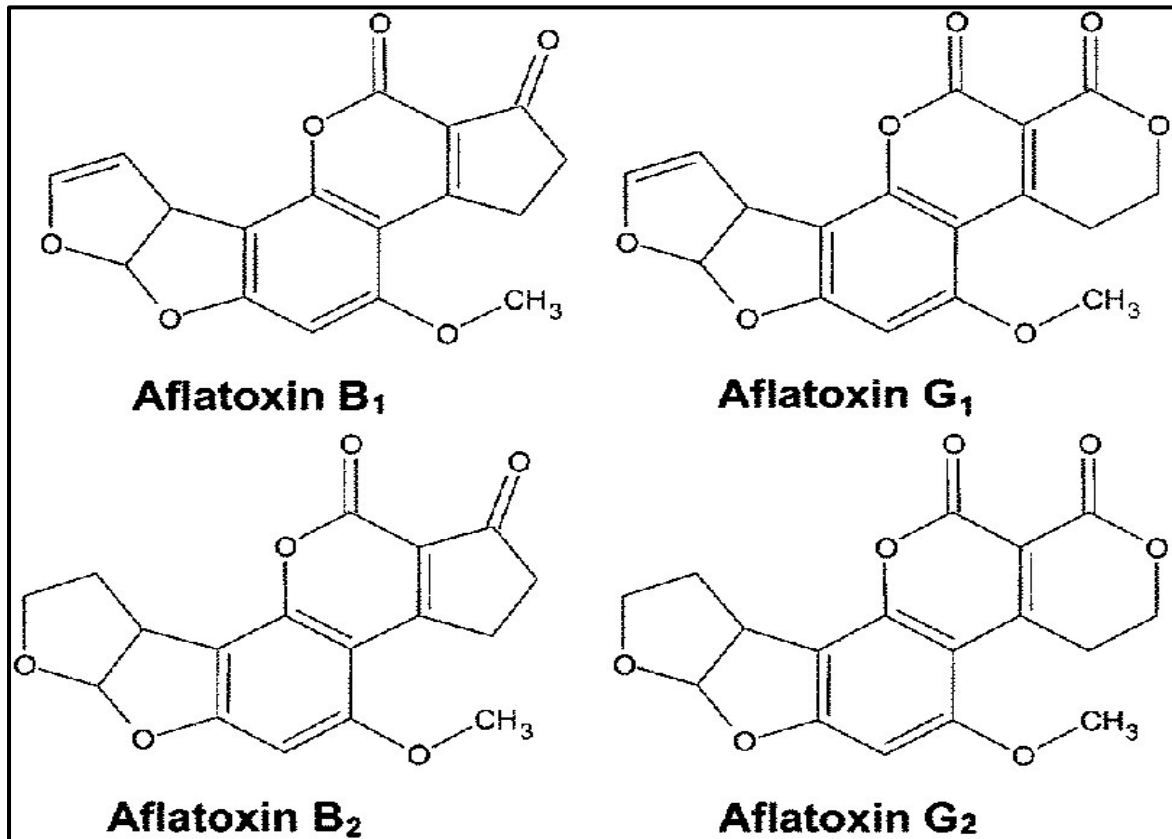
تُعد السموم الفطرية مستقلبات أيضية ثانوية (Secondary metabolites) منخفضة الوزن الجزيئي. تلوث هذه السموم نحو 25% من الإنتاج العالمي لكل من الحبوب، الفواكه المجففة والتوابل (Syraji et al., 2025)، لذلك تشكل خطراً صحياً على البشر والحيوانات وتسبب خسائر اقتصادية كبيرة (Ismail et al., 2018). تنمو هذه الفطريات على المحاصيل مثل الحبوب، المكسرات، الفواكه المجففة، والتوابل، خاصة في ظروف رطوبة عالية وحرارة مناسبة، سواء قبل الحصاد أو أثناء التخزين والنقل (Mannaa and Kim 2017; Smith et al., 2016).

تُشتق هذه المركبات حيويًا من مواد أولية متنوعة، تشمل Amino acids, Polyketones المشتقة من acetyl coenzyme-A، ومركبات Terpenoid الوسيطة، وPeptide. وتُشكل السموم الفطرية تهديداً خطيراً لصحة الإنسان والحيوان نظراً لسميتها، وقدرتها على التسبب بالسرطان، وإحداث الطفرات، وتأثيراتها المثبطة للمناعة عند وجودها في الأغذية والأعلاف الملوثة (Cano et al., 2018; Liu et al., 2024).

تُنتج الفطريات مستقلبات ثانوية عبر عدة مسارات حيوية رئيسية، كل منها نظام مستقل لتخليق أنواع مختلفة من المركبات ذات أنشطة بيولوجية متنوعة. يشمل المسار الأول Polyketide Pathway، الذي يُستخدم في إنتاج مجموعة واسعة من السموم الفطرية والمضادات الحيوية مثل Griseofulvin، وAflatoxin، وPatulin. ومسار حمض الشيكيميك Shikimic Acid Pathway، وهو المسؤول عن تخليق الأحماض الأمينية العطرية مثل (Tyrosine، Phenylalanine، Tryptophan). ومسار التربينويد Terpenoid Pathway الذي يُنتج التربينات والتربينويدات والهرمونات الفطرية مثل Gibberelins. ويوجد مسار الببتيد غير الريبوزومي Nonribosomal Peptide Pathway.

الذي يُعنى بتخليق المضادات الحيوية مثل Cephalosporins, Penicillin، بالإضافة إلى مثبطات المناعة مثل سيكلوسبورين A (Cyclosporine A) (Avalos and Limón, 2021).

تُشمل السموم الفطرية عدة فئات ومنها الأفلاتوكسينات التي تُنتجها بعض أنواع الفطريات مثل *A. flavus*, *A. parasiticus*. ويُشتق مصطلح الأفلاتوكسين (Aflatoxin) من اسم فطر *A. flavus*. وتُعتبر الأفلاتوكسينات من أخطر السموم الفطرية. ويوجد هناك أربعة أنواع رئيسية من الأفلاتوكسينات، تختلف في تركيبها الكيميائي ولكنها متقاربة في تأثيراتها الفسيولوجية (AFB1، AFB2، AFG1، AFG2) وحوالي 10 من مشتقاتها كما في الشكل (1-2) (Hamad et al., 2023 ; Syraji et al., 2025).



شكل (1-2): التركيب الكيميائي للأفلاتوكسينات B1 و B2 و G1 و G2 (Gotah et al., 2018)

يُعتبر Aflatoxin B1 (AFB1) بأنه الشكل الأكثر سميةً والأكثر نشاطاً بيولوجياً. تكمن أهميته في قدرته على إحداث تلف كبدي حاد وتعزيز الإصابة بسرطان الكبد من خلال التنشيط الأيضي في الكبد، حيث يُكوّن وسائط إيبوكسيدية تفاعلية قادرة على الارتباط بالحمض النووي وإحداث طفرات جينية (Cao et al., 2022).

كذلك تشمل السموم الفطرية أنواع أخرى من السموم مثل (OTA) Ochratoxin A، (DON & T-2)، (ZEN) Zearalenone، (PAT) Patulin، Fumonisin (FB1, FB2)، Trichothecenes (Khan *et al.*, 2024).

ونتيجة لقدرة السموم الفطرية على تلويث المحاصيل الزراعية والمنتجات الغذائية خلال مراحل ما قبل الحصاد أو بعده، تنشأ مشاكل وخاصة في البيئات ذات الظروف المناخية الملائمة لنمو الفطريات، مثل ارتفاع الرطوبة ودرجات الحرارة غير المناسبة وسوء التخزين. وقد أظهرت الدراسات أن ما يقارب 60-80% من المحاصيل الزراعية العالمية قد تحتوي على مستويات قابلة للكشف من السموم الفطرية، سواء بشكل منفرد أو مختلط، وهو ما يرفع من مستوى الخطر الصحي والاقتصادي المرتبط بها (Rushing and Selim, 2019).

تُمثل الأهمية الصحية لهذه السموم في آثارها السمية الحادة والمزمنة، إذ ترتبط بمجموعة واسعة من الاضطرابات تشمل التسمم الكبدي، تثبيط الجهاز المناعي، اضطرابات النمو، التأثيرات العصبية، والتسرطن. وتُعد الأفلاتوكسينات من أكثر السموم الفطرية دراسةً وخطورةً، نظراً لعلاقتها الوثيقة بسرطان الكبد، وخاصة في المجتمعات التي تعتمد على الحبوب والمكسرات كغذاء رئيسي (Ostry *et al.*, 2017).

كما أن التأثيرات الاقتصادية للسموم الفطرية لا تقل خطورة عن آثارها الصحية، حيث تؤدي إلى خسائر كبيرة في الإنتاج الزراعي، ورفض الشحنات التصديرية، وزيادة تكاليف الفحص والمراقبة، إضافة إلى التأثير في تجارة الغذاء العالمية. وتُقدّر الخسائر السنوية الناتجة عن التلوث الفطري والسموم المرتبطة به بمليارات الدولارات، خاصة في الدول النامية التي تعاني من ضعف البنية التحتية للتخزين والرقابة (Pitt and Miller, 2017).

يُمثل الغزو الصامت للسلع الزراعية بالفطريات المُولدة للسموم الفطرية (Mycotoxin) تحدياً خطيراً للصحة العامة والتجارة الدولية. ولا تُمثل السموم الفطرية كياناً واحداً، بل مجموعة متنوعة من المركبات الكيميائية ذات السمية متفاوتة للغاية (Smith *et al.*, 2016).

في ضوء تزايد الاهتمام العالمي بسلامة الغذاء، أصبحت دراسة السموم الفطرية من الأولويات البحثية، ليس فقط لفهم آليات إنتاجها وتأثيراتها، بل أيضاً لتطوير استراتيجيات فعالة للحد من انتشارها والكشف المبكر عنها، بما يضمن حماية المستهلك وتحقيق الأمن الغذائي المستدام (Logrieco *et al.*, 2026).

2-1-2: الخصائص العامة للسموم الفطرية:

تنتج الفطريات السموم الفطرية كجزء من أيضها الثانوي وهي مركبات منخفضة الوزن الجزيئي ، وغالباً ما يتم تصنيعها في ظروف بيئية معينة لا ترتبط مباشرة بالنمو الفطري، بل بآليات التكيف والمنافسة البيئية. وتختلف هذه المركبات من حيث التركيب الكيميائي والخواص الحيوية، إلا أنها تشترك في كونها ذات نشاط بيولوجي مرتفع وتأثير سام حتى عند تراكيز منخفضة جداً (Geisen *et al.*, 2017).

تُتميز بأن لها خصائص فيزيائية وكيميائية متباينة، ومن أمثلتها الأفلاتوكسينات وتتصف بأن لها أوزاناً جزيئية منخفضة نسبياً وكذلك تكون عديمة اللون أو ذات لون باهت، وقد تكون في بعض الأنواع فلورية تحت الأشعة فوق البنفسجية مثل الأفلاتوكسينات. غير قابلة للذوبان في المذيبات غير القطبية، وقليلة الذوبان في الماء، وتذوب بحرية في المذيبات العضوية متوسطة القطبية مثل الكلوروفورم والميثانول (Tahir *et al.*, 2018).

تُكون ثباتية الأفلاتوكسينات غير مستقرة في ضوء الأشعة فوق البنفسجية ودرجات الحموضة القسوى (أقل من 3 أو أكبر من 10). أما التفاعلية للأفلاتوكسينات فيمكن أن تنفتح حلقة اللاكتون في الظروف القلوية، ولكن هذا التفاعل قابل للعكس عند التحمض (Faraji *et al.*, ; Diao *et al.*, 2015). (2022).

يُعد استقرار السموم الفطرية أثناء معالجة الأغذية مصدر قلق كبير، لأن العديد منها مقاوم للحرارة، وغالباً ما يتطلب تحليلها الكيميائي عوامل مؤكسدة قوية، أو أحماضاً، أو قلويات. تُعد الخصائص الرئيسية، مثل الذوبان، والثبات في الحرارة ودرجة الحموضة، والتفاعل مع عوامل الأكسدة، أساسية لفهم ثباتها وتطوير طرق للحد من وجودها في الغذاء (Yao *et al.*, 2025).

أن تحلل السموم الفطرية أمراً صعباً لأنها قد تُنتج نواتج تحلل ضارة أثناء المعاملة. ويمكن أن يتعطل تركيبها الكيميائي بفعل عوامل مؤكسدة قوية، أو أحماض، أو قلويات، مما يؤدي إلى تعطيلها (Shekhar *et al.*, 2025).

من أهم خصائصها أنها غير ضرورية لحياة الفطر نفسه، ولكنها تمنحه أفضلية بيئية عبر تثبيط الكائنات المنافسة أو التكيف مع الضغوط الخارجية. كما أن العديد منها مستقرة كيميائياً ويمتلك ثباتية عالية تجاه الحرارة ويمكنها تحمل طرق معالجة الأغذية ، مما يجعل التخلص منها صعباً في المنتجات الغذائية المصنّعة أو المجففة (Karlovsky *et al.*, 2016).

طوّرت بعض الطرق الفيزيائية خصيصاً لإزالة السموم الفطرية الموجودة في الأغذية، مثل الفرز والتنظيف والغسل، بينما طوّرت طرق أخرى لأغراض، مثل الطحن والإشعاع والبتق (Extrusion) أي عملية دمج للحرارة والضغط وهي طريقة فعالة لإزالة السموم الفطرية نتيجة لتكسير الروابط الكيميائية للسموم. تُركّز المجموعة الأولى من التقنيات على إزالة السموم الفطرية من الحبوب، بينما تُركّز المجموعة الثانية على تدميرها أو عزلها في مادة قابلة للاستخدام مرة واحدة أو منخفضة القيمة (Grenier et al., 2014).

2-1-3: العوامل المؤثرة في إنتاج السموم الفطرية:

يعتمد إنتاج السموم الفطرية على تفاعل معقد بين العوامل الوراثية للفطر والظروف البيئية المحيطة به، مثل النشاط المائي (a_w)، درجة الحرارة، نوع الركيزة الغذائية، ومدة التخزين. فوجود الجينات المسؤولة عن التخليق الحيوي للسموم لا يعني بالضرورة على قدرة الفطر على إنتاج السموم الفطرية، إذ يتطلب ذلك ظروفاً ملائمة تحفز التعبير الجيني وتنشط المسارات الأيضية ذات الصلة. لذلك فإن وجود الفطر لا يعني بالضرورة وجود السم، إلا أن توافر الظروف المناسبة قد يؤدي إلى تنشيط المسارات الأيضية المسؤولة عن التخليق الحيوي للسموم الفطرية (Medina et al., 2014).

من أهم العوامل البيئية المؤثرة في إنتاج السموم الفطرية، النشاط المائي، درجة الحرارة، توفر الأكسجين، نوع الركيزة الغذائية، الأس الهيدروجيني (PH)، ووجود الكائنات الدقيقة المنافسة. وقد ثبت أن بعض أنواع *Aspergillus* تنتج كميات مرتفعة من الأفلاتوكسين عند درجات حرارة تتراوح بين 25-30°م ونشاط مائي مرتفع نسبياً (Awuchi et al., 2021).

كما تؤثر الممارسات الزراعية والتخزينية في احتمالية التلوث، حيث يؤدي الحصاد المتأخر، الضرر الميكانيكي، التخزين السيئ، وانتشار الحشرات إلى تعزيز نمو الفطريات وزيادة إنتاج السموم. ولذلك فإن إدارة سلسلة الإمداد الغذائي تمثل عنصراً أساسياً في تقليل المخاطر (Daou et al., 2021).

إضافة إلى ذلك، يساهم التغير المناخي في توسيع النطاق الجغرافي للفطريات المنتجة للسموم، ويؤثر في أنماط التلوث عالمياً، مما يجعل القضية أكثر تعقيداً في المستقبل القريب (Battilani et al., 2016).

يُعدّ إنتاج الأفلاتوكسين ظاهرةً مُعقّدة تتأثر بمجموعة واسعة من العوامل البيئية والحيوية التي تُسيطر على نمو الفطريات، ولا سيما أنواع فطر *Aspergillus sp*، وخاصةً *A. flavus* و *A. parasiticus*. قد يبدأ تلوث الأفلاتوكسين في وقت مبكر من مرحلة ما قبل الحصاد في الحقل، ويستمر خلال الحصاد والتجفيف والتخزين والتصنيع، مما يجعل هذه السموم من بين أخطر مُلوثات الأغذية وأكثرها انتشاراً

على مستوى العالم. تُعتبر الفواكه الطازجة والمنتجات الزراعية عُرضةً للتلوث الفطري نظراً لنشاطها الأيضي العالي، وغناها بالسكريات والأحماض الأمينية والمعادن، وانخفاض مستوى الرقم الهيدروجيني فيها - وكلها عوامل تُهيئ بيئةً مثاليةً لنمو الفطريات وإنتاج السموم (Mannaa et al., 2017; Benkerroum 2020b).

تلعب العوامل البيئية غير الحيوية دوراً محورياً في تنظيم تخليق الأفلاتوكسين، وتُعدّ درجة الحرارة والرطوبة من أهمّ المُحدّدت. و أنّ النطاق الحراري الأمثل لنمو فطر *A. flavus* يتراوح بين 25 و37 درجة مئوية، بينما يكون إنتاج الأفلاتوكسين الأمثل غالباً عند درجات حرارة تتراوح بين 25-30 درجة مئوية بينما قد ينخفض الإنتاج عند درجات حرارة أعلى على الرغم من استمرار نمو الفطر (Donato et al., 2022; Battilani et al., 2016).

لا يمكن فصل تأثير درجة الحرارة عن النشاط المائي (a_w)، حيث يُعد الأخير عاملاً حاسماً في استقلاب الفطر. يتطلب إنتاج الأفلاتوكسين عادةً نشاطاً مائياً أعلى من 0.65، بينما تُسجل أعلى مستويات الإنتاج عند رطوبة نسبية عالية (90-95%) ودرجات حرارة معتدلة. لذلك، تُعد الرطوبة الكافية أثناء التخزين، خاصةً في ظل ظروف تهوية سيئة أو تجفيف غير كافٍ، سبباً رئيسياً لتراكم السموم (Achaglinkame et al., 2017; Lahouar et al., 2016).

تؤثر مجموعة من العوامل الحيوية وغير الحيوية على قابلية المحاصيل للإصابة بالعدوى الفطرية. تُضعف الضغوط البيئية، كالجفاف ونقص العناصر الغذائية، مناعة النبات وتزيد من قابليته للإصابة بالفطريات في مرحلة ما قبل الحصاد. كما يُسهّل التلف الميكانيكي الناتج عن الحشرات والطيور، أو التقلبات المناخية الحادة، دخول جراثيم الفطريات إلى أنسجة النبات. و أنّ تلوث الأفلاتوكسين يختلف اختلافاً كبيراً باختلاف الموقع الجغرافي والموسم، وذلك نتيجةً لاختلاف الظروف البيئية، وسلالات الفطريات، والتفاعلات البيولوجية داخل النظام الزراعي (Marasas et al., 2008).

علاوة على ذلك، يمكن أن تنتقل الفطريات إلى المحصول على شكل جراثيم كامنة تبقى نشطة حتى تتغير ظروف التخزين، مما يُفسر استمرار التلوث حتى بعد الحصاد (Abbas et al., 2009; Pinotti et al., 2016).

أما في مرحلة ما بعد الحصاد، تُعد ظروف التخزين العامل الحاسم في تحديد المستوى النهائي للتلوث. فارتفاع نسبة الرطوبة في الحبوب أو الثمار، إلى جانب سوء التهوية وارتفاع درجات الحرارة، يُهيئ بيئةً مثاليةً لنمو الفطريات وإنتاج السموم. أثبت خفض نسبة الرطوبة إلى أقل من 10% من خلال التجفيف السريع والفعال أنه من أنجح التدابير للحد من نمو فطر *A. flavus* وإنتاج الأفلاتوكسين (Hassane et al., 2017).

كما أن التخزين لفترات طويلة وسوء إدارة المستودعات يزيدان من احتمالية التلوث، لا سيما في المناخات الحارة والرطبة (Wagacha and Muthomi, 2008).

بالإضافة إلى العوامل الفيزيائية، تلعب العوامل الأيضية والداخلية دوراً هاماً في تنظيم إنتاج الأفلاتوكسين. وقد تبين أن الإجهاد التأكسدي داخل الخلايا الفطرية، الناتج عن الظروف البيئية القاسية، يحفز مسارات التخليق الحيوي للسموم عن طريق زيادة تراكم أنواع الأكسجين التفاعلية، والتي بدورها تنشط التعبير الجيني المرتبط بالأبيض الثانوي (Fountain *et al.*, 2016).

كما يؤثر نوع الكربون ومصدره بشكل مباشر على إنتاج السموم؛ فالسكريات البسيطة مثل الجلوكوز تعزز التخليق الحيوي، بينما قد تثبطه مصادر الكربون المعقدة. علاوة على ذلك، يُعدّ توازن الكربون/النيتروجين وتوافر العناصر النزرة، مثل الزنك والمغنيسيوم، من العوامل المؤثرة في كفاءة إنتاج الأفلاتوكسين (Kumar *et al.*, 2021).

لا تقتصر العوامل المؤثرة على الجوانب غير الحيوية فحسب، بل تشمل أيضاً التفاعلات الحيوية داخل البيئة الميكروبية. إذ يمكن للكائنات الدقيقة الأخرى، سواء أكانت بكتيريا منافسة أم فطريات، أن تثبط أو تحفز إنتاج الأفلاتوكسين، وذلك تبعاً لطبيعة التفاعل. ويؤدي نشاط الحشرات والعث في الحبوب المخزنة إلى تلف ميكانيكي وزيادة الرطوبة الموضعية، مما يعزز نمو الفطريات وتراكم السموم (Khan 2021 ; Asurmendi *et al.*, 2015).

يبدو أن إنتاج الأفلاتوكسين ناتج عن تفاعل معقد بين عوامل متعددة، تشمل الظروف البيئية، ووظائف الفطريات، وتركيب الركيزة، والتفاعلات الميكروبية. وتؤثر هذه العوامل مجتمعةً على تنظيم التعبير الجيني في مسارات التخليق الحيوي للأفلاتوكسين، مما يحدد في نهاية المطاف كفاءة إنتاج السموم الفطرية ومستوى التلوث في الغذاء أو العلف. لذلك، فإن الفهم الشامل لهذه العوامل ضروري لتطوير استراتيجيات فعالة للحد من انتشار هذه السموم في السلسلة الغذائية (Pitt and Hocking 2009)؛ (Benkerroum, 2020a).

2-1-4: الآثار الصحية للسموم الفطرية على الإنسان والحيوان:

تشكل السموم الفطرية (Mycotoxins) تهديداً بالغاً للصحة العامة، نظراً لقدرتها على إحداث تأثيرات حادة ومزمنة تعتمد على نوع السم، الجرعة، مدة التعرض، والحالة الصحية للفرد. وتتنوع هذه التأثيرات بين اضطرابات موضعية ومضاعفات جهازية قد تصل إلى السرطان أو الوفاة في حالات التسمم الشديد (Awuchi *et al.*, 2022).

تُعد الكبد من أكثر الأعضاء تأثراً بالسموم الفطرية، خاصةً Aflatoxins، حيث يؤدي استقلاب AFB1 إلى تكوين نواتج تفاعلية ترتبط بالحمض النووي، مسببةً طفرات جينية قد تنتهي بسرطان الخلايا الكبدية. وتزداد الخطورة عند وجود عدوى فيروس التهاب الكبد B، إذ يظهر تأثير تآزري واضح بين العاملين (Liu and Wu, 2010).

كما تؤثر بعض السموم على الكلى، مثل Ochratoxin A، الذي يسبب تلفاً أنبوبياً مزمناً ويُشتبه في ارتباطه بأمراض الكلى المستوطنة. في حين تُعرف Fumonisin بقدرة على تعطيل استقلاب Sphingolipids، مما يؤدي إلى تأثيرات عصبية وتنموية خطيرة (Xue et al., 2025).

تؤثر السموم الفطرية كذلك في الجهاز المناعي، حيث تُضعف الاستجابة الدفاعية وتزيد من قابلية الإصابة بالعدوى. أن التعرض المزمن لمستويات منخفضة من السموم يمكن أن يؤدي إلى تثبيط المناعة دون أعراض سريرية واضحة في البداية (Smith et al., 2016).

أما في الحيوانات، فتتسبب السموم الفطرية في انخفاض الإنتاجية، اضطرابات النمو، العقم، تراجع كفاءة تحويل الغذاء، وارتفاع معدلات النفوق، مما ينعكس اقتصادياً على قطاع الثروة الحيوانية. كما أن انتقال بعض نواتج الاستقلاب إلى الحليب واللحوم والبيض يخلق مساراً غير مباشر لتعرض الإنسان (Fink-Grenmels, 1999).

تزداد خطورة السموم الفطرية بسبب ظاهرة التعرض المتعدد (Multiple Exposure)، حيث قد يحتوي الغذاء الواحد على أكثر من نوع من السموم، مما يؤدي إلى تأثيرات تراكمية أو تآزرية تزيد من شدة الضرر البيولوجي، وهي قضية تحظى باهتمام متزايد في الأبحاث الحديثة (Alassane-Kpembi et al., 2017).

2-1-5: طرق دخول السموم الفطرية إلى الجسم:

تُعد السموم الفطرية، وخاصةً تلك التي تُنتجها أنواع فطر *Aspergillus spp.*، ملوثات بيولوجية يمكنها دخول جسم الإنسان عبر عدة مسارات رئيسية، بما في ذلك الجهاز الهضمي والجهاز التنفسي والجلد. وتعتمد آثار هذه السموم على الجسم على طريقة الدخول، وجرعة التعرض، ومدة التعرض، والحالة الصحية للفرد. ونظراً لانتشار جراثيم الفطريات على نطاق واسع في البيئة - في الهواء والتربة والماء - فإن احتمال التعرض لها يبقى قائماً، لا سيما في الأماكن المغلقة كالمنازل والمستشفيات (Awuchi et al., 2022).

2-1-5-1-1- عبر الجهاز الهضمي (التعرض عن طريق الفم):

يُعدّ الابتلاع الفموي (Oral ingestion) أكثر طرق دخول السموم الفطرية إلى جسم الإنسان شيوعاً، وخاصةً من خلال تناول الأطعمة الملوثة كالحبوب والمكسرات ومنتجات الألبان. بعد دخول الأفلاتوكسين إلى الجهاز الهضمي، يُمتص وينتقل إلى الكبد، حيث يخضع لتحول حيوي معقد بواسطة إنزيمات Cytochrome P450 التابعة لنظام الإجهاد التأكسدي الميكروسومي (Microsomal Mixed-Function Oxidase System - MFO). ينتج عن هذا التحول تكوين وسيط شديد التفاعل يُعرف باسم (AFB1-exo-8,9-epoxide)، والذي يتميز بألفة عالية للحمض النووي DNA والبروتينات، مما يؤدي إلى طفرات جينية خطيرة (Marchese *et al.*, 2018).

من أبرز الطفرات المرتبطة بهذا الوسيط تحول النيوكليوتيد G إلى T في الكودون 249 من جين كابتن الورم p53، وهي طفرة شائعة في سرطان الكبد المرتبط بالأفلاتوكسين. كما يُثبط هذا الوسيط التفاعلي تخليق البروتين والحمض النووي (DNA و RNA)، مما يُعطّل الوظائف الخلوية الطبيعية. علاوة على ذلك، يُسهم استنفاد Glutathione وزيادة إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية في زيادة الإجهاد التأكسدي داخل الخلايا، مما يُفاقم تلفها (Jolly *et al.*, 2013).

لا يقتصر الأيض على تكوين نواتج أضرار سامة فحسب، بل يشمل أيضاً مسارات إزالة السموم. يتحول بعض الأفلاتوكسين إلى نواتج أضرار أقل سمية، مثل AFM1 و AFQ1، عبر تفاعلات الهيدروكسيل. كما يمكن تحويله إلى شكل Dialdehyde، الذي يُختزل لاحقاً ويُطرح في البول. مع ذلك، قد تبقى بعض هذه النواتج الأضرمة، مثل AFM1، نشطة بيولوجياً وتظهر في الحليب، مما يزيد من خطر التعرض غير المباشر (Dai *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2016).

2-2-5-1-2- عبر الجهاز التنفسي (التعرض عن طريق الاستنشاق):

يُعدّ الاستنشاق (Inhalation) مساراً مهماً آخر لدخول السموم الفطرية، لا سيما في البيئات ذات التركيزات العالية من جراثيم الفطريات، مثل المستودعات الزراعية والمستشفيات والأماكن الرطبة سيئة التهوية. يمكن لجراثيم الفطريات أن تحمل السموم أو تنتجها بعد استقرارها في الجهاز التنفسي. قد يؤدي استنشاق هذه الجسيمات إلى أمراض تنفسية مثل Aspergillosis، خاصةً لدى الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة (Immunodeficiency). ويمكن أن يُسبب التعرض المزمن للسموم الفطرية عن طريق الاستنشاق تهيجاً في الجهاز التنفسي، واستجابات التهابية، وربما آثاراً جهازية نتيجة امتصاص السموم في مجرى الدم (Singh *et al.*, 2025).

2-5-1-3- التعرض عبر الجلدي (Dermal exposure):

على الرغم من أنه أقل شيوعاً من المسارات الأخرى، إلا أنه لا ينبغي إغفال الامتصاص الجلدي، خاصةً في حالات التعرض المهني المباشر لمواد ملوثة بالفطريات أو السموم الفطرية. يمكن لبعض هذه السموم اختراق حاجز الجلد، خاصةً في حال وجود جروح أو تلف جلدي، مما يسمح لها بالدخول إلى مجرى الدم. وقد يؤدي ذلك إلى آثار موضعية كالالتهاب، أو آثار جهازية في حالات التعرض المطول (Doi and Uetsuka, 2014).

2-1-6: الآثار الصحية بعد دخول السموم الفطرية للجسم:

بمجرد دخول السموم الفطرية إلى الجسم، تبدأ بالتفاعل مع المكونات الحيوية للخلايا، مما يؤدي إلى مجموعة واسعة من الآثار المرضية. تُعد الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) من أقوى مثبطات المناعة، إذ تؤثر على نشاط الخلايا المناعية وتقلل من قدرة الجسم على مكافحة العدوى. وقد يؤدي التعرض الحاد لكميات كبيرة منها إلى تسمم كبدي حاد، قد يكون مميتاً، بينما يرتبط التعرض المزمن لكميات قليلة منها بزيادة خطر الإصابة بسرطان الكبد (Gemede, 2025).

أن الآثار السامة للأفلاتوكسينات تراكمية بطبيعتها، وأن التعرض طويل الأمد لها قد يؤدي إلى أمراض مزمنة مثل تليف الكبد (Liver damage)، ومرض الكبد الدهني (Fatty liver disease)، واضطرابات النمو. تؤثر هذه السموم سلباً على نمو الجنين من خلال إعاقه تخليق البروتين وإضعاف امتصاص العناصر الغذائية الأساسية كالفيتامينات (A، B12، C، D، E) والمعادن (كالزنك والحديد والسيلينيوم)، مما قد يؤدي إلى الإجهاض أو تأخر النمو (Smith et al., ; Magnoli et al., 2011). (2017).

2-2: الفطريات المنتجة للسموم الفطرية:

تُعد الفطريات الخيطية من أكثر الكائنات الدقيقة ارتباطاً بإنتاج السموم الفطرية، إذ تمتلك العديد من الأنواع القدرة على تصنيع مركبات أيضية ثانوية ذات تأثيرات سمية معقدة. وتتركز الأهمية التطبيقية لهذه الفطريات في تأثيرها المباشر على جودة الأغذية وسلامتها، إضافة إلى دورها في خسائر المحاصيل والمنتجات المخزونة. وأن عدداً محدوداً من الأجناس الفطرية مسؤول عن النسبة الأكبر من السموم ذات الأهمية الصحية، وفي مقدمتها *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Alternaria* (Pitt and Hocking, 2022).

ينتج كل جنس من هذه الأجناس نوعاً خاصاً من السموم الفطرية ويستهدف بيئة محددة. فجنس *Aspergillus* ينتج طيف واسع من سموم Aflatoxins، خاصةً في البيئات الحارة وشبه الجافة.

وفطر *Fusarium* يرتبط غالباً بالمحاصيل الحقلية مثل الذرة والقمح، وتنتج Fumonisin و Zearalenone و Trichothecenes. أما *Penicillium* فيرتبط بالأغذية المخزونة والمبردة، ويُعد مصدرًا رئيسيًا لسم Ochratoxin A و Patulin (Wu, 2021).

لا يقتصر دور هذه الفطريات على إنتاج السموم فقط، بل تمتلك أنظمة جينية معقدة تنظم وتحكم في الأيض الثانوي استجابةً للضغوط البيئية. وأن إنتاج السموم يرتبط بشبكات تنظيمية تشمل عوامل نسخ، ومسارات إشارات، وتعديلات فوق جينية، مما يفسر التباين الكبير بين السلالات المختلفة في مستوى السمية (Keller 2019).

2-2-1: أهم الفطريات المنتجة للسموم الفطرية:

تُعد الفطريات المنتجة للسموم الفطرية (Mycotoxins) من أخطر الملوثات البيولوجية المرتبطة بالأغذية والمحاصيل الزراعية، نظراً لقدرتها على إفراز مركبات سامة ذات تأثيرات صحية واقتصادية واسعة. وتنتمي هذه الفطريات غالباً إلى أجناس *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium*، وهي أجناس واسعة الانتشار في البيئات الزراعية ومخازن الأغذية، وتمتلك قدرة عالية على التكيف مع ظروف الرطوبة والحرارة المختلفة (Pitt and Hocking, 2022).

أن بعض الأنواع الفطرية قادرة على إنتاج أكثر من نوع واحد من السموم، في حين قد يُنتج النوع الواحد طيفاً مختلفاً من السموم تبعاً للبيئة والعزلة الوراثية. ولهذا فإن فهم الخصائص البيولوجية والتصنيفية لهذه الفطريات يُعد أساساً ضرورياً لتطوير استراتيجيات الكشف والسيطرة عليها (Kushwaha et al., 2025).

2-2-2: أنواع الرشاشيات المنتجة للسموم:

يُعد جنس *Aspergillus* sp أحد أكبر وأهم أجناس الفطريات الخيطية، إذ يضم مئات الأنواع الموجودة في التربة والهواء ومختلف المواد العضوية. وتختلف هذه الأنواع في قدرتها على إنتاج السموم الفطرية، ويمكن تصنيفها بشكل عام إلى أنواع منتجة للسموم وأخرى غير منتجة لها أو منتجة لها بشكل ضعيف. ولا يرتبط هذا التباين بالاختلافات التصنيفية فحسب، بل يتأثر أيضاً بالتركيب الجيني لكل نوع والظروف البيئية المحيطة به. وأن عدداً كبيراً من الأنواع في هذا الجنس يمتلك القدرة الجينية على إنتاج مستقلبات ثانوية سامة، على الرغم من أن ظهور هذه القدرة يختلف من سلالة إلى أخرى (Rudramurthy et al., 2019).

تضم الأنواع المنتجة للسموم الفطرية من جنس *Aspergillus* ssp مجموعة من الأنواع ذات الأهمية الصحية والاقتصادية الكبيرة، مثل (*A. parasiticus*, *A. flavus*) المنتجة Aflatoxin و A.

Ochraceus المنتجة لسم *Ochratoxin A* وفطر *A. niger* الذي قد ينتج *Ochratoxin* وسموماً أخرى في ظروف معينة). وتُعدّ هذه الأنواع مسؤولةً عن تلوث العديد من المنتجات الغذائية، لا سيما الحبوب والمكسرات، مما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة ومخاطر صحية جسيمة *Frisvad et al.*, (Benkerroum 2020a ; 2019).

هناك أنواع أخرى من الرشاشيات غير منتجة للسموم (*Non-toxigenic Aspergilli*) أو لها استخدامات صناعية مفيدة، مثل (*A. oryzae* و *A. sojae*)، والتي تُستخدم على نطاق واسع في تخمير الأغذية وإنتاج الأنزيمات. ويُعتقد أن هذه الأنواع قد فقدت قدرتها على إنتاج السموم نتيجةً للتطور الجيني أو الانتقاء الاصطناعي طويل الأمد (Yu and Ehrlich, 2011).

من الجدير بالذكر أن القدرة على إنتاج السموم ليست سمة ثابتة، بل قد تختلف داخل النوع الواحد تبعاً للسلسلة. فبعض السلالات تمتلك مجموعات جينية كاملة لإنتاج السموم، بينما تفتقر سلالات أخرى إلى أجزاء من هذه المجموعات، مما يجعلها عاجزة عن التخليق الحيوي للسموم. هذا التباين يُبرز أهمية التحليل الجزيئي في التمييز بين السلالات السامة وغير السامة، لا سيما في التطبيقات المتعلقة بسلامة الغذاء (Geiser et al., 2007).

2-2-2-1: جنس الرشاشيات (*Aspergillus*)

يُعد جنس *Aspergillus* من أكثر الأجناس الفطرية انتشاراً في الطبيعة، ويضم مئات الأنواع التي تتباين في خصائصها البيئية والمرضية والأیضية. وتنتشر هذه الفطريات في التربة، الهواء، المواد العضوية المتحللة، والمنتجات الزراعية، مما يمنحها فرصة كبيرة للوصول إلى الأغذية خلال مراحل الإنتاج أو التخزين (Paulussen et al., 2017).

يكتسب هذا الجنس أهمية خاصة بسبب عدد من أنواعه القادرة على إنتاج السموم الفطرية (*Mycotoxins*)، مثل (*Sterigmatocystin*, *Ochratoxin A*, *Aflatoxin*). وتُعد هذه المركبات مسؤولة عن نسبة كبيرة من حالات التلوث الغذائي في الحبوب، المكسرات، الفواكه المجففة، والتوابل، خاصة في البيئات ذات الرطوبة والحرارة المرتفعتين (Amaike and Keller, 2011).

يتميز جنس *Aspergillus* من الناحية المورفولوجية، بحوامل أبواغ تنتهي بحويصلات تحمل خلايا مولدة للأبواغ، ما يمنحه مظهراً مميزاً تحت المجهر. كما أن تنوع ألوان المستعمرات بين الأصفر والأخضر والأسود يعكس اختلاف الأنواع والمجاميع التصنيفية داخل الجنس (Mahata et al., 2022).

يُعد *A. flavus* من أهم الأنواع الفطرية المنتجة للأفلاتوكسينات (Aflatoxins)، ويُصنف ضمن القسم Flavi من جنس *Aspergillus*. ويتميز هذا النوع بانتشاره الواسع في المناطق المدارية وشبه المدارية، حيث يُعزل بشكل متكرر من التربة، الحبوب، البذور الزيتية، المكسرات، والفواكه المجففة (Klich, 2007).

تتميز فطريات *Aspergillus sp* بتكوين مستعمرات خيطية تختلف في اللون والملس تبعاً للنوع والوسط الغذائي. قد تظهر المستعمرات بألوان تتراوح بين الأخضر والأصفر والبني والأسود والأبيض، وغالباً ما يكون سطحها مسحوقاً أو مخملياً نتيجة لتكوّن الأبواغ. قد تُنتج بعض الأنواع أيضاً أصبغاً أو إفرازات قابلة للذوبان، وقد يُظهر الجانب السفلي من المستعمرة لوناً مميزاً يُستخدم في تحديدها. يُعدّ معدل النمو وتحمل الحرارة من الخصائص المهمة لتمييز الأنواع، لا سيما في التطبيقات السريرية والبيئية (Germain e tal., 2003).

يظهر *A. flavus* مستعمرات ذات لون أخضر مصفر إلى زيتوني، مع نمو سريع نسبياً على الأوساط الغذائية الشائعة. وتُنتج بعض سلالاته أجساماً صلبة تعرف بـ *sclerotia*، وهي تراكيب مقاومة تساعد الفطر على البقاء في الظروف البيئية غير الملائمة (Jitendrabhal, 2020).

تكمن أهميته الأساسية في قدرته على إنتاج الأفلاتوكسينات من النوع B، خاصة AFB1 و AFB2، وتُعد الأولى من أكثر السموم المسرطنة المعروفة طبيعياً. كما يمكن لبعض السلالات غير السامة أن تُستخدم في برامج مكافحة الحيوية عبر التنافس مع السلالات المنتجة للسموم، وهي استراتيجية أثبتت نجاحاً في تقليل التلوث في الحقول الزراعية (Ramadan and Al-Ameri, 2022).

على المستوى الجزيئي، يحتوي *A. flavus* على مجموعة جينية مسؤولة عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين تضم أكثر من 25 جيناً، يتم تنظيمها عبر عوامل نسخ متخصصة مثل *aflR* و *aflS*. ويتأثر نشاط هذه الجينات بعوامل بيئية عديدة، مما يفسر تباين الإنتاج بين السلالات والظروف المختلفة (Yu, 2012).

يُعد جنس *Aspergillus* من أكثر الأجناس الفطرية ارتباطاً بتلوث الأغذية، ويضم مئات الأنواع التي تنتشر في التربة، الهواء، المخلفات النباتية، والمنتجات الزراعية المخزنة. ويتميز هذا الجنس بقدرته العالية على النمو في بيئات منخفضة النشاط المائي، مما يجعله شائعاً في الحبوب، المكسرات، الفواكه المجففة، (Samson et al., 2014).

يعتبر جنس *Aspergillus* أحد أهم الأجناس الفطرية المهمة، منذ اكتشافه في عام 1729م على يد العالم Micheli (Abdel-Azeem et al., 2019).

Kingdom: Fungi

Phylum (Division): Ascomycota

Class: Plectomycetes

Subclass: Eurotiomycetidae

Order: Eurotiales

Family: Aspergillaceae

Genus: *Aspergillus* (Klich 2007)

***A. flavus* نوع -1-1-2-2-2:**

يعدّ فطر *A. flavus* من أهمّ أنواع الفطريات المنتجة للسموم في هذا الجنس، وذلك لقدرتها على إنتاج الأفلاتوكسينات، ولا سيما الأفلاتوكسين B1، وهو من أقوى المواد المسرطنة المعروفة (Frisvad et al., 2019).

يتميز فطر *A. flavus* ببنية خيطية متعددة الخلايا. إذ تتكون من خيوط فطرية شفافة ومقسمة بحواجز عرضية، وتُشكّل مستعمرات مرئية بالعين المجردة. غالباً ما تتميز بلون أخضر مصفر أو أخضر زيتوني. ويُنتج الفطر أبواغاً لا جنسية (conidia) تتكون من حوامل كونيدية (conidiophores)

تنتهي بحويصلات كروية (Vesicles) تحمل الفياليات (phialides) وقد تكون مرتبة في صف واحد (uniseriate) أو صفين (biseriate)، وهي من الصفات المورفولوجية المهمة في تمييز أنواع الجنس. كما يمتلك *A. flavus* القدرة على التكاثر الجنسي في ظروف بيئية مناسبة، حيث تتكون الأبواغ الزقية (ascospores) داخل أكياس زقية (asci) ضمن تراكيب جنسية متخصصة (Frisvad, 2019; Okayo et al., 2020).

ينتشر *A. flavus* على نطاق واسع في المناطق الحارة وشبه القاحلة، وهي أكثر شيوعاً في آسيا والشرق الأوسط وأفريقيا مقارنةً ببعض الأنواع الأخرى، مثل *A. fumigatus*. يُعزى ذلك إلى قدرتها العالية على التكيف مع درجات الحرارة المرتفعة وانخفاض النشاط المائي، مما يمنحها ميزة بيئية في هذه المناطق (Krishnan et al., 2009). على الرغم من أن فطر *A. fumigatus* هو العامل المسبب الأكثر شيوعاً لداء الرشاشيات الغازي (Invasive Aspergillosis IA)، إلا أن فطر *A.*

flavus هو ثاني أكثرها الفطريات شيوعاً، حيث يُسبب طيفاً واسعاً من الحالات المرضية، بما في ذلك التهابات التحسسية، واستعمار الجيوب الأنفية، والتهابات الأذن (Chakrabarti et al., 2011).

يُصنف فطر *A. flavus* كفطر رمي، قادر على النمو على مجموعة متنوعة من المواد العضوية، مثل بقايا النباتات، والحبوب المخزنة، والأعلاف، وحتى المواد المتحللة. كما أنه يمتلك القدرة على البقاء في الظروف القاسية من خلال تكوين تراكيب مقاومة تُعرف باسم الأجسام الصلبة (Sclerotia)، والتي تُمكنه من الاستمرار خلال فترات الجفاف أو نقص المغذيات. عندما تتحسن الظروف البيئية، يمكن لهذه الأجسام الصلبة أن تنبت لتكوين مستعمرات جديدة، مما يُساهم في انتشار الفطر (Yu and Ehrlich, 2011).

فيما يتعلق بإنتاج السموم، يُظهر فطر *A. flavus* تبايناً كبيراً بين سلالاته. فبعض السلالات فقط قادرة على إنتاج الأفلاتوكسينات، وغالباً ما تُنتج هذه السلالات أفلاتوكسينات من النوع B (AFB1) و (AFB2)، بينما *A. parasiticus*، تستطيع إنتاج كلٍ من أفلاتوكسينات B و G بانتظام. ويُعد هذا الاختلاف في أنماط إنتاج السموم معياراً هاماً للتمييز بين الأنواع (Frisvad et al., 2019).

يُشكل أفلاتوكسين B1 خطراً كبيراً على الحالة الصحية، إذ يتحول في الكبد إلى مستقلبات نشطة قد تُسبب طفرات جينية وسرطان الكبد. كما يُمكن أن يتحول هذا المركب في الحيوانات إلى أفلاتوكسين M1، الذي يُفرز في الحليب ويُشكل خطراً على الإنسان، وخاصة الأطفال، مما دفع الجهات التنظيمية إلى وضع حدود صارمة لمستوياته في الغذاء (Fuquay et al., 2011). يُبرز هذا المسار البيولوجي أهمية مكافحة تلوث المواد الغذائية كخطوة حاسمة في الحد من انتقال السموم إلى السلسلة الغذائية. فبالإضافة إلى آثاره الصحية، يُصنف فطر *A. flavus* ضمن أخطر الفطريات على مستوى العالم نظراً لتأثيره المزدوج، فهو يُسبب أمراضاً للإنسان، ويؤدي في الوقت نفسه إلى خسائر زراعية فادحة من خلال إصابة المحاصيل قبل وبعد الحصاد. كما يتميز بقدرة عالية على إحداث المرض مقارنةً ببعض الأنواع الأخرى، كما هو موضح في النماذج الحيوانية (Hyde et al., 2018).

يُكوّن *A. flavus* مستعمرات ذات لون أخضر زيتوني إلى أصفر مخضر، مع سطح حبيبي أو مسحوقي، بينما يظهر الوجه الخلفي للمزرعة بلون ذهبي أو عديم اللون. وتتميز حوامل الكونيديا بأنها خشنة الجدار وتنتهي بحويصلة كروية تحمل خلايا مولدة للجراثيم مرتبة غالباً في طبقة واحدة أو طبقتين (Klich, 2007).

تضم الأنواع الأخرى المهمة من جنس *Aspergillus* كلاً من *A. nomius* و *A. parasiticus* وهما من الأنواع التابعة لقسم *Flavi* والقادرة على إنتاج الأفلاتوكسينات. يتميز *A. parasiticus* بقدرته العالية والمستقرة على إنتاج الأفلاتوكسينات الرئيسية *AFB1* و *AFB2* و *AFG1* و *AFG2*، ويرتبط بتلوث عدد من المحاصيل الغذائية، ولاسيما الفول السوداني والذرة. كما يُعدّ *A. nomius* من الأنواع المنتجة للأفلاتوكسينات بنوعيه *B* و *G*، وتشمل *AFB1* و *AFB2* و *AFG1* و *AFG2*، مما يجعله ذا أهمية في مجال سلامة الغذاء (Arias et al., 2021 ; Shabeer et al., 2022 ; Ajmal et al., 2022).

ومن الأنواع الأخرى *A. nidulans* ، وهو فطر خيطي واسع الانتشار ويُستخدم نموذجاً مهماً في الدراسات الجزيئية والوراثية، ولا يُعد منتجاً للأفلاتوكسينات، إلا أن دراسته أسهمت في فهم تنظيم الأيض الثانوي وآليات تنظيم إنتاج السموم الفطرية. أما *A. niger* ، فيُعد من الأنواع الشائعة في الأغذية والبيئات المختلفة، وتتميز مستعمراته باللون الأسود نتيجة كثافة تكوين الكونيديا، كما يتمتع بقدرة عالية على التكيف والنمو في ظروف بيئية متنوعة. وعلى الرغم من أهميته الصناعية، فإن بعض عزلاته قد تنتج سموماً فطرية أخرى، مثل *Ochratoxin A* و *Fumonisin*، مما يمنحه أهمية إضافية في مجال سلامة الأغذية (Perrone and Gallo, 2016 ; Pinheiro et al., 2023).

2-3: الأمراض المرتبطة بفطريات الرشاشيات

يُعدّ جنس *Aspergillus spp.* من الفطريات واسعة الانتشار في البيئة، وتوجد أبواغها في الهواء والتربة والمواد العضوية المتحللة، مما يجعل تعرض الإنسان له شائعاً. حيث يُمثل هذا الجنس مصدراً هاماً للأمراض، لا سيما للأفراد الذين يعانون من نقص المناعة (*Immunosuppression*) أو المصابين بأمراض تنفسية مزمنة. أما بالنسبة لمعظم الأفراد الأصحاء لديهم القدرة على التخلص من هذه الأبواغ بفضل أجهزتهم المناعية الفعّالة. وتشمل الأمراض المرتبطة بالرشاشيات طيفاً واسعاً من الحالات، بدءاً من الحساسية الخفيفة (*Mild allergic disease*) وصولاً إلى العدوى الغازية المهددة للحياة (*Invasive disease*) (Sugui et al., 2015).

يمكن تصنيف الأمراض التي تسببها فطريات *Aspergillus spp.* عموماً إلى أربع فئات رئيسية. الأولى هي العدوى الغازية (*Invasive Aspergillosis (IA)*)، وهي الأخطر، وغالباً ما تحدث لدى المرضى الذين يعانون من نقص المناعة الشديد (*Sever immunodeficiency*)، مثل مرضى السرطان أو متلقي زراعة الأعضاء. أما الثانية فهي داء الرشاشيات الرئوي المزمن (*Chronic Pulmonary Aspergillosis (CPA)*) ، والذي يُصيب عادةً الأفراد الذين يعانون من أمراض

رئوية سابقة أو تشوهات هيكلية في الرئة. تشمل الفئة الثالثة الأمراض التحسسية (Allergic disease)، مثل داء الرشاشيات القصبي الرئوي التحسسي (Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA)، الذي ينتج عن استجابة مناعية مفرطة للجراثيم المستنشقة. أما الفئة الرابعة فتشمل العدوى السطحية أو الموضعية (Superficial/ Localized Infection)، مثل التهاب القرنية أو التهابات الجروح بعد العمليات الجراحية (Rudramurthy *et al.*, 2019).

تُعدّ العدوى الغازية Invasive Aspergillosis (IA)، ولا سيما داء الرشاشيات الرئوي الغازي Invasive pulmonary aspergillosis، من أخطر أشكال هذا المرض، إذ تتميز بتطورها السريع وارتفاع معدل الوفيات في حال عدم علاجها فوراً. تحدث هذه العدوى عندما تخترق جراثيم الفطريات دفاعات الجهاز التنفسي، ثم تنتشر عبر مجرى الدم إلى أعضاء أخرى. وتلعب الخلايا المناعية، وخاصة العدلات، دوراً حاسماً في الوقاية من تطور هذه العدوى؛ إذ يؤدي نقصها أو ضعفها إلى زيادة كبيرة في قابلية الإصابة بها (Adjovi *et al.*, 2025).

يُعدّ فطر *A. fumigatus* العامل المُسبّب الأكثر شيوعاً لداء الرشاشيات (Aspergillosis)، يليه فطر *A. flavus* الذي يُعدّ ثاني أكثر الأنواع انتشاراً، لا سيما في المناطق الحارة والجافة كآسيا والشرق الأوسط وأفريقيا. يميّز هذا النوع بقدرة عالية على التكيف مع درجات الحرارة المرتفعة. كما يُساهم فطر *A. flavus* بنسبة كبيرة من حالات داء الرشاشيات القصبي الرئوي التحسسي (Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis (ABPA)، بالإضافة إلى دوره في التهاب الجيوب الأنفية والتهابات الجلد (Rudramurthy *et al.*, 2019).

بينما تُعدّ الأمراض التحسسية المرتبطة بفطر الرشاشية شائعة نسبياً، خاصة لدى مرضى الربو أو التليف الكيسي. ويُعدّ داء الرشاشيات القصبي الرئوي التحسسي (ABPA) مثالاً بارزاً على ذلك، حيث يؤدي استنشاق الأبواغ إلى استجابة مناعية مفرطة تُسبّب التهاباً مزمنياً في المسالك الهوائية. وقد تُؤدّي هذه الاستجابة إلى تلف رئوي مُتفاقم إذا لم يتم تشخيصها وعلاجها بشكل مناسب (Sugui *et al.*, 2015).

إضافةً إلى العدوى المباشرة، تُشكّل السموم الفطرية (Mycotoxin) التي تُنتجها بعض أنواع فطر *Aspergillus spp.*، كالأفلاتوكسينات (Aflatoxins)، خطراً صحياً جسيماً. ويتعرّض ما يقارب 4.5 مليار شخص في الدول النامية لهذه السموم عبر الغذاء الملوث، ما يجعلها من أهم عوامل الخطر على الصحة العامة عالمياً. تُعدّ الأفلاتوكسينات من أقوى المواد المسرطنة الطبيعية، ويرتبط التعرّض المزمن لها بزيادة خطر الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية (Kumar *et al.*, 2017).

وتُبين الدراسات الوبائية إلى أن الأطفال هم الأكثر تضرراً نتيجة التعرض للأفلاتوكسينات، وهو ما يرتبط بضعف النمو البدني وقصر القامة، فضلاً عن آثارها السامة على الكبد (Voth-Gaeddert *et al.*, 2018).

2-4: السموم التي تنتجها الرشاشيات

يتميز جنس *Aspergillus* spp. بقدرته على إنتاج مجموعة واسعة من الأيضات الثانوية (Secondary metabolites)، بما في ذلك السموم الفطرية (Mycotoxins) التي تُعد من أخطر الملوثات البيولوجية للأغذية والأعلاف. تُنتج هذه السموم نتيجة تفاعل معقد بين العوامل الوراثية للفطر والظروف البيئية المحيطة، مثل درجة الحرارة والرطوبة ونوع الركيزة. تُشكل هذه المركبات مصدر قلق عالمي، ليس فقط لتأثيرها المباشر على صحة الإنسان والحيوان، بل أيضاً للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي تُسببها في القطاع الزراعي (Navale *et al.*, 2021).

تُعد الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) من أشهر السموم التي تنتجها أنواع الرشاشيات، وخاصةً *A. flavus* و *A. parasiticus*. اكتُشفت هذه السموم لأول مرة في ستينيات القرن الماضي عقب تفشي مرض الديك الرومي إكس (Turkey X disease)، الذي أدى إلى نفوق أعداد كبيرة من الطيور نتيجة استهلاكها أعلافاً ملوثة (De Iongh *et al.*, 1962).

الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) تنتمي إلى فئة من المركبات الكيميائية تُعرف باسم (Difurocoumarins)، وتتميز بسميتها العالية. وهي مواد مسرطنة، ومُطفرة، ومثبطة للمناعة (Abrehame *et al.*, 2023).

هناك أربعة أنواع رئيسية من الأفلاتوكسينات: AFB1 و AFB2 و AFG1 و AFG2. يشير الحرفان B و G إلى لون تألقها تحت الأشعة فوق البنفسجية (الأزرق B أو الأخضر G). يُعد AFB1 الأكثر سمية وانتشاراً، ويرتبط ارتباطاً مباشراً بسرطان الخلايا الكبدية. يمكن العثور على نواتج أيضية أخرى لهذه السموم، مثل AFM1 و AFM2، في الحليب ومنتجات الألبان نتيجة لعملية أيض الأفلاتوكسين في الحيوانات (Dai *et al.*, 2017 ; Wu *et al.*, 2016).

تتميز Aflatoxins بثباتها العالي، إذ لا تتأثر بسهولة بالمعاملة الحرارية التقليدية أو التجميد، مما يجعل إزالتها من الطعام أمراً صعباً. كما أن هذه السموم لا تتحلل تماماً في جسم الحيوان، ويمكن أن تنتقل عبر السلسلة الغذائية إلى الإنسان. وأن التعرض المزمن لهذه المركبات قد يؤدي إلى طفرات جينية، وتلف الكبد، وضعف الجهاز المناعي، بالإضافة إلى دورها المؤكد في التسبب بالسرطان (Pickova *et al.*, 2021 ; Benkerroum 2020b).

ان فطريات الرشاشيات قادرة على إنتاج طيف واسع من الأيضات الثانوية السامة ذات التراكيب الكيميائية والتأثيرات البيولوجية والصحية المتنوعة ولا يقتصر ذلك فقط على الأفلاتوكسينات. ويعكس هذا التنوع الأيضي تعقيد المسارات الحيوية داخل هذه الفطريات، فضلاً عن قدرتها على التكيف مع ظروف بيئية متعددة، مما يزيد من احتمالية تلوث الأغذية والأعلاف بالعديد من السموم في آن واحد (Navale et al., 2021).

تشمل السموم الأخرى التي ينتجها هذا الجنس Cyclopiazonic acid (CPA)، وهو مركب يؤثر على الجهاز العصبي عن طريق تثبيط الأنزيمات المنظمة للكالسيوم داخل الخلايا، مما يؤدي إلى خلل في وظائفها. كما ينتج فطر *A. fumigatus* مركبات مثل Gliotoxin، وهو عامل مساهم في إمراضية الفطر لقدرته على تثبيط جهاز المناعة. وتوجد أيضاً مركبات أخرى، مثل (Fumitremorgins)، وهي قلويدات تُسبب اضطرابات عصبية كالرعاش (Arias et al., 2018) ; (Plewa-Tutaj et al., 2024 ; Pfliegler et al., 2020).

تُصنّف السموم الفطرية إلى مجموعات رئيسية اعتماداً على بنيتها الكيميائية، والفطر المنتج لها، وطبيعة تأثيرها السمي على الكائنات الحية. ويُعد هذا التصنيف أساساً مهماً لفهم سلوك هذه السموم في الأغذية والبيئة، وتحديد مستويات الخطورة المرتبطة بها. وعلى الرغم من وجود مئات المركبات الفطرية السامة، فإن عدداً محدوداً منها يُمثل التهديد الأكبر للصحة العامة والتجارة الغذائية الدولية (Frisvad et al., 2019).

تُنتج فطريات *Fusarium* مجموعة واسعة من السموم، من أبرزها سم Fumonisin والتي ترتبط باضطرابات عصبية وسرطانية، وسم Trichothecenes المعروفة بتأثيرها المثبط لتخليق البروتين، وسم Zearalenone الذي يُظهر نشاطاً إستروجينياً يؤثر في الجهاز التناسلي، خاصة لدى الحيوانات (Ekwomadu et al., 2021).

من السموم الأخرى المهمة Patulin، الذي يوجد غالباً في التفاح ومنتجاته، وينتج عن بعض أنواع *Aspergillus* و *Penicillium*. ويُعد مؤشراً على فساد الأغذية، كما يرتبط بآثار سامة على الجهاز الهضمي والمناعة (Gonçalves et al., 2019).

2-4-1: الأفلاتوكسينات Aflatoxins

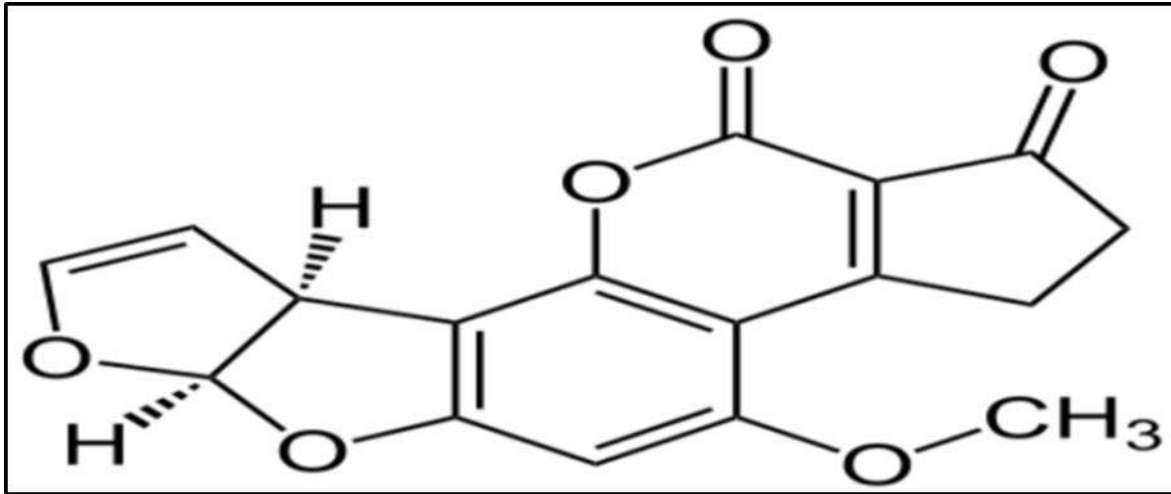
تم اكتشاف Aflatoxins بعد انتشار وباء في المملكة المتحدة عام 1960، عُرف باسم مرض الديك الرومي X (Turkey X disease)، والذي أودى بحياة أكثر من 100.000 طائر نتيجة تناولهم علفاً ملوثاً بفطر *A. flavus*. شكّلت هذه الحادثة نقطة تحوّل في أبحاث السموم الفطرية، إذ أدّت إلى

اكتشاف الأفلاتوكسينات وفتحت المجال أمام دراسات معمّقة حول طبيعتها الكيميائية وتأثيراتها البيولوجية (Bennett et al., 2007 ;Blount, 1961).

وتُعدّ الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) من أخطر السموم الفطرية المعروفة. وهي نواتج أيضية ثانوية شديدة السمية تُنتجها أنواع معينة من فطر *Aspergillus spp.*، ولا سيما *A. flavus* و *A. parasiticus*. وتتميز هذه المركبات بخصائصها المسرطنة والمطفرة والمثبطة للمناعة، فضلاً عن تأثيراتها السامة على الكبد، مما يجعلها من أهم الملوثات الحيوية التي تُهدد سلامة الغذاء عالمياً. تنتشر هذه السموم على نطاق واسع في الفواكه المجففة والطازجة، وخاصة عند سوء التخزين في بيئات رطبة ودافئة، وتتركز في التين، المشمش، الزبيب، والمكسرات، في البيئات الحارة والرطبة، حيث تتوفر الظروف المثالية لنمو الفطريات وإنتاج السموم (González et al., 2023).

تُشير Aflatoxins قلقاً صحياً بالغ الأهمية، إذ تُصنّفها الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) ضمن المجموعة الأولى من المواد المسرطنة، وهو أعلى تصنيف يُشير إلى وجود أدلة كافية على قدرتها على التسبب بالسرطان، لا سيما سرطان الكبد (Contam et al., 2020).

يُعدّ الأفلاتوكسين B1 (AFB1) أكثر هذه المركبات سميةً وانتشاراً، ويرتبط ارتباطاً مباشراً بتحفيز طفرات جينية خطيرة، خاصةً في *p53 tumor suppressor gene*، الذي يُساهم في تطور السرطان (Eaton and Groopman, 2013).



شكل (2-2) التركيب الكيميائي لسم Aflatoxin B1 (Li et al., 2018)

قد ازداد الاهتمام العلمي بهذه السموم، لا سيما مع تطوّر تقنيات التحليل الجزيئي (Molecular degradation methods) التي ساهمت في فهم مساراتها الحيوية والعوامل البيئية المؤثرة في إنتاجها (Adjovi et al., 2025). وتمّ تحديد ما يقارب 18-20 نوعاً من الأفلاتوكسينات، أبرزها

AFB1 و AFB2 و AFG1 و AFG2، بالإضافة إلى AFM1، وهو مستقلب موجود في الحليب ناتج عن استقلاب AFB1 في أكباد الحيوانات. ويُعدّ وجود AFM1 في الحليب ومنتجات الألبان مصدر قلق صحي كبير نظراً لاحتمالية انتقاله إلى الإنسان، وخاصة الأطفال (Dai et al., 2017).

تُظهر هذه المركبات أيضاً خصائص فلورية مميزة تحت الأشعة فوق البنفسجية، حيث تُصدر المركبات من النوع B ضوءاً أزرق (Blue)، بينما تُصدر المركبات من النوع G ضوءاً أخضر (Green)، وهو ما يُستخدم في الكشف عنها مخبرياً (Balina et al., 2018).

وتشير تقديرات منظمة الأغذية والزراعة (FAO) إلى أن نسبة كبيرة من المحاصيل العالمية قد تكون ملوثة بالسموم الفطرية، مما يؤثر سلباً على الأمن الغذائي والاقتصاد الزراعي. ويمكن أن يحدث تلوث بالأفلاتوكسين في مراحل متعددة، قبل الحصاد وبعده، وأثناء التخزين والنقل، لا سيما في ظل الممارسات الزراعية السيئة وارتفاع الرطوبة ودرجات الحرارة (Pankaj et al., 2018).

تتركز التأثيرات البيولوجية للأفلاتوكسينات بشكل أساسي في تأثيرها على الكبد. ويُستقلب الأفلاتوكسين B1 (AFB1) داخل الجسم إلى مركب تفاعلي يُعرف باسم AFB1-8,9-Epoxy، وهو جزيء شديد السمية قادر على الارتباط بالجزئيات الكبيرة كالحمض النووي DNA والبروتينات، مما يؤدي إلى تلف خلوي واسع النطاق وطفرة جينية (Amaike and Keller, 2011). يمكن أن يؤدي التعرض الحاد لهذه السموم إلى نخر الخلايا الكبدية (Hepatocellular necrosis) وفشل الكبد (Liver failure)، بينما يرتبط التعرض المزمن لجرعات منخفضة بتليف الكبد (Liver damage) وسرطان الخلايا الكبدية (Hepatocellular carcinoma HCC)، بالإضافة إلى آثار أخرى مثل تثبيط المناعة (Immunosuppression)، وتأخر النمو (Growth retardation)، والعيوب الخلقية (Congenital malformations) (Gong et al., 2016; Marchese et al., 2018).

لا تقتصر آثار الأفلاتوكسينات على الكبد فحسب، بل تمتد إلى أعضاء أخرى مثل الكلى والرئتين والقلب، وذلك بسبب الإجهاد التأكسدي (Oxidative stress) الذي تُحدثه داخل الخلايا. كما تختلف شدة الآثار السامة تبعاً لعدة عوامل، بما في ذلك العمر، والحالة الصحية، ومدة التعرض، والجرعة (Kumar et al., 2017).

يُعدّ التعرض للأفلاتوكسينات عبر الغذاء المسار الرئيسي لدخول هذه السموم إلى جسم الإنسان، لا سيما في الدول النامية ذات أنظمة الرقابة الغذائية الضعيفة وظروف التخزين السيئة. وعلى المستوى الجزيئي، أن تخليق الأفلاتوكسينات يتم عبر مسارات أيضية معقدة تُسيطر عليها مجموعة من الجينات المتجاورة في الجينوم الفطري. وقد تم تحديد أكثر من 25-30 جيناً مشاركاً في هذا المسار، تُعرف

مجتمعةً باسم مجموعة جينات التخليق الحيوي للأفلاتوكسينات The aflatoxin biosynthesis gene cluster. يُعدّ فهم هذه المسارات أمراً بالغ الأهمية لتطوير استراتيجيات مبتكرة للحد من إنتاج هذه السموم، سواءً من خلال التدخلات البيئية أو التقنية الحيوية (Moore et al., 2013; Caceres et al., 2020).

2-5: التخليق الحيوي للأفلاتوكسين

يُعدّ تخليق الأفلاتوكسين (Aflatoxin) بوساطة فطر *A. flavus* عملية أيضية ثانوية معقدة تحدث خلال مرحلة محددة من دورة حياة الفطر، ولا ترتبط بمرحلة النمو الخضري النشط. يبدأ إنتاج السم عادةً بعد اكتمال النمو الأولي ودخول الفطر مرحلة التمايز (Differentiation)، المرتبطة بتكوين الأبواغ وتباطؤ انقسام الخلايا.

أن إنتاج الأفلاتوكسين يبدأ عادةً بعد حوالي 48 ساعة من بدء النمو في ظل ظروف مناسبة، ويستمر لمدة تتراوح بين اليومين الثاني والسادس. وهذه هي الفترة التي ينتقل خلالها الفطر من الأيض الأولي وهو إنتاج الكتلة الحيوية (Biomass production) إلى الأيض الثانوي وهو إنتاج المركبات السامة (Production of toxic compound). ويؤكد هذا أن إنتاج السم ليس عشوائياً، بل مرتبط بمرحلة نمو محددة (Tian et al., 2021).

يتم تنظيم هذا التخليق بواسطة مجموعة جينات الأفلاتوكسين التي تضم أكثر من 25 جيناً تعمل بتنسيق مع بعضها البعض. يُعدّ جين *aflR* المنظم الرئيسي (Regulatory gene)، إذ يعمل كعامل نسخ يُنشّط الجينات الأولية مثل *aflD* و *aflM* و *aflP*، المسؤولة عن تحويل المركبات الوسيطة إلى أفلاتوكسين B1. ويتزامن ازدياد التعبير عن هذا الجين مع بدء تراكم السم (Caceres et al., 2020).

كما يؤدي جين *aflS* دوراً مكماً لجين *aflR*، مُعززاً كفاءة تنشيط المسار الأيضي. ويُعدّ التوازن بين التعبير عن هذين الجينين حاسماً في تحديد مستوى إنتاج الأفلاتوكسين. يكون إنتاج السم منخفضاً في المراحل المبكرة نظراً لضعف التعبير عن جين *aflS*، ثم يزداد مع النمو (Abbas et al., 2024).

تتحكم مجموعة من الجينات التنظيمية العامة، مثل *veA* و *laeA* و *velB* (المعروفة باسم مُرَكَّب Velvet)، في توقيت التخليق الحيوي من خلال الاستجابة للمؤثرات البيئية كالضوء ودرجة الحرارة. وأن تعطيل هذه الجينات يؤدي إلى انخفاض ملحوظ في إنتاج الأفلاتوكسين، مما يؤكد دورها في تنسيق نمو الفطريات وعمليات الأيض الثانوية (Hou et al., 2024).

تلعب العوامل البيئية دوراً حاسماً في تحديد توقيت وشدة التخليق الحيوي، حيث تُعد درجة الحرارة (28- 30 درجة مئوية) من بين الظروف الأكثر ملاءمة لإنتاج الأفلاتوكسين. كما يُعد الإجهاد التأكسدي (Oxidative stress) عاملاً محفزاً هاماً، إذ يؤدي ارتفاع مستويات أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) في المراحل المتأخرة من النمو إلى تنشيط مسارات التخليق الحيوي. ويُعتقد أن إنتاج الأفلاتوكسين آلية تكيفية للفطر لمواجهة هذا الإجهاد (Tian *et al.*, 2021).

2-6: الأهمية الصحية للأفلاتوكسينات

تُعد الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) من أخطر السموم الفطرية التي تؤثر بشكل مباشر على صحة الإنسان والحيوان نظراً لخصائصها السامة المتعددة، بما في ذلك تأثيراتها المسرطنة والمطفرة والمشوهة للأجنة، فضلاً عن قدرتها على تثبيط جهاز المناعة. وتنتمي هذه المركبات إلى مجموعة ثنائي فورانوكومارين (Difurocoumarin) ، وتُنتجها بشكل أساسي فطريات *A. A. flavus* و *parasiticus*. وينتج الأولى بشكل رئيسي الأفلاتوكسينات B1 و B2، بينما ينتج الثانية أيضاً النوعين G1 و G2 (Yemisi *et al.*, 2023).

تُعد هذه السموم من الملوثات الشائعة في الأغذية والأعلاف، وتتميز بثباتها الحراري، مما يجعل التخلص منها صعباً أثناء الطهي أو معالجة الأغذية. ونتيجة لذلك، تبقى هذه السموم في السلسلة الغذائية وتصل إلى الإنسان والحيوان. ويُعد الكبد العضو الأكثر استهدافاً من قبل الأفلاتوكسينات، حيث تُستقلب إلى مركبات تفاعلية شديدة السمية، أبرزها (AFB1-exo-8,9-epoxide)، الذي يرتبط مباشرة بالحمض النووي ويسبب طفرات جينية خطيرة. لا سيما في البلدان النامية ذات ضوابط سلامة الغذاء الضعيفة (Dhakai *et al.*, 2020).

تشمل التغيرات النسيجية الناتجة عن التعرض الحاد للأفلاتوكسين التنكس الدهني لخلايا الكبد (Hepatic fatty degeneration)، والنخر النزفي الحاد (Acute hemorrhagic necrosis)، وتكاثر القنوات الصفراوية (bile duct proliferation)، بينما يؤدي التعرض المزمن إلى تليف الكبد وتشوهه، مما يُفضي في النهاية إلى الإصابة بسرطان الخلايا الكبدية الخبيث (Williams *et al.*, 2004).

تختلف شدة سمية الأفلاتوكسين تبعاً لعدة عوامل، منها الجرعة، ومدة التعرض، والحالة التغذوية، ووظيفة الجهاز المناعي. في حالات التعرض الحاد لجرعات عالية (Acute high-dose exposure to mycotoxins)، تظهر أعراض مثل الغثيان والقيء وآلام البطن بسرعة، وقد تتطور إلى فشل كبدي حاد، والذي قد يكون مميتاً، خاصةً عند الأطفال. كما تم الإبلاغ عن حالات انحلال الربيدات (Rhabdomyolysis)، نتيجة التسمم الشديد. أما في حالات التعرض المزمن (Chronic

وسرطان الخلايا الكبدية، ومشاكل صحية أخرى طويلة الأمد (Dhakal et al., 2020). (exposure to mycotoxins)، وهو الأكثر شيوعاً، فتكون الآثار تدرجية وتشمل تلف الكبد،

أما في الحيوانات، فتُسبب الأفلاتوكسينات خسائر فادحة في الإنتاج الحيواني، إذ تؤثر على النمو، وتُقلل من كفاءة تحويل العلف، وتُضعف المناعة، مما يزيد من معدلات الإصابة بالأمراض. كما يُمكن أن تتراكم هذه السموم أو نواتجها الأيضية في أنسجة الحيوانات أو منتجاتها كالحليب (AFM1)، مما يُشكل خطراً إضافياً على صحة الإنسان عند استهلاك هذه المنتجات. ويُعدّ انتقال السموم عبر السلسلة الغذائية أحد أهم التحديات في مجال سلامة الغذاء.

يؤدي تلوث المحاصيل بالأفلاتوكسين إلى خسائر فادحة، سواء بشكل مباشر من خلال تلف المنتجات أو رفضها في السوق، أو بشكل غير مباشر من خلال تكاليف الرعاية الصحية ومراقبة جودة الغذاء. وقد وضعت هيئات دولية، مثل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (U.S. Food and Drug Administration) والاتحاد الأوروبي (European Union (EU)، حدوداً صارمة لمستويات الأفلاتوكسين في الغذاء، تتراوح بين 2 و 20 ppb، للحد من المخاطر الصحية المرتبطة به. ومع ذلك، فإن الالتزام بهذه المعايير يُشكل عبئاً اقتصادياً على الدول المنتجة، لا سيما في المناطق ذات المستويات العالية من التلوث (Liu and Wu 2010 ; Reddy et al., 2010).

2-7: التلوث الغذائي بالسموم الفطرية في الفواكه والمنتجات الزراعية:

تُعد الفواكه الطازجة والمجففة من البيئات المناسبة لنمو الفطريات المنتجة للسموم، خصوصاً عند تعرضها للرطوبة أو التلف الميكانيكي أو سوء التخزين. وتبرز هذه المشكلة بشكل خاص في الفواكه ذات المحتوى السكري المرتفع، مثل التين، الزبيب، التمر، والتفاح، حيث تسهم هذه الظروف في تشجيع نمو أنواع *Aspergillus* و *Penicillium* (Miliordos et al., 2025).

تُعد الفواكه المجففة أكثر عرضة للتلوث نتيجة طول فترة التخزين والتركيز المرتفع للمواد الصلبة الذائبة، مما يوفر بيئة ملائمة لبعض الفطريات المقاومة للجفاف. وقد سُجلت مستويات متفاوتة من الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين A في عينات من الزبيب والتين المجفف والمشمش، خاصة في الأسواق المفتوحة أو المنتجات غير الخاضعة للرقابة الصارمة (Miliordos et al., 2025).

8-2: الفطريات المرتبطة بالفواكه

8-2-1: الفطريات في الفواكه الطازجة

تُعدّ الفاكهة الطازجة مصدراً هاماً للعناصر الغذائية، كالفيتامينات والمعادن والألياف. إلا أن محتواها العالي من السكر والرطوبة يجعلها بيئة ملائمة لنمو الكائنات الدقيقة، ولا سيما الفطريات. وهذا يزيد من احتمالية التلوث بالفطريات المصاحبة، والتي قد تكون غير ضارة في بعض الحالات، ولكنها قد تشمل أنواعاً قادرة على إنتاج سموم فطرية تُشكّل خطراً على صحة الإنسان (Alghamdi et al., 2023).

تُعدّ أجناس الفطريات مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Fusarium* و *Alternaria*، من أكثر الفطريات شيوعاً في الفاكهة. وتظهر هذه الفطريات في مراحل مختلفة من سلسلة الإنتاج، بدءاً من الحقل مروراً بالحصاد والنقل وصولاً إلى التخزين والتجفيف. حيث تُشجع ظروف التجفيف والتخزين غير المناسبة على نموها (Gouda et al., 2024).

ترتبط بعض الفطريات بإنتاج سموم فطرية معروفة، مثل الأفلاتوكسينات التي تنتجها أنواع معينة من فطر الرشاشيات، والأوكراتوكسين أ الذي تنتجه أنواع عديدة من الفطريات، والباتولين الذي غالباً ما يرتبط بتعفن الفاكهة الطازجة كالتفاح. تُصنّف هذه السموم ضمن أخطر ملوثات الغذاء نظراً لقدرتها على التسبب بآثار صحية مزمنة، بما في ذلك تسمم الكبد والسرطان، حتى عند مستويات منخفضة نسبياً (Nan et al., 2022).

من الجدير بالذكر، أن وجود الفطريات على الفاكهة لا يعني بالضرورة وجود سموم فطرية. إذ يعتمد إنتاج هذه السموم على مجموعة من العوامل البيئية، كدرجة الحرارة والرطوبة، فضلاً عن نوع سلالة الفطريات وظروف التخزين. علاوة على ذلك، قد تبقى بعض السموم في أنسجة الفاكهة حتى بعد إزالة الجزء المتعفن، مما يجعل التخلص منها بالطرق التقليدية أكثر صعوبة. ويؤدي التلوث إلى انخفاض جودة المنتج وزيادة المخاطر الصحية المرتبطة باستهلاكه (Zulfiqar et al., 2015).

أن من أهم الوسائل للحد من التلوث الفطري للفواكه الطازجة، ممارسات التعامل السليم مع الفاكهة، كالفرز الدقيق والغسل والتخزين في ظروف مناسبة، كما يُعدّ الرصد المستمر للفطريات والسموم الفطرية ضرورياً لضمان سلامة الغذاء وتقليل المخاطر المرتبطة به (Farian, 2020).

8-2-2: الفطريات في الفواكه المجففة

تُعدّ الفواكه المجففة أغذية غنية بالعناصر الغذائية، إذ تحتوي على تركيزات عالية من السكريات والفيتامينات والمعادن، مما يجعلها خياراً غذائياً شائعاً في جميع أنحاء العالم. مع ذلك، تُهيئ هذه

الخصائص بيئة ملائمة لنمو الفطريات، خاصةً إذا لم تُضبط ظروف التجفيف والتخزين جيداً، مما يزيد من احتمالية التلوث بالفطريات المنتجة للسموم (Alghamdi et al., 2023).

تكون الفواكه المجففة عرضةً للتلوث الفطري في مراحل متعددة، تشمل الحصاد والتجفيف والنقل والتخزين. تُعدّ أجناس *Aspergillus sp* و *Penicillium sp* و *Fusarium sp* و *Alternaria sp* من أكثر الفطريات شيوعاً في هذه المنتجات، إذ يمكنها النمو حتى في ظروف انخفاض النشاط المائي نسبياً، وهي سمة من سمات الفطريات المحبة للجفاف. وهذا يزيد من خطر إنتاج السموم الفطرية، لا سيما في البيئات الحارة والرطبة (Sanchis and Magan, 2004).

تُعدّ Aflatoxins و Ochratoxin A من أهم السموم الفطرية المرتبطة بالفواكه المجففة، وقد وُثّق وجودها في منتجات مثل التين والزبيب والمشمش (González et al., 2023).

يتأثر التلوث الفطري ومستويات السموم الفطرية بعدة عوامل، منها الظروف المناخية والموقع الجغرافي والممارسات الزراعية وطرق التجفيف والتخزين. ويمكن أن يزيد التجفيف التقليدي في الهواء الطلق من خطر التلوث نتيجة التعرض للغبار والحشرات والكائنات الدقيقة، خاصةً عند إطالة مدة التجفيف أو عدم اتباع ممارسات النظافة السليمة (Flaishman et al., 2008).

أن التقديرات تشير إلى أن نسبة كبيرة من المنتجات الزراعية حول العالم قد تكون ملوثة بدرجات متفاوتة من السموم الفطرية، مما يؤثر سلباً على سلامة الغذاء والاقتصاد الزراعي. كما يمكن أن تؤدي العدوى الفطرية أثناء التخزين والنقل إلى خسائر فادحة في الفواكه المجففة نتيجة التلف وانخفاض الجودة (Eskola et al., 2020).

أن من أهم التدابير والممارسات الوقائية لتقليل من التلوث الفطري للفواكه المجففة منها، الفرز والغسل والتجفيف السريع والتخزين في ظروف مناسبة. كما أن المراقبة المستمرة للفطريات والسموم الفطرية ضرورية لضمان سلامة الفواكه المجففة وتقليل المخاطر الصحية المرتبطة بها (Sullivan et al., 2021).

9-2: طرق الكشف والتشخيص

9-2-1: طرق الكشف عن السموم الفطرية

يُعدّ الكشف الدقيق والسريع عن السموم الفطرية (Mycotoxins) أمراً بالغ الأهمية لضمان سلامة الغذاء وحماية صحة الإنسان والحيوان، نظراً لسميتها العالية وتأثيراتها المسرطنة. وقد شهدت تقنيات الكشف تطوراً ملحوظاً في العقود الأخيرة، لتشمل طيفاً واسعاً من الطرق التي تتفاوت في حساسيتها ودقتها وسرعتها وتكلفتها. وبشكل عام، يمكن تصنيف هذه الطرق إلى أربع فئات رئيسية: الطرق

البيولوجية، والكيميائية، والمناعية، والجزئية، حيث تُستخدم كل منها وفقاً لطبيعة العينة والغرض من التحليل (Awuchi et al., 2021).

2-1-1-9-2 الطرق البيولوجية Biological methods

تعتمد الطرق البيولوجية على استخدام الكائنات الحية أو الأنظمة البيولوجية لتقييم وجود السموم الفطرية وتأثيراتها. وتشمل هذه الطرق الاختبارات الزراعية والمورفولوجية للفطريات وتعتمد على ملاحظة الخصائص المورفولوجية والمجهريّة للفطريات، مثل شكل المستعمرة ولونها ومعدل نموها، لتحديد الأنواع المنتجة للسموم، مثل فطر *A. flavus*. على الرغم من بساطة هذه الطرق وانخفاض تكلفتها، إلا أنها تفتقر إلى الدقة الكافية في التمييز بين السلالات المنتجة للسموم وغير المنتجة لها (Bennett et al., 2007).

من الطرق البيولوجية السريعة الأخرى، التي تستخدم للكشف عن السلالات المنتجة للأفلاتوكسين من خلال ملاحظة تحول لون المستعمرة إلى الأحمر عند تعرضها لبخار الأمونيا، نتيجة لتفاعل المركبات الوسيطة في مسار إنتاج السم. كما يُستخدم التألق فوق البنفسجي (Ultraviolet UV fluorescence) للكشف عن الأفلاتوكسينات، حيث تُظهر السلالات المنتجة لسم حلقات فلورية مميزة عند تعرضها لضوء بطول موجي 365 نانومتر. ورغم فائدة هذه الطرق كاختبارات أولية، إلا أنها أقل حساسية من التقنيات الحديثة (Klich, 2007).

2-1-1-9-2 الطرق التحليلية/الكيميائية Analytical /Chemical methods

تُعد الطرق الكيميائية من بين أكثر التقنيات دقة وموثوقية للكشف الكمي (Quantitative) والنوعي (Qualitative) عن السموم الفطرية. وتعتمد هذه الطرق على فصل المركبات وتحليلها باستخدام تقنيات كروماتوغرافية متقدمة (Advanced chromatographic techniques) ومن أبرز الطرق هي:

2-1-2-1-9-2 كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)، والتي تُستخدم على نطاق واسع لتحديد تركيزات السموم بدقة عالية.

2-2-1-9-2- الكشف الفلوري (FLD) Fluorescence Detector

3-2-1-9-2- مطياف الكتلة Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

(LC-MS/MS)، مما يزيد من حساسية هذه الطرق قدرتها على الكشف عن التركيزات المنخفضة جداً (Beyene *et al.*, 2019).

تُستخدم كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin-Layer Chromatography (TLC)، أيضاً كطريقة بسيطة وفعالة للكشف الأولي عن الأفلاتوكسينات، والتي يتم تمييزها بناءً على تألقها تحت الأشعة فوق البنفسجية. بالإضافة إلى ذلك، تُستخدم كروماتوغرافيا الغاز (GC) Gas Chromatography في بعض الحالات، على الرغم من أن استخدامها محدود مقارنةً بـ HPLC (Kotinagu *et al.*, 2015).

3-1-9-2- الطرق المناعية Immunological methods

تعتمد الطرق المناعية على التفاعل النوعي بين المستضد (السم الفطري) والأجسام المضادة. تُعدّ هذه التقنيات سريعة وعملية للكشف عن السموم الفطرية، لا سيما في الاختبارات الميدانية. ويُعتبر اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay من أكثر الطرق استخداماً، إذ يتميز بحساسيته العالية وقدرته على تحليل عدد كبير من العينات في وقت قصير (Khan *et al.*, 2024).

كما طُوّرت اختبارات التدفق الجانبي (LFAs) Lateral flow assays، التي تُوفّر نتائج فورية تقريباً دون الحاجة إلى معدات معقدة، مما يجعلها مناسبة للاستخدام الميداني. بالإضافة إلى ذلك، ظهرت أجهزة الاستشعار الحيوية، التي تجمع بين الحساسية العالية والسرعة من خلال تحويل التفاعل البيولوجي إلى إشارة قابلة للقياس. مع ذلك، قد تتأثر دقة هذه الطرق بالتفاعلات المتبادلة أو العوامل البيئية (Marc, 2022).

4-1-9-2- الطرق الجزيئية Molecular methods

تُعدّ الطرق الجزيئية من بين أحدث التقنيات للكشف عن الفطريات المُنتجة للسموم. وتعتمد هذه الطرق على تحليل المادة الوراثية (DNA) للكائنات الدقيقة. يُعدّ تفاعل البوليميراز المتسلسل (Polymerase Chain Reaction (PCR)، من أهم هذه التقنيات، إذ يُستخدم لتضخيم جينات محددة مرتبطة بإنتاج السموم، مثل الأفلاتوكسين، وnor1، وver1. وهذا يُتيح الكشف المبكر عن السلالات القادرة على إنتاج الأفلاتوكسين (Shaltout *et al.*, 2022).

تتميز هذه الطريقة بحساسيتها العالية وسرعتها، إذ يمكنها الكشف عن كميات ضئيلة جداً من الحمض النووي. كما تُستخدم للتمييز بين السلالات المنتجة وغير المنتجة لسموم فطرية. مع ذلك، فإن وجود الجينات المرتبطة بإنتاج السموم لا يعني بالضرورة حدوث إنتاج فعلي، إذ قد تتأثر هذه العملية بعوامل تنظيمية أو طفرات جينية. لذا، غالباً ما تُدمج الطرق الجزيئية مع الطرق الكيميائية للحصول على نتائج أكثر دقة وموثوقية (Kensler *et al.*, 2011).

حيث أنه، لا توجد طريقة مثالية واحدة للكشف عن السموم الفطرية. ويعتمد اختيار الطريقة على طبيعة العينة والغرض من التحليل. تُستخدم الطرق البيولوجية للفحص الأولي السريع، بينما توفر الطرق الكيميائية دقة عالية في القياس الكمي. تُعد الطرق المناعية مناسبة للفحص السريع واسع النطاق، في حين توفر الطرق الجزيئية إمكانية الكشف المبكر عن السلالات المنتجة للسموم. لذلك، يُعد دمج هذه التقنيات النهج الأكثر فعالية لضمان سلامة الغذاء وتقليل المخاطر الصحية المرتبطة بالسموم الفطرية (Kumar *et al.*, 2017).

2-9-2: التشخيص الجزيئي للفطريات

شهد تشخيص الفطريات تقدماً ملحوظاً مع ظهور التقنيات الجزيئية Molecular techniques، مما أتاح التعرف الدقيق والسريع على أنواع الفطريات، لا سيما تلك المرتبطة بإنتاج السموم أو مسببات الأمراض. وعلى عكس الطرق التقليدية التي تعتمد على الزراعة والفحص المجهرى. توفر الطرق الجزيئية إمكانية الكشف المباشر عن المادة الوراثية للفطريات في العينات البيئية أو السريرية، حتى في الحالات التي يصعب فيها عزل الكائنات الحية أو يكون نموها بطيئاً. ومن أبرز هذه التقنيات تحليل المنطقة المنسوخة الداخلية (ITS) The Internal Transcribed Spacer (ITS) وتضخيم جينات محددة. وتُعد هذه المناطق مؤشرات جزيئية موثوقة للتمييز الدقيق بين أنواع الفطريات. ومع ذلك، لا يزال تحديد أهداف جينية ثابتة للتمييز بين السلالات المنتجة للسموم وغير المنتجة لها تحدياً بحثياً مستمراً (Anidah *et al.*, 2023).

تعتمد معظم تقنيات التشخيص الجزيئي على استهداف الحمض النووي (DNA) أو الحمض النووي الريبوزي (RNA) للفطريات، مما يسمح بالكشف المبكر والحساس عن وجودها. ويُعد تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) أحد أهم هذه التقنيات. تُستخدم هذه التقنية لتضخيم تسلسلات جينية محددة حتى تصبح قابلة للكشف، حتى لو كانت موجودة بكميات ضئيلة جداً في العينة. تكمن أهمية هذه التقنية في قدرتها على العمل مباشرة، مما يقلل وقت التشخيص ويزيد دقته. وأن الطرق الجزيئية غالباً ما تتفوق على الطرق التقليدية من حيث الحساسية، لا سيما في حالات العدوى الفطرية الغازية

Arrieta-Aguirre *et al.*; Kozel and Wickes, 2014) Invasive fungal infection (IFI) (al., 2023).

يُعتبر تسلسل الحمض النووي، وخاصة منطقة ITS، المعيار الذهبي لتحديد أنواع الفطريات، مما يسمح بمقارنة التسلسلات الجينية مع قواعد البيانات العالمية لتحقيق تحديد دقيق (Brown *et al.*, 2025).

10-2: طرق السيطرة على الفطريات المنتجة للسموم الفطرية

1-10-2: المكافحة الكيميائية

تُعدّ طرق المكافحة الكيميائية من أهم الاستراتيجيات المستخدمة للحدّ من نمو الفطريات المنتجة للسموم الفطرية، لا سيما خلال مراحل ما بعد الحصاد عندما تكون المحاصيل أكثر عرضة للإصابة والتلف. تعتمد هذه الطرق على استخدام مركبات قادرة على تثبيط نمو الفطريات أو تعطيل نشاطها الأيضي، مما يُقلّل من إنتاج السموم الفطرية مثل الأفلاتوكسينات. تكمن أهمية هذه الاستراتيجيات في أن السموم الفطرية تتميز بنباتاتها الكيميائي ومقاومتها العالية للعوامل الفيزيائية كالحرارة والإشعاع، مما يجعل إزالتها بعد تكونها أمراً صعباً دون التأثير على جودة الغذاء (Gong *et al.*, 2024).

قد ازداد الاهتمام باستخدام بدائل كيميائية أكثر أماناً من المبيدات الفطرية التقليدية، ولا سيما أملاح الكالسيوم، التي أثبتت فعاليتها في الحد من نمو الفطريات الممرضة للنباتات. تشمل هذه الأملاح كربونات الكالسيوم (CaCO_3) وكلوريد الكالسيوم (CaCl_2)، والتي أظهرت قدرتها على تثبيط نمو الفطريات، والحد من إنبات الأبواغ، بل وحتى، في بعض الحالات، تقليل إنتاج السموم الفطرية. يُعزى هذا التأثير إلى خصائصها الفيزيائية والكيميائية، التي تؤثر بشكل مباشر أو غير مباشر على البيئة الملائمة لنمو الفطريات (Kassem *et al.*, 2023).

يُفسر تأثير كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على الفطريات من خلال عدة مسارات متداخلة. فمن جهة، تلعب أيونات الكالسيوم (Ca^{2+}) دوراً هاماً في التأثير على العمليات الحيوية داخل الخلايا الفطرية. إذ يمكنها أن تتداخل مع نشاط الأنزيمات المسؤولة عن تحطيم جدار الخلية أو إفراز الأنزيمات المحللة، مما يُضعف قدرة الفطر على غزو أنسجة النبات. ومن جهة أخرى، يُغيّر استخدام هذه الأملاح الظروف البيئية الدقيقة المحيطة بالفطريات، كرفع درجة الحموضة (pH) أو تعديل القوة الأيونية، مما يُهيئ بيئة غير ملائمة لنمو الفطريات أو إنبات جراثيمها (Campanella *et al.*, 2002).

أن معالجة النباتات بكاربونات الكالسيوم قد تُعزز مقاومتها من خلال تقوية جدران الخلايا وزيادة سلامتها، وبالتالي تقليل نفاذيتها للفطريات. يُعد هذا التأثير غير المباشر عاملاً هاماً في الحد من العدوى الفطرية، لا سيما في الفواكه والخضراوات المخزنة، إذ يُساهم في إطالة مدة صلاحيتها وتقليل الضرر بعد الحصاد (Kassem *et al.*, 2023).

تتميز كاربونات الكالسيوم بانخفاض سميتها نسبياً وسلامتها البيئية، مما يجعلها مناسبة للاستخدام في النظم الزراعية المستدامة، بما في ذلك الزراعة العضوية. كما أنها لا تُخلّف أي بقايا ضارة في المنتجات الغذائية، على عكس العديد من المبيدات الكيميائية التقليدية التي قد تُثير مخاوف صحية وبيئية. لذلك، تُعتبر هذه المادة خياراً واعداً لتحقيق التوازن بين فعالية مكافحة وسلامة الغذاء (Cai *et al.*, 2025).

إن فعالية كاربونات الكالسيوم لا تزال تعتمد على عدة عوامل، مثل تركيز المادة، ونوع الفطر المستهدف، وظروف التخزين، وطبيعة المحصول. ولذلك، غالباً ما يكون استخدامها أكثر فعالية عند دمجها مع استراتيجيات أخرى، مثل التحكم في الرطوبة ودرجة الحرارة أو استخدام العوامل البيولوجية، ضمن ما يُعرف بالإدارة المتكاملة للفطريات.

وتعتمد الطرق التقليدية على استخدام ممارسات زراعية وتخزينية سليمة، مثل تقليل الضرر الميكانيكي للثمار، التجفيف السريع، والحفاظ على النشاط المائي المنخفض أثناء التخزين. وقد أثبتت هذه الإجراءات فعاليتها في الحد من نمو الفطريات وتقليل احتمالية إنتاج السموم (Mannaa and Kim, 2017).

2-10-2: المكافحة الحيوية

تُعد المكافحة الحيوية من أكثر الأساليب الواعدة في السيطرة على الفطريات السامة، حيث تعتمد على استخدام كائنات دقيقة أو نواتجها الأيضية لتثبيط نمو الفطريات أو تقليل قدرتها على إنتاج السموم. ويمتاز هذا الأسلوب بانخفاض آثاره الجانبية، وقابلية تطبيقه في النظم الزراعية والغذائية المستدامة.

وتتنوع آليات المكافحة الحيوية بين التنافس على الغذاء والمساحة، إفراز مركبات مضادة للفطريات، تحفيز دفاعات النبات، أو حتى تفكيك السموم الفطرية مباشرةً. وقد أظهرت عدة أنواع من الخمائر والفطريات غير السامة فعالية واضحة في هذا المجال. ومن التطبيقات الناجحة استخدام عزلات غير منتجة للأفلاتوكسين من *A. flavus* لإزاحة السلالات السامة من البيئة الزراعية، وهي تقنية معتمدة في بعض الدول ضمن برامج السيطرة الميدانية (Biological control program) (Ortega-Beltran *et al.*, 2023).

P. ostreatus 1-2-10-2: فطر

تُعدّ الأساليب البيولوجية من الاتجاهات الجديدة الواعدة في مكافحة الفطريات المنتجة للسموم. وتعتمد هذه الأساليب على استخدام الكائنات الحية أو نواتجها الأيضية للحد من نمو الفطريات أو تثبيط إنتاج السموم. وقد برزت هذه الاستراتيجيات نتيجةً للتحديات المرتبطة بالأساليب التقليدية، مثل محدودية فعالية المقاومة الجينية في النباتات وصعوبة التخلص من السموم الفطرية بعد تكونها. ويُعدّ تلوث المحاصيل بالسموم الفطرية (Mycotoxins)، ظاهرةً معقدة تتأثر بتفاعل عوامل متعددة، بما في ذلك الفطر والعائل والظروف البيئية كالجفاف وارتفاع درجات الحرارة، والتي تُحفّز إنتاج الأفلاتوكسين في المحاصيل (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2015).

قد حظي الفطر المحاري (*P. ostreatus*) باهتمام متزايد كعامل بيولوجي فعال لمكافحة الفطريات المنتجة للسموم الفطرية. وينتمي هذا الفطر إلى شعبة الفطريات البازيدية (Basidiomycota)، ويتميز بقدرته العالية على تحليل المواد العضوية المعقدة، ولا سيما المركبات (Lignocellulosic Compounds)، من خلال إفراز مجموعة من الأنزيمات مثل (Laccase) و (Peroxidase). وهذه الأنزيمات غير متخصصة، مما يُمكنها من تحليل طيف واسع من المركبات العضوية، بما في ذلك السموم الفطرية. وهذا يُوفر الأساس العلمي لاستخدام هذا الفطر في تقنيات المعاملة الحيوية، والمعروفة أيضاً باسم المعاملة الفطرية ويتصف أيضاً، بقدرته على تحليل المواد العضوية (Rai and Varma, 2010).

Kingdom : Mycetae

Divission : Eumycota

Class : Basidiomycetes

Order : Agaricales

family : pleurotaceae

Genus : *Pleurotus*

(El-Ramady *et al.*, 2022)

أن فطر *P. ostreatus* يمتلك خصائص مضادة للفطريات. فهو قادر على تثبيط نمو بعض الفطريات الممرضة، مثل فطر *A. flavus*، المسؤول عن إنتاج الأفلاتوكسينات. حيث أن زراعة الفطر المحاري في بيئات زراعية مشتركة مع هذه الفطريات تُقلل من نموها وانتشارها. يُعزى ذلك إلى التنافس على العناصر الغذائية، بالإضافة إلى إفراز مركبات مضادة للفطريات تثبط نمو الفطريات الممرضة (Ginterová *et al.*, 1980).

كذلك تحوّل التركيز من التثبيط المباشر إلى قدرة الفطر المحاري على تحليل السموم الفطرية نفسها، ولا سيما الأفلاتوكسين B1. وأن هذا الفطر له القدرة على تحليل كميات كبيرة من هذا السم عند زراعتها على مواد ملوثة أو المخلفات الزراعية، حيث تصل كفاءة الإزالة إلى أكثر من 80% في بعض الحالات. ويُعتقد أن هذه القدرة تعود إلى النشاط الأنزيمي العالي للفطريات، والذي يُساهم في تحويل السموم إلى مركبات أقل سمية أو غير سامة (Jackson et al., 2017; Araújo et al., 2025).

يُعد استخدام الفطر المحاري (*P. ostreatus*) آمناً نسبياً للبيئة والإنسان مقارنةً بالمبيدات الكيميائية، ولا يترك أي مخلفات سامة في المنتجات الغذائية. وهذا ما يجعله خياراً مناسباً في أنظمة الزراعة المستدامة والعضوية، حيث تُفضل الطرق الطبيعية للحد من التلوث الفطري. مع ذلك، قد تتأثر فعالية هذا الفطر بعوامل مثل نوع الركيزة، وظروف النمو، وتركيز السموم، مما يستدعي إجراء المزيد من البحوث لتحديد ظروف التطبيق المثلى (van Dam et al. 2024).

2-11: استراتيجيات الوقاية والسيطرة العامة

يُعدّ التحكم في الفطريات المنتجة للسموم الفطرية والحدّ من تلوث الأغذية بها من أهم التحديات في مجال سلامة الغذاء، نظراً لآثارها الصحية الخطيرة وانتشارها الواسع في سلسلة الغذاء. وتعتمد الاستراتيجيات على مزيج من التدابير الوقائية والعلاجية، التي تهدف إما إلى منع نمو الفطريات وإنتاج السموم، أو إلى خفض مستويات التلوث بعد حدوثه. وتشمل هذه التدابير طرقاً فيزيائية وكيميائية وبيولوجية، إلا أن فعاليتها تختلف باختلاف نوع الغذاء ونوع السم الفطري وظروف التصنيع (Zhang et al., 2019).

تُمثّل التدابير الوقائية خط الدفاع الأول والأكثر فعالية ضد السموم الفطرية، حيث تُركّز على منع تلوث المحاصيل من الحقل إلى المخزن. وتشمل هذه التدابير تحسين الممارسات الزراعية، مثل اختيار الأصناف المقاومة، والتحكم في الري، والحدّ من الضغوط البيئية كالجفاف، وتطبيق ظروف تخزين مناسبة من حيث الرطوبة ودرجة الحرارة. وأن الحد من نمو الفطريات في مراحلها المبكرة يُساهم بشكل كبير في تقليل تكوّن السموم، مما يجعل الوقاية أكثر فعالية وأقل تكلفة من المعاملة اللاحقة (Yang et al., 2014).

تُستخدم طرق إزالة السموم أو تقليلها، مثل المعاملة الحرارية أو الإشعاع أو استخدام المواد الكيميائية، في حالات التلوث. مع ذلك، تتميز العديد من السموم الفطرية، كالأفلاتوكسينات، بثباتها العالي، مما يجعلها مقاومة لطرق المعاملة التقليدية، وخاصة المعاملة الحرارية. وقد تؤثر بعض هذه الطرق سلباً

على الخصائص الحسية والقيمة الغذائية للأغذية، كالطعم والملمس، مما يحد من استخدامها على نطاق واسع (Peng et al., 2018).

قد برزت الحاجة إلى تطوير تقنيات بديلة أكثر أماناً، ولا سيما الطرق غير الحرارية، كالمعاملة الأنزيمية أو الميكروبية، والمعروفة بالمعاملة الحيوية. تتميز هذه الطرق بقدرتها على تقليل السموم دون التأثير بشكل كبير على جودة الغذاء، كما أنها أكثر توافقاً مع متطلبات السلامة البيئية (Zhang et al., 2019).

يمكن تصنيف استراتيجيات مكافحة السموم الفطرية إلى منهجين رئيسيين: يهدف الأول إلى منع نمو الفطريات وإنتاج السموم منذ البداية، بينما يركز الثاني على تقليل السموم أو إزالتها من المنتجات الملوثة. ويُعدّ دمج هذين المنهجين ضمن إطار إدارة متكامل الطريقة الأكثر فعالية لضمان سلامة الغذاء والحد من المخاطر الصحية والاقتصادية المرتبطة بالسموم الفطرية (Yang et al., 2014).

تُعد السيطرة على الفطريات المنتجة للسموم الفطرية تحدياً معقداً نظراً لقدرتها على البقاء في ظروف بيئية متنوعة، إضافة إلى أن بعض الإجراءات التقليدية قد تمنع نمو الفطر دون أن تُزيل السموم المتكونة مسبقاً. لذلك اتجهت الأبحاث الحديثة إلى اعتماد استراتيجيات متكاملة تشمل الوقاية قبل الحصاد، الإدارة السليمة بعد الحصاد، والمعاملات الحيوية والكيميائية الآمنة (Medina et al., 2014).

2-12: تثبيط نمو الفطريات

يُعدّ التحكم في نمو الفطريات المنتجة للسموم الفطرية الخطوة الأهم في منع التلوث بها، إذ يعتمد تكوينها بشكل أساسي على النشاط الأيضي للفطر نفسه. مع ذلك، لا يعني وجود الفطريات في الغذاء بالضرورة إنتاج السموم، حيث يمكن تثبيط التخليق الحيوي لهذه المركبات من خلال التحكم في الظروف البيئية أو التدخل بوسائل مختلفة. لذلك، تركز الاستراتيجيات الحديثة على الحد من نمو الفطريات أو تعطيل مسارات إنتاج السموم بدلاً من محاولة القضاء عليها بعد تكونها، وهو نهج أكثر عملية (Fernandes et al., 2022).

تُعدّ العوامل الفيزيائية، مثل التحكم في الرطوبة ودرجة الحرارة، من أبسط وأهم الطرق لتثبيط نمو الفطريات. تحتاج الفطريات إلى مستويات محددة من الماء ودرجات حرارة مناسبة للنمو وإنتاج السموم. وأن خفض الرطوبة النسبية في بيئة التخزين يقلل بشكل كبير من نشاط الفطريات، حتى مع الحفاظ على درجات حرارة مناسبة. على سبيل المثال، تحفز مستويات الرطوبة العالية نمو الفطريات،

مثل فطر *A. flavus*، وتزيد من إنتاج الأفلاتوكسين، بينما يُعد التحكم في الرطوبة أكثر فعالية في الحد من هذه العملية من التحكم في درجة الحرارة وحدها (Taniwaki *et al.*, 2009).

تُعد تقنيات الحفظ في جو معتدل وسيلة فعالة للحد من نمو الفطريات. تتضمن هذه التقنيات خفض مستويات الأكسجين وزيادة مستويات ثاني أكسيد الكربون داخل عبوات الطعام، مما يثبط النشاط الميكروبي. تُعد هذه التقنية، وخاصةً في شكل التغليف المعدل (Modified Atmosphere - MAP)، طريقة عملية وآمنة تُستخدم على نطاق واسع في صناعة الأغذية لأنها تُطيل فترة صلاحية المنتج دون التأثير بشكل كبير على جودته (Calado *et al.*, 2014).

يُستخدم الإشعاع أيضاً كطريقة فيزيائية لتعطيل الكائنات الدقيقة عن طريق إتلاف حمضها النووي أو جدران خلاياها. تشمل هذه الطرق أشعة جاما (Gamma rays) والأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet UV radiation) وحزم الإلكترونات (Electron beams)، والتي أثبتت فعاليتها في الحد من نمو الفطريات وبعض السموم المرتبطة بها. مع ذلك، قد يكون استخدامها محدوداً نظراً لتأثيرها المحتمل على القيمة الغذائية أو الخصائص الحسية للأغذية، مما دفع إلى تطوير بدائل أكثر أماناً، مثل تقنيات حزمة الإلكترون (E-beam) Electron Beam Technologies (Qiu *et al.*, 2021).

أما فيما يتعلق بالطرق الكيميائية، فتُستخدم مجموعة من المركبات المضادة للفطريات، كالأحماض العضوية وأملاحها، لتثبيط نمو الفطريات وإنتاج السموم. تتميز هذه المركبات بسهولة استخدامها وانخفاض تكلفتها، إلا أن المخاوف بشأن مخلفاتها وآثارها الصحية المحتملة دفعت إلى البحث عن بدائل أكثر أماناً. ومن الاتجاهات الحديثة استخدام المواد النانوية أو الببتيدات المضادة للميكروبات، والتي أظهرت فعالية جيدة في تثبيط الفطريات، مع إمكانية استخدام جرعات أقل (Li *et al.*, 2021).

وقد حظيت الطرق الحيوية باهتمام متزايد نظراً لكونها صديقة للبيئة وأمنة نسبياً. وتشمل هذه الطرق استخدام مستخلصات نباتية غنية بالمركبات الفينولية والزيوت العطرية، التي تمتلك خصائص مضادة للفطريات. أثبتت زيوت مثل زيت الأوريغانو والقرفة والزعرير فعاليتها في تثبيط نمو الفطريات وتقليل إنتاج السموم، وذلك لاحتوائها على مركبات فعالة مثل (Thymol و Cinnamaldehyde) (Prakash *et al.*, 2015).

كما تُستخدم الكائنات الحية الدقيقة المفيدة، مثل بكتيريا حمض اللاكتيك والخمائر، كعوامل مكافحة بيولوجية. فهي تثبط نمو الفطريات من خلال التنافس على الموارد أو إنتاج مركبات مثبطة. وقد أظهرت هذه الكائنات قدرتها على تقليل إنتاج السموم الفطرية مثل الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين، مما يجعلها خياراً واعداً في أنظمة الحفظ البيولوجي للأغذية (Abdelaziz *et al.*, 2022).

2-13: تحليل السموم الفطرية في الأغذية

تمر الأغذية بسلسلة طويلة من المراحل بدءاً من الإنتاج الزراعي وحتى الاستهلاك، مما يزيد من احتمالية تلوثها بالسموم الفطرية في مراحل متعددة. ولأن منع نمو الفطريات أو تثبيط إنتاج السموم ليس فعالاً دائماً، فقد أصبح من الضروري تطوير استراتيجيات تهدف إلى تقليل هذه السموم أو إزالتها من الجزء الصالح للأكل. تُصنف تقنيات إزالة السموم الفطرية عموماً إلى طرق فيزيائية وكيميائية وبيولوجية، ويعتمد اختيار الطريقة على نوع الغذاء وطبيعة السم الفطري (Pleadin *et al.*, 2019).

تُعد المعاملات الفيزيائية من أكثر الطرق شيوعاً، وتشمل الفرز والتنظيف والتجفيف والتجفيف. تُسهم هذه العمليات في تقليل الحمل الفطري وإزالة الأجزاء الأكثر تلوثاً، لا سيما في المحاصيل الزراعية. وقد ثبت أن الجمع بين الفرز والتجفيف يُحسن بشكل كبير من كفاءة تقليل السموم الفطرية. كما تُستخدم المعاملة الحرارية لتقليل مستويات بعض السموم. مع ذلك، تختلف فعالية هذه الطرق باختلاف نوع السم وظروف المعاملة، إذ أن العديد من السموم الفطرية مقاومة للحرارة (Yazdanpanah *et al.*, 2005).

إضافةً إلى ذلك، تُستخدم تقنيات الإشعاع كطريقة فعالة نسبياً. فالإشعاع المؤين، كأشعة غاما أو حزم الإلكترونات، وكذلك الإشعاع غير المؤين، كالأشعة فوق البنفسجية، يُمكن أن يُساهم في تقليل كلٍ من الفطريات والسموم الفطرية. وتعتمد فعالية هذه التقنيات على الجرعة ونوع الغذاء، ويجب مراعاة تأثيرها المحتمل على جودة الغذاء (Rushing and Selim, 2019).

أما الطرق الكيميائية فتتضمن استخدام مواد قادرة على تعديل التركيب الكيميائي للسموم الفطرية، مثل القلويات وعوامل الأكسدة. وأن البيئة القلوية تُساهم أيضاً في تحليل العديد من السموم الفطرية. يُعدّ الأوزون من أهمّ عوامل الأكسدة المستخدمة، إذ يُفكّك الروابط الكيميائية في جزيئات السموم ويُحوّلها إلى مركبات أقلّ سمية، مع أنه قد يُؤثر على الخصائص الحسية أو الكيميائية للأغذية (Santos *et al.*, 2018).

تُعتبر الطرق البيولوجية من أكثر المناهج الواعدة، إذ تعتمد على استخدام الكائنات الدقيقة أو إنزيماتها لتحليل السموم الفطرية إلى منتجات أقلّ سمية أو غير سامة. وتتميز هذه الطرق بملاءمتها للبيئة وجودتها العالية، حيث تستهدف بدقة التركيب الجزيئي للسموم. وقد أظهرت بعض الأنزيمات الميكروبية قدرةً ملحوظةً على تحليل السموم، مثل تحويل بعض المركبات السامة إلى أشكال أقلّ سمية، مما يُعزّز إمكانية استخدامها في تطبيقات غذائية مستقبلية (He *et al.*, 2017).

على الرغم من تنوع هذه الاستراتيجيات، لا توجد طريقة واحدة قادرة على إزالة جميع السموم الفطرية من مختلف الأطعمة بشكل كامل وآمن. لذلك، يوصى باتباع نهج متكامل يجمع بين تقنيات متعددة، مع مراعاة طبيعة الطعام ونوع السموم الفطرية، لتحقيق أفضل كفاءة ممكنة دون التأثير سلباً على جودة المنتج أو سلامته (Ji and Xie, 2020).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3: المواد وطرائق العمل: Material and Methods

1-3 : الاجهزة والمواد: Apparatus and Materials

1-1-3 : الاجهزة والأدوات Apparatus and Tools

أهم الأجهزة والأدوات المستخدمة في هذه الدراسة مدرجة في الجدولين (1-3) و (2-3).

جدول (1-3): الأجهزة المستعملة في الدراسة.

ت	اسم الجهاز (باللغة العربية)	أسم الجهاز (باللغة الإنجليزية)	المنشأ
1	ثلاجة	Refrigerator	Lebanon
2	جهاز	HPLC (Sykam)	Germany
3	جهاز الترحيل الكهربائي	Electrophoresis systems	Korea
4	جهاز المبلر الحراري الحلقي	Thermo cycle apparatus	Germany
5	جهاز تصوير رقمي	Digital camera	Japan
6	جهاز تقطير	Distillateur	Germany
7	حاضنة	Incubater	England
8	حمام مائي	Water bath	Germany
9	فرن كهربائي	Electric Oven	Germany
10	كابينة الزرع المجهرية	Laminar flow cabinat	Netherland
11	المزج الدوار	Vortex mixer	India
12	مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Japan

England	Hot plate with magnetic	مسخن حراري	13
Germany	PH- meter	مقياس الأس الهيدروجيني	14
England	Centrifuge	المنبذة	15
Germany	Autoclave	المؤصدة	16
England	Sensitive balance	ميزان الكتروني حساس	17
Germany	UV- Transilluminator	وحدة الاشعة فوق البنفسجية	18
Germany	AU480 Chemistry analyzer	جهاز اختبارات الكيمياء السريرية	19
Germany	Savories BL 3100 s	ميزان لوزن الحيوانات	20

جدول (2-3): الأدوات المستعملة في الدراسة

المنشأ	الشركة المصنعة	الأدوات		
China	CYAN	(0.5-10,10-100,100-1000) ml	Micropipette	1
Japan	A.N.D.	Anatomy tools	أدوات التشريح	2
India	Jlassco	Beakers	كؤوس	3
Germany	Griffin	Bikhner's funnel	قمع بخنر	4
India	Jlassco	Cylinders	أسطوانات مدرجة	5
India	Superestar	Test tubes	أنابيب اختبار	6

England	Whatman	Filter paper	أوراق ترشيح	7
China	Saibra	Plastic Petri dishes	أطباق بتري بلاستيكية	8
China	Hawach	Milli pore filters	مرشح ملي بور 0.22	9
India	Jlassco	Volumetric flasks	دوارق حجمية	10
India	Superestar	Slides and cover slides	شرائح زجاجية وغطاء شريحة	11
India	Himedi	Standard wire loop(1m)	الناقل الزرعي القياسي	12
China	Changzhou Kangfulai Medical	Disposable Syringe	محاقن طبية	13

2-1-3: المواد Material

أهم المواد الكيميائية والأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة مدرجة في الجدولين (3-3) و(4-3).

جدول (3-3): المواد الكيميائية Chemical Materials المستعملة في الدراسة

المنشأ	الشركة المصنعة	المواد الكيميائية		
England	BDH	Acetic acid	حامض الخليك الثلجي	1
USA	Promega	Agarose Gel	هلام الأغاروز	2
USA	BioSystem	Alkaline phosphatase-Kit	كت فحص ALP (U/L)	3

India	C D H	CaCO ₃	كربونات الكالسيوم	4
England	BDH	Chloroform	كلوروفورم	5
Germany	Hoechst	Cotton blue	أزرق القطن	6
USA	Biosystem	Creatinine-Kit (mg/dL)	كت فحص الكرياتينين	7
USA	Promega	TBE buffer	TBE buffer	8
Switzerland	Jourilabs	Eosin stain	صبغة الأيوسين	9
Switzerland	Fluka	Ethanol 99%	كحول أثيلي	10
England	BDH	Ethidium bromide	أيثيديوم برومايد	11
England	BDH	Formalin	فورمالين	12
Switzerland	Jourilabs	Haematoxilin stain	صبغة الهيماتوكسيلين	13
England	BDH	Lactic acid	حامض اللاكتيك	14
USA	Promega	Ladder	اللادر	15
Switzerland	Fluka	Paraffin wax	شمع البرافين المنصهر	16
England	BDH	Phenl crystals	بلورات الفينول	17
Iraq	FAS	Sodium hypochlorite	هايبوكلورات الصوديوم	18
USA	BioSystem	Transaminase – Kit	ALT-AST كت فحص (U/L)	19
USA	BioSystem	Urea – Kit (mg/dL)	كت فحص اليوريا	20

Switzerland	Fluka	Xylin	الزايلين	21
USA	BioSystem	Total Protein (g/dL)	كت فحص البروتين الكلي	22
USA	BioSystem	Bilirubin (mg/dL)	كت فحص البليروبين	23
India	Ajanata Pharma Limited	Tetracycline	التتراسايكلين	24

جدول (3-4): الأوساط الغذائية المستعملة في الدراسة

الشركة المصنعة	الاستعمال	أسم الوسط
Hi Media Laboratories Limited (India)	استعمل لعزل الفطريات وحفظها ، وفحص حساسية الفطر السام لراشح فطر المعاملة الأحيائية والمواد الكيميائية المختارة وكذلك استعمل لمعرفة تأثير فطريات المعاملة الأحيائية <i>A. flavus</i> في النمو الشعاعي للفطر الممرض (ظاهرة التضاد)	وسط أكار البطاطا ديكستروز Potato Dextrose Agar (PDA)
Hi Media Laboratories Limited (India)	استعمل للحصول على راشح فطر المعاملة الأحيائية ، وراشح الفطر الممرض ولمعاملة قياس الوزن الجاف في الوسط السائل	وسط مرق البطاطا ديكستروز Potato Dextrose Broth (PDB)

3-1-3: المواد المستخدمة في الدراسة الجزيئية

أهم المواد المستخدمة في الدراسة الجزيئية مدرجة في الجدولين (5-3) و (6-3).

جدول (5-3): مكونات مجموعة استخلاص الحامض النووي DNA الفطري

العدد			
ت	أسم العدة	المكونات	الشركة المصنعة
1	عدة استخلاص الحامض النووي DNA الفطري HiPure Yeast DNA Kit (50 preps)	HiPure DNA Mini Columns1 50 pcs	Magen
		Purification Times 50	
		Buffer SE 30 ml	
		Buffer ATL 30 ml	
		Buffer DL 30 ml	
		Buffer GW1 13 ml	
		Buffer GW2 20 ml	
		Buffer AE 15 ml	
		Reagent DX 500 ul	
		Glass Beads (0.4-0.6mm) 20 g	
		Proteinase K 12 mg	
		Proteinase Dissolve Buffer 1.8 ml	
		Lyticase Mixture 1.8 ml	
		2 ml Collection Tubes 50 pcs	
2	عدة فحص PCR	GoTaq® G2 Green Master Mix	Promega Corporation
		dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	
		Tris-HCl pH 9.0, KCl, & MgCl ₂	
		Reaction Buffer	
		Stabilizer and loading dye	

جدول (3-6): المواد المستخدمة في تضخيم الحمض النووي (DNA amplification) بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وترحيل نواتج الحامض النووي المضاعفة.

المادة	المنشأ المصنعة الشركة المادة	المنشأ المصنعة الشركة المادة
DNA ladder marker 100-1500bp	Bioneer	South Korea
TBE buffer	Biobasic	America
Ethidium bromide	Biobasic	America
Agarose gel	Biobasic	America
PreMix	Promega	USA
Absolute ethanol	CHEM-LAB	Belgium
Free nuclease water	BioLabs	UK

4-1-3: البادئات: Primers

استُخدم تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لتشخيص عزلات فطر *A. flavus* في هذه الدراسة، وذلك باستخدام بادئات ITS1 و ITS4 للتشخيص الجزيئي لهذه العزلات، بالإضافة إلى بادئات خاصة بجينات إنتاج Aflatoxin B1، بما في ذلك جينات كل من *aflR* و *aflD* و *aflP*، للكشف عن قدرة العزلات على إنتاج سم AFB1. وقد أجريت تفاعلات PCR باستخدام مجموعة GoTaq® G2 (Promega, USA; Cat. No. M7822) Green Master Mix.

جدول (3-7): بادئات DNA الامامية والخلفية المستعملة لأثبتات تشخيص *A. flavus*

اسم البادئ	تسلسل القواعد النيتروجينية Nucleotide Sequence	حجم الناتج bp
ITS1 F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	595bp
ITS4 R	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

جدول (8-3): البادئات الجينية للكشف عن الجينات المنتجة Aflatoxin B1

اسم الجين	تسلسل القواعد النيتروجينية Nucleotide Sequence		حجم المنتج
Aflatoxin B1 Synthesis gene	<i>alf PF</i>	5'-CCCATCTCGATAGCGCCTG-3'	611bp
	<i>alf PR</i>	5'-GCCACCCATACCTAGATCAAAGC-3'	
	<i>alf DF</i>	5'-CTCATCACACGCAGGCATCGG-3'	702bp
	<i>alf DR</i>	5'-AGATGCCTGCCACACTGTCT-3'	
	<i>afl RF</i>	5'-AGAGCTACTGAACGTCCCAT-3'	1458bp
	<i>afl RR</i>	5'-ATCAGGTTGCACGAAGTGTCC-3'	

4-1-3: عوامل المعاملة الأحيائية والكيميائية: Biological and chemical resistance factors

استعمل الفطر المحاري *P. ostreatus* عاملاً للمعاملة الأحيائية الذي تم الحصول عليه من جامعة الكوفة / كلية الزراعة / قسم وقاية النبات والمشخص من قبل أ. د. مجيد متعب ديوان واستعملت كربونات الكالسيوم (CaCO_3) للمعاملات الكيميائية للسيطرة على الفطر *A. flavus* الملوث للفواكه الطازجة والمجففة.

2-3: طرائق العمل: Methodolog

1-2-3: جمع العينات الغذائية: Sample collection

تم إجراء الاختبارات المعملية لهذه الدراسة في مختبرات جامعة القادسية/كلية العلوم/قسم علوم الحياة. وتم جمع العينات من الفواكه الطازجة والمجففة المحلية والمستوردة والتي تتضمن (التين والعنب والمشمش) من الاسواق المحلية والتجارية لمركز واقضية محافظة الديوانية إذ بلغ وزن كل عينة نحو 250 غم ووضعت في أكياس بلاستيكية ونقلت إلى مختبر الفطريات لحين الاستخدام، وذلك لتحري عن وجود الفطريات الملوثة لهذه العينات، وغسلت بعض العينات المكشوفة للتخلص من الاتربة

والاوساخ الموجودة على سطحها الخارجي وتركنت لتجف بدرجة حرارة الغرفة، وللمدة من شهر (شباط - تموز 2025).

2-2-3: الأوساط الزرعية والمحاليل: Culture Media and Solutions

1-2-2-3: تحضير الأوساط الزرعية: Preparation of Cultures Media

استعملت في الدراسة اوساط زرعية مختلفة لعزل الفطريات وتنميتها وتشخيصها لغرض إجراء التجارب عليها وهي كما يلي:

1- وسط أجار دكستروز البطاطس: Potato's Dextrose Agar (PDA)

حضر بإذابة 39 غم من الوسط في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي سعة 1000 مل، سخن لدرجة الغليان لإذابة الوسط تماماً، وبعدها اتبعت خطوات التعقيم الحراري في جهاز المؤصدة (التعقيم بالبخار) عند ضغط (15 باوند/ انج²) وبدرجة حرارة 121 م، لمدة 15 دقيقة. وبعدها يبرد المحلول إلى درجة حرارة (45-50) م، وبعد ان يبرد يضاف اليه المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 250 ملغم/ لتر، مع رج الوسط قبل الصب، ثم يصب الوسط المحضر في أطباق سعة 9 سم وتترك حتى تتصلب، بحسب (Colle et al., 1996). استعمل الوسط المحضر لتنمية النماذج الفطرية التي تم جمعها، ولعزل وتشخيص الفطريات وفي تقنية الزرع المزدوج وقياس النمو الشعاعي وكذلك لحفظ النماذج الفطرية المعزولة .

2- وسط مرق البطاطا ديكستروز: Potato's Dextrose Broth (PDB)

طبقاً لتعليمات الشركة المصنعة، تم تحضير الاوساط بإذابة 24 غم من الوسط في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي سعة 1000 مل، و سخن المحلول لدرجة الغليان اذا لزم الامر ليذوب بالكامل. ويتم تعقيم المحلول بجهاز المؤصدة (الأوتوكلاف) بدرجة حرارة 121م وتحت ضغط 1 جو أو (15 باوند/ انج²) لمدة 15 دقيقة ، بعد انتهاء فترة التعقيم يترك المحلول ليبرد، ثم يتم اضافة المضاد الحيوي Tetracycline بمقدار 250 ملغم/لتر قبل الصب. ان هذا الوسط يستعمل في تحضير الرواشح الفطرية المختلفة للفطر السام والفطر الحيوي واختبار قياس الأوزان الجافة للفطريات (MacFaddin, 1985).

2-2-2-3: المحاليل:

1- محلول صبغة اللاكتوفينول الزرقاء: **Lacto phenol blue**

استُخدمت صبغة اللاكتوفينول الزرقاء الجاهزة لفحص العزلات الفطرية مجهرياً لتحديد الصفات المورفولوجية للعزلات، ولإسما الخيوط الفطرية والحوامل الكونيدية والكونيدات.

2- الفورمالين: **Formalin**

يتم تحضيره بإضافة (10 مل) من الفورمالين بتركيز (40٪) مع (90 مل) من الماء المقطر.

3- محلول البومين: **Meyer's albumin**

يُحضّر المحلول بمزج 50 مل من بياض البيض مع 50 مل من الجلسرين و1 غرام من ساليسيلات الصوديوم لمنع نمو الفطريات على مقاطع الأنسجة. يُصفى المزيج باستخدام ضمادة شاش نظيفة ومعقمة. يُستخدم هذا المحلول لتثبيت مقاطع الأنسجة (Forbes et al., 2007).

4- صبغة الهيماتوكسيلين هارس وصبغة الأيوسين: **Hematoxylin Stain, Harris****Modified Eosin stain**

تم تحضير الصبغتين وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة لتلوين مقاطع الأنسجة، (Bancroft and Gamble, 2008).

3-2-3: عزل الفطريات المرافقة و الملوثات للعينات الفواكه الطازجة والمجففة

تم عزل الفطريات المرتبطة بعينات الفواكه الطازجة والمجففة التي استخدمت في البحث والملوثة لها. وتم تقسيم كل نوع من العينات إلى مجموعتين. شملت المجموعة الأولى عينات عُقمت سطحياً باستخدام محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث دقائق، ثم غُسلت عدت مرات بالماء المقطر لإزالة أي آثار لمحلول التعقيم. أما بالنسبة للمجموعة الثانية، فقد غُسلت بالماء المقطر فقط. يُعرف هيبوكلوريت الصوديوم بخصائصه المطهرة المحدودة (Sun et al., 2012; Mishra et al., 2018). وباستخدام ملقط معقم، تم وضع أجزاء من العينات المعقمة وغير المعقمة في أطباق بتري تحتوي على وسط PDA، مع ثلاث مكررات لكل عينة. حُضنت الأطباق لمدة سبعة أيام عند درجة حرارة 25 درجة مئوية. وخلال هذه الفترة، تم متابعة ورصد نمو الفطريات (Beuchat, 1995). ثم بعد ذلك، تم فحص الأطباق لتحديد الفطريات النامية، وبعد تحديدها، تم حساب نسبة التردد باستخدام المعادلة الموضحة أدناه:

$\text{النسبة المئوية} = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد للفطر}}{\text{عدد العزلات الكلية للأنواع الفطرية المختلفة (النوع)}} \times 100$

4-2-3: تشخيص الفطريات المعزولة

1-4-2-3: التشخيص المظهري والمجهري

تم تحديد وتشخيص الفطريات المعزولة بعد عملية العزل والتنقية على مستوى الجنس والنوع، بناءً على السمات المورفولوجية للمستعمرة النامية، مثل اللون وشكل المستعمرة وقاعدة المستعمرة، بالإضافة إلى الخصائص المجهرية مثل حجم وشكل وترتيب الأبواغ الكونيدية والجراثيم وفقاً لمبادئ التصنيف المعمول بها وباستخدام مفاتيح التصنيف الواردة (Hoog et al., 2000).

2-4-2-3: التشخيص الجزيئي لفطر *A. flavus* باستخدام تقنية Polymerase Chain Reaction (PCR)

استُخدمت تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) لدراسة فطر *A. flavus*. ويتضمن الاختبار عدة خطوات:

1-2-4-2-3- استخلاص الحامض النووي DNA من عزلة فطر *A. flavus* المعزولة في هذه الدراسة

لأستخلاص الحمض النووي من عزلة فطر *A. flavus*، نُميت العزلة على الوسط الزراعي الصلب (PDA)، ثم أخذ جزء من حافة العزلة الفطرية والنامية على الوسط بعمر 7 أيام. وأُستخدمت مجموعة HiPure Yeast DNA Kit لأستخلاص الحمض النووي وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة، واتباع الخطوات الآتية:

1. تم نقل 1-1.5 مل من مزرعة الفطر إلى أنبوب طرد مركزي سعة 2 مل، ثم يُجرى بالطرد المركزي بسرعة 5000 × g لمدة 5 دقائق لجمع الفطر ويُزال السائل الطافي.
2. تم إضافة 300 µl من محلول SE، و 10 µl من 2-Mercaptoethanol، و 30 µl من Lyticase إلى الراسب. ثم يُعاد تعليق الراسب جيداً باستخدام جهاز المازج (Vortex mixer)، وتُحضن في حاضنة هزازة عند درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 30-60 دقيقة.
3. أجرى بالطرد المركزي بسرعة 5000 × g لمدة 5 دقائق. ثم يُزال السائل الطافي.

4. اضيفت 300 µl من محلول ATL إلى الراسب. ثم يُعاد تعليق الراسب جيداً باستخدام جهاز المازج (Vortex mixer).
5. اضيفت 300 µl من محلول DL و 10 µl من Proteinase K إلى العينة. ثم تخلط جيداً باستخدام جهاز المازج (Vortex mixer) ، وبعد ذلك تحضن في حمام مائي عند 70 درجة مئوية لمدة 10 دقائق.
6. فصلت العينة بواسطة الطرد المركزي عند $10000 \times g$ لمدة 3 دقائق لإزالة الشوائب غير الذائبة. ثم ينقل 500 µl من الراشح إلى أنبوب طرد مركزي جديد.
7. اضيفت 250 µl من الإيثانول المطلق إلى الراشح، ثم يمزج جيداً باستخدام جهاز (Vortex mixer) لمدة 10 ثوانٍ.
8. وضع عمود HiPure DNA Mini Column I داخل أنبوب تجميع سعة 2 مل. ثم ينقل الخليط إلى العمود. ويغلق الغطاء ويجري الطرد المركزي عند $10000 \times g$ لمدة 30-60 ثانية.
9. يُتخلص من السائل المار ويعاد استخدام أنبوب التجميع. ثم يُضاف 500 µl من محلول GW1. ويغلق الغطاء ويجري الطرد المركزي عند $10000 \times g$ لمدة 30-60 ثانية.
10. تم التخلص من السائل المار ويعاد استخدام أنبوب التجميع. ثم يضاف 600 µl من محلول GW2. ويغلق الغطاء ويجري بالطرد المركزي عند $10000 \times g$ لمدة 30-60 ثانية.
11. تم التخلص من السائل المار ويعاد استخدام أنبوب التجميع. ثم يجري الطرد المركزي عند $13000 \times g$ لمدة دقيقتين. لضمان إزالته بقايا محلول GW2 ومنع انتقالها إلى الراشح النهائي.
12. نقل العمود في أنبوب طرد مركزي نظيف سعة 1.5 مل. ثم يضاف 30-50 µl من محلول AE، إلى منتصف الغشاء. وتحضن الأنبوب في درجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق، ومن ثم يجري الطرد المركزي عند $10000 \times g$ لمدة دقيقة واحدة.
13. تم التخلص من العمود ويُحفظ الحمض النووي المستخلص في درجة حرارة -20 درجة مئوية، لحين استخدامه في التجارب اللاحقة.

3-2-4-2-2- قياس نقاوة وتركيز مستخلص الحمض النووي DNA

تم قياس تركيز ونقاوة الحمض النووي DNA المستخلص من عزلة فطرية *A. flavus* باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Shemidzu. Japan من شركة UV-VIS Spectrophotmeter) ، بطول موجي 260 nm المصمم للكشف عن تراكيز الأحماض النووية DNA، وفق المعادلة الآتية

تركيز الحامض النووي ($\mu\text{g/ml}$) = مقدار الامتصاص الضوئي على طول موجي $50 \times 260 \text{ nm}$ $\times$ عامل التخفيف (Dilution factor).

ولتحديد مقدار نقاوة الحامض النووي (DNA) نطبق المعادلة التالية والتي ذكرها (Wilfinger,) (Mackey, and Chomczynski 1997):

$$\text{DNA purity (DNA)} = \frac{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي } 260 \text{ nm}}{\text{مقدار الامتصاص على طول موجي } 280 \text{ nm}}$$

وتم تخزين الحمض النووي المستخلص لعزلات فطر *A. flavus* عند درجة حرارة - 20 درجة مئوية، حتى يتم استخدامه في تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR).

3-2-4-2-3- تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction:

أجري اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) لتحديد العزلة الفطرية في هذه الدراسة. وتم ذلك باستخدام مجموعة GoTaq® G2 Green Master Mix (REF: M7822) من إنتاج شركة (USA, Promega).

حيث تم استخدام بادئات ITS1 و ITS4، لتضخيم منطقة ITS، والتشخيص الجزيئي لعزلات فطر *A. flavus*، وقد تم استخدام بادئات نوعية للكشف عن جينات تصنيع Aflatoxin B1 وهي *aflR*، *aflD* و *aflP* باستعمال تقنية PCR.

3-2-4-2-3- أعداد PCR Master Mix

تم تحضير مزيج PCR الرئيسي لجميع الجينات المستهدفة في هذه الدراسة باستخدام مجموعة GoTaq® G2 Green Master Mix. وقد تم تحضير هذا المزيج الرئيسي وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة، كما هو موضح في الجدول (3-10).

جدول (9-3): يبين حجوم المواد التي استخدمت في تحضير PCR Master mix

PCR Master mix	Volume
DNA template 5-100ng	4 µL
GoTaq ®G2 Green PCR master	12.5µL
Forward primer (10pmol)	2µL
Reveres primer (10pmol)	2µL
PCR water	4.5µL
Total volume	25 µL

بعدها تم نقل جميع انابيب PCR produt إلى جهاز الخلط والطررد المركزي السريع ExiSpin Vortex بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 3 دقائق، ومن ثم تم وضع جميع انابيب product PCR في جهاز Biometra TAdvanced من شركة (Analytik Jena, Germany).

2-3-2-4-2-3- شروط التدوير الحراري لاختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)

تم إجراء تفاعل PCR باستخدام جهاز التدوير الحراري PCR Biometra TAdvanced.

الجدول (10-3): شروط الدورة الحرارية لاختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR)

Gene	Initial denaturation		Denaturation		Annealing		Extension		Final extension	
	Tem	Time	Tem	Time	Tem	Time	Tem	Time	Tem	Time
ITS	95 °C	5min	95 °C	30sec	58 °C	30sec	72 °C	1min	72 °C	5min
aflP	95 °C	3min	95 °C	30sec	60 °C	45sec	72 °C	45sec	72 °C	7min
aflD	95 °C	3min	95 °C	30sec	61.4 °C	40sec	72 °C	30sec	72 °C	7min
aflR	95 °C	2min	95 °C	30sec	58 °C	45sec	72 °C	90sec	72 °C	7min

3-3-2-4-2-3- Gel electrophoresis الترحيل الكهربائي

تم تحضير هلام Agarose بإذابة 1.5 غرام من مسحوق Agarose في 100 مل من محلول منظم Tris-Boric Acid-EDTA (1×TBE). ثم سُخِّن المزيج باستخدام جهاز المايكروويف حتى ذاب Agarose تماماً وأصبح المحلول شفافاً. تُرِكَ المحلول ليبرد قليلاً، ثم أُضيف إليه 3 µl من صبغة Ethidium bromide (EtBr)، قبل سكه في قالب هلام Agarose. يحتوي هذا القالب على مشط في أحد طرفيه لإنشاء آبار تحميل العينات.

بعد أن تصلب الهلام، أُزيل المشط بحرص، ووضِع القالب في حوض الترحيل الكهربائي. ثم أُضيف محلول منظم (1×TBE) إلى الحوض لتغطية سطح الهلام بالكامل. بعد ذلك، حُمِلَ 5 µl من نواتج تضخيم الحمض النووي بتقنية PCR في كل حفرة من حفر الهلام، وتم إضافة 5 µl من (DNA ladder) في الحفرة الأولى المجاورة للعينات.

ثم وصل جهاز الفصل الكهربائي بمصدر طاقة وتشغيله لمدة ساعة واحدة بتيار 100 فولت و 80 أمبير. بعد اكتمال عملية الفصل الكهربائي، تم فحص تضخيم الحمض النووي الناتج باستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية (UV- Transilluminator)، وتم التقاط صور للنتائج.

4-3-2-4-2-3- طريقة تحليل تسلسل الحمض النووي DNA Sequencing Analysis

لغرض تحديد هوية الفطر المعزول، أُرسِلت نواتج PCR product المُضخَّمة من عزلة الفطر المراد تشخيصه، بالإضافة إلى البوادي (ITS1 و ITS4)، وكذلك تم إرسال جينات تخليق Aflatoxin B1 والتي تشمل *aflR*، *aflP* و *aflD*، إلى شركة MacroGen (كوريا الجنوبية) لتحديد تسلسل القواعد النيتروجينية (Nucleotide sequence) لنواتج الحامض النووي (DNA) المضاعفة و بالاتجاهين (Forward and Reverse Primer). ثم حُللت جميع تسلسلات النيوكليوتيدات باستخدام برنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)، وقورنت النتائج بالبيانات المتاحة عالمياً والتي تعود لنفس الفطر في (NCBI) National Center for Biotechnology Information. ورُسمت الشجرة التطورية (Phylogenetic tree) باستخدام برنامج MEGA.

5-2-3: التجارب المختبرية Laboratory experiments**1-5-2-3: الكشف عن السموم الفطرية في رواشح عزلات فطر *A. flavus* باستعمال تقنية****High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

أُجري تحليل السموم الفطرية في مختبرات إدارة البيئة والمياه التابعة لوزارة العلوم والتكنولوجيا للكشف عن السموم التي ينتجها فطر *A. flavus*، بما في ذلك Aflatoxin B1. حيث استُخدم في

التحليل نظام HPLC من نوع Sykam، وفقاً للطريقة التي عرضتها (Liu et al., 2012). مع اعتماد ظروف التشغيل، وكما يأتي:

١- طور ناقل Mobile phase مكوّن من: Mobile phase = acetonitrile : D.W: (60:40)

٢- استُخدم عمود فصل Column = C18-ODS (25cm*4.6mm).

٣- بالإضافة إلى كاشف فلوري Detector = Florescent Ex= 365nm, Em=445nm

٤- سرعة الانسياب أو جريان بلغ Flow rate = 1ml/min.

تُعرض العينات البيولوجية للاهتزازات فوق الصوتية لتفتيت الخلايا والجزيئات الكبيرة والأغشية في 50 ml من محلول مكون من 70 ml من الميثانول إلى 30 ml من الماء لمدة 40 دقيقة، ثم تُفصل بالطرد المركزي لمدة 5 دقائق. بعد ذلك، يُجفف الراشح ويُخفف بـ 20 ml من الماء. ثم يُمرر الراشح عبر عمود التآلق المناعي بمعدل تدفق أقل من 3 مل/دقيقة (بعد معالجة العمود مسبقاً بـ 20 ml من الماء المقطر). يُغسل العمود بـ 20 ml من الماء المقطر لإزالة الشوائب ويُجفف بالهواء لإزالة أي ماء متبقٍ. يُستخلص المستخلص بإضافة 1.4 ml من الميثانول إلى العمود وتركه ليُجف في الهواء. ثم يُخفف المستخلص بـ 2 ml من الماء ويُمرر عبر مرشح بمسام 0.55 µl. يُحقن الراشح في جهاز HPLC، ويُحسب تركيز السم في عينات الراشح الفطري.

عامل التخفيف	تركيز المادة القياسية x مساحة العينة	x	مساحة المادة القياسية	=	تركيز الانموذج
وزن او حجم الانموذج					

للتأكد من أن القيمة الناتجة تمثل المساحة القياسية لسم Aflatoxin B1، يُجرى اختبار بسيط. يُحقن المذيب مرة أخرى، ولكن لا تُكتشف أي قيمة. ثم يُحقن محلول قياسي Standard solution مرة ثانية، فتظهر قيمة خلال زمن الاحتجاز. وهذا يدل على أن هذه القيمة تتوافق مع المساحة القياسية Aflatoxin B1.

استُخدمت المادة القياسية، سم AFB1. وبمطابقة زمن احتجاز المادة القياسية مع زمن ظهور الراشح للعزلات الفطرية المحقونة، وتحت نفس ظروف تحليل المادة القياسية، لوحظت قيم محددة لزمن الاحتجاز. تشير هذه القيم إلى وجود سم Aflatoxin B1 في العزلات الفطرية المختبرة. أُجري اختباراً للتحقق من أن القيم الموجودة في العينات تعود إلى السم وليس إلى مركب قد يُشابهه في زمن الاحتجاز. حيث أخذ 50 µl من السم القياسي وأضيف إلى العينة المحقونة سابقاً، ثم أُعيد اختبارها. لوحظ ازدياد في مساحة سطح العينة نفسها المحقونة سابقاً. يُسمى هذا المعيار الداخلي Internal stander.

Preparation of Fungal Culture التحضير راشح العزلة الفطرية للفطر المحاري 2:5-2-3**Filterate *P. ostreatus***

تم تحضير راشح الفطر المحاري باستخدام وسط استنبات سائل (PDB Potato Dextrose Broth) في قوارير زجاجية مخروطية سعة 250 مل، بواقع 100 مل من وسط الاستنبات لكل قارورة. عُقِّمت الدوارق عند درجة حرارة 121 درجة مئوية وضغط 15 باوند/ إنج² لمدة 15 دقيقة. بعد التبريد، أُضيف المضاد الحيوي Tetracycline. ثم لُقِّحت الدوارق بوضع قرصين من الفطر المحاري بقطر 5 ملم، عمر كل منهما 7 أيام، في كل قارورة. حُضنت الدوارق بعد ذلك عند درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة ثلاثة أسابيع، مع رجّها كل 2-3 أيام. بعد التحضين، رُسِّحت مزارع الفطر المحاري باستخدام ورق ترشيح Whatman No.1 وقمع بوخنر معقم في ظروف معقمة. ثم عُقِّم الراشح باستخدام مرشحات Millipore Filters بمسام ذات قطر 0.22 µl. وتم تخزين الراشح وحفظه حتى الاستخدام عند درجة حرارة 4 درجات مئوية.

Preparation of extract *A. flavus* الفطر العزلة الفطرية لفطر 3:5-2-3**Culture Filterate**

تم تحضير راشح الفطر *A. flavus* والتي أعطت أعلى تركيز سام باستخدام تقنية HPLC. ولهذا الغرض، تم اختيار عزلة الفطر الملوثة لعينات العنب المجفف غير المعقم. وتم تحضير الراشح بنفس طريقة تحضير راشح الفطر المحاري.

4:5-2-3: تأثير فطر *P. ostreatus* في نمو الفطر السام *A. flavus* بتقنية الزرع المزدوج**(Dual culture) على الوسط الغذائي الصلب PDA**

استُخدمت تقنية الزراعة المزدوجة (Double Culture technique) في أطباق بتري قطرها 9 سم تحتوي على وسط غذائي صلب مُجهز مسبقاً (PDA) مع المضاد الحيوي Tetracycline بتركيز 250 ملغم/لتر. ولتحديد النشاط المضاد للفطر *P. ostreatus* والفطر السام *A. flavus*، قُسِّم الطبق إلى نصفين متساويين. باستخدام مثقاب فلين، صُنِع ثقب في النصف الأول ولُقِّح بقرص قطره 5 ملم من الفطر *P. ostreatus* عمره 7 أيام. وصُنِع ثقب في منتصف النصف الآخر ولُقِّح بقرص قطره 5 ملم من الفطر *A. flavus* عمره أيضاً 7 أيام. بواقع ثلاث مكررات لكل طبق، ووُضعت أطباق السيطرة Control تحتوي على كل فطر على حدة. ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 درجة مئوية لمدة 7 أيام. بعد التحضين، حُسب النشاط المضاد لكل فطر باستخدام مقياس النقاط الخمس الموصوف من قبل (Bell, 1982).

. الدرجة الاولى (1) يغطي الفطر المقاوم الطبق بالكامل.

. الدرجة الثانية (2) يغطي الفطر المقاوم 3/4 مساحة الطبق.

. الدرجة الثالثة (3) يغطي كلا الفطرين نصف مساحة الطبق.

. الدرجة الرابعة (4) يغطي الفطر الممرض 3/4 مساحة الطبق.

. الدرجة الخامسة (5) يغطي الفطر الممرض الطبق بالكامل.

5-2-3-5: تأثير راشح الفطر *P. ostreatus* على النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* في الوسط

PDA

لتحديد فعالية الفطر المحاري *P. ostreatus* في النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*، تم اتباع طريقة (Dixit et al., 1976)، وهي تقنية الغذاء المسموم (Poisoned Food Technique). حيث تم خلط ثلاثة تراكيز من راشح الفطر المحاري، وهي 30% و 20% و 10% مع وسط غذائي معقم من PDA. ومن ثم تم تحريك الوسط بحركة رحوية، وثُرِكت الأطباق لتتصلب. بعد ذلك، تم عمل ثقب في مركز الطبق باستخدام مثقاب فلين. ثم نُقلت قطعة بقطر 5 ملم من نهاية النمو الشعاعي لفطر *A. flavus* بعمر 7 أيام من زراعته، إلى مركز الطبق، مع عمل ثلاث تكرارات لكل تركيز، ووضعت في الحاضنة لمدة 7 أيام عند درجة حرارة 25 درجة مئوية. أما بالنسبة لأطباق السيطرة، فقد كانت بدون أي إضافات. بعد انتهاء فترة الحضانة، قُيس معدل نمو الفطر في المعاملات ذات التراكيز المختلفة. وقد قُيس معدل نمو الفطر المختبري في الأطباق باستخدام مسطرة. وبعد أن وصل الغزل الفطري إلى حافة الطبق في معاملة السيطرة، تم حُساب النمو الشعاعي بأخذ معدل نمو قطرين متعامدين للمستعمرات النامية، ثم حُسبت النسبة المئوية لتنشيط النمو القطري (Percentage of radial growth inhibition بتطبيق معادلة (Abbott, 1925)).

$$\text{النسبة المئوية لتنشيط\%} = \frac{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة} - \text{معدل قطر الفطر في أطباق المعاملة}}{\text{معدل قطر الفطر في أطباق المقارنة}} \times 100$$

6-5-2-3: تأثير تراكيز كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* في

وسط PDA

لتحديد فعالية كربونات الكالسيوم المختبرة في النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*، استُخدمت طريقة (Dixit et al., 1976)، المعروفة بتقنية الغذاء المسموم (Poisoned Food Technique). حيث

تم تحضير ثلاثة تراكيز من ملح كربونات الكالسيوم (10%، 20%، 30%). أُضيفت هذه التراكيز المختلفة إلى الوسط الزراعي (PDA) المعقم. وتم أثباع نفس الخطوات المذكورة في القسم (5-2-5-3).

3-5-2-7: تأثير تداخل المعاملات الكيميائية كربونات الكالسيوم (CaCO_3) وراشح الفطر المحاري *P. ostreatus* في النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* على الوسط الصلب PDA

لتحديد تأثير التداخل بين المواد الكيميائية المختبرة وراشح الفطر المحاري المستخدم في مكافحة الحيوية على النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*، أُجريت التفاعلات التالية:

- 5 % من راشح الفطر *P. ostreatus* + 5 ملغم/مل من كربونات الكالسيوم.
 - 10 % من راشح الفطر *P. ostreatus* + 10 ملغم/مل من كربونات الكالسيوم.
 - 15 % من راشح الفطر *P. ostreatus* + 15 ملغم/مل من كربونات الكالسيوم.
- أما بالنسبة للمعاملة السيطرة، فقد استُخدم وسط زرع صلب خالٍ من أي إضافات، وأُتبع نفس الخطوات الموضحة في القسم (3-5-2-5).

3-5-2-8: تأثير الفطر المحاري *P. ostreatus* على الوزن الجاف للفطر الممرض *A. flavus* في الوسط السائل PDB

لاختبار فعالية راشح الفطر المحاري على الوزن الجاف لفطر *A. flavus*، استُخدمت دوارق مخروطية سعة 250 مل لتحضير ثلاثة تراكيز من راشح الفطر المحاري (10%، 20%، و30%) في وسط غذائي سائل مُعدّ مسبقاً (PDB) Potato's Dextrose Broth. وُزّع 100 مل من الوسط في كل قارورة. وباستخدام مثقب فلين، نُقل قرصان بقطر 5 ملم من الطرف النامي لفطر *A. flavus* بعمره 7 أيام إلى كل قارورة، مع ثلاث تكرارات لكل تركيز. ثم حُصنت الدوارق لمدة 21 يوماً عند درجة حرارة 25 درجة مئوية. تُركت عينات السيطرة بدون أي إضافة من راشح. مع رُجّ الدوارق كل يومين. بعد انتهاء فترة التحضين، ومن ثم قُيس الوزن الجاف للفطر للتراكيز المختلفة باستخدام ميزان دقيق. تم ترشيح الوسط السائل باستخدام ورق ترشيح، ثم نُقلت الأوراق الموزونة مسبقاً إلى فرن كهربائي عند درجة حرارة 60 درجة مئوية لمدة 24 ساعة. بعد ذلك، جُفف ورق الترشيح تماماً. ثم وُزن ورق الترشيح، وطُرح وزنه ورقة الترشيح قبل الاستخدام: (وزن ورق الترشيح بعد التجفيف - وزن ورق الترشيح قبل الاستخدام - وزن اللاقحة). يُعطي هذا الوزن الجاف الدقيق لنمو الفطريات في وسط الإستنبات السائل. حُسبت نسبة التثبيط (Pinto et al., 2001) كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط \%} = \frac{\text{معدل وزن الفطر في المقارنة} - \text{معدل وزن الفطر المعاملة}}{\text{معدل وزن الفطر في المقارنة}} \times 100$$

9-5-2-3: تأثير كربونات الكالسيوم (CaCO_3) على الوزن الجاف للفطر السام (*A. flavus*) في الوسط السائل PDB

لاختبار الفعالية للمعاملة الكيميائية في الوزن الجاف للفطر *A. flavus*، تم تحضير ثلاث تراكيز من CaCO_3 وهي (10، 20، 30) mg/ml وذلك بأخذ (10، 20، 30) غم واذابتها في 100 مل من الوسط الغذائي PDB الذي تم تحضيره مسبقاً وأتبع الخطوات نفسها في (8-5-2-3).

10-5-2-3: تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم (CaCO_3) وراشح الفطر المحاري (*P. ostreatus*) في الوزن الجاف للفطر *A. flavus* في الوسط السائل PDB

لاختبار فعالية التداخل بين راشح الفطر المحاري والمعاملة الكيميائية (كربونات الكالسيوم) على الوزن الجاف لفطر *A. flavus*، استُخدمت دوارق مخروطية سعة 250 مل. وقد حُضِر الوسط الزراعي السائل PDB، وأضيفت إليه ثلاثة تراكيز من راشح الفطر المحاري وكربونات الكالسيوم كما يلي:

- 5% راشح فطر *P. ostreatus* + 5 ملغم/مل كربونات الكالسيوم.
- 10% راشح *P. ostreatus* + 10 ملغم/مل كربونات الكالسيوم.
- 15% راشح *P. ostreatus* + 15 ملغم/مل كربونات الكالسيوم.

أما بالنسبة للمعاملة السيطرة، فقد استُخدم الوسط الزراعي السائل دون أي إضافات. وأتبع الخطوات نفسها المذكورة سابقاً في (8-5-2-3).

6-2-3: دراسة تأثير سم Aflatoxin B1 داخل جسم الكائن الحي In vivo

6-2-3-1: حيوانات الدراسة Laboratory Animals

لاختبار تأثير السموم الفطرية على الحيوانات المختبرية. تم إجراء دراسة والتي تمثل منهجاً بيولوجياً والذي يعتمد على التغيرات التي تطرأ على أنسجة الحيوانات المختبرية بعد تجريعها براشح الفطر السام *A. flavus*. وتم استُخدم فئران بيضاء (White albino mice)، عدد 30 فأراً ذكراً من سلالة BALB/c albino، تتراوح أعمارها بين 8 و9 أسابيع، species : Mouse Mus musculus

بمعدل أوزان يتراوح من (25-27 غم)، جلبت من جامعة الكوفة/ كلية العلوم إلى البيت الحيواني في كلية العلوم/ جامعة القادسية. وقد قُسمت الحيوانات إلى ست مجموعات، تضم كل مجموعة 5 حيوانات، بما في ذلك المجموعة السيطرة Control group التي لم تتلق سوى الماء والعليقة. وتم توفير ظروف ملائمة، بدرجة حرارة تتراوح بين 25 و28 درجة مئوية وإضاءة مناسبة (12 ساعة ضوء: 12 ساعة ظلام). وُضعت الحيوانات تحت المراقبة للتأكد من خلوها من الأمراض قبل بدء العمل المختبري، حيث لم تُسجل أي أمراض خارجية. تمت تربية الحيوانات في أقفاص بلاستيكية مغطاة بأغطية شبكية معدنية. وغطيت أرضية الأقفاص بنشارة خشب نظيفة بعد تعريضها لأشعة الشمس لعدة أيام للتخلص من أي فطريات قد تكون عالقة بها. وتمت العناية بالأقفاص والحفاظ على نظافتها بتغيير النشارة مرتين أسبوعياً لكل قفص. أما الماء والعليقة، فقد كانا متوفرين طوال مدة التجربة.

2-6-2-3: قياس وزن الجسم Body weight measurement

تم قياس وزن حيوانات المختبر قبل بدء إعطاء الجرعات، وكذلك أثناء فترة إعطاء الجرعات، أي بعد عشرة أيام، وفي نهايتها بعد ثلاثة أسابيع (Gündüz *et al.*, 2021). وكان الهدف من ذلك هو ملاحظة تأثير السموم على أوزان الفئران البيضاء خلال فترة التجربة.

3-6-2-3: تصميم التجربة Experimental design

هدفت التجربة إلى تقييم تأثير السم على أنسجة الفئران البيضاء. وقبل البدء بعملية إعطاء الجرعات، ونظراً لسمية Aflatoxin B1 العالية، والتي بلغ تركيزها (215.9 ppb) كما في الجدول (2-4)، وقد تم إجراء اختبار تجريبي على خمسة فئران (بإعطاء السم كل 24 ساعة لمدة خمسة أيام متتالية). كان الغرض من هذا الاختبار التجريبي تحديد التركيز الأمثل للسم الذي يمكن استعماله في التجربة، وتجنب موت الفئران التي قد تعرقل البحث. حيث تم استخدام تركيز 0.5% من راشح الفطر السام A. *flavus*، مع الأخذ بنظر الاعتبار الجرعة القاتلة لنصف العدد LD50 (Ochieng *et al.*, 2016). وقد تم اختيار تركيز 10% لكل من راشح الفطر المحاري وكربونات الكالسيوم، وذلك لمعرفة تأثيرهما في الحيوانات المختبرية. وقد تم البدء بإعطاء الجرعات لحيوانات المختبرية كل يومين، ولمدة 21 يوماً (Gündüz *et al.*, 2021). كما هو موضح في الجدول أدناه:

جدول (3- 11): توزيع مجاميع الفئران البيضاء المختبرية وتراكيز المعاملات:

المجاميع	المعاملات	وصف المعاملات وتركيز المواد
المجموعة الأولى	السيطرة Control	معاملة حيوانات مجموعة السيطرة بالماء المقطر Distil water والعليقة فقط
المجموعة الثانية	راشح فطر <i>A. flavus</i>	تجريب الفئران براشح فطر <i>A. flavus</i> عن طريق الفم كل 48 ساعة بجرعة 0.5 مل/25 غم لكل فأر/يوم.
المجموعة الثالثة	راشح فطر <i>P. ostreatus</i>	تجريب الفئران براشح فطر <i>P. ostreatus</i> عن طريق الفم كل 48 ساعة بجرعة 0.5 مل/25 غم لكل فأر/يوم.
المجموعة الرابعة	<i>A. flavus</i> + <i>P. ostreatus</i>	تجريب الفئران بُراشح <i>A. flavus</i> ، وبعد 24 ساعة من التجريب، جرعت بُراشح فطر <i>P. ostreatus</i> بجرعة 0.5 مل/25 غم لكل فأر/يوم.
المجموعة الخامسة	<i>A. flavus</i> + CaCO_3	تجريب الفئران براشح فطر <i>A. flavus</i> ، وبعد 24 ساعة، جرعت بـكربونات الكالسيوم (CaCO_3) بجرعة 0.5 مل/25 غم لكل فأر/يوم.
المجموعة السادسة	راشح فطر <i>A. flavus</i> + <i>P. ostreatus</i> + CaCO_3	تجريب الفئران براشح فطر <i>A. flavus</i> ، وبعد 24 ساعة، تم تجريب براشح فطر <i>P. ostreatus</i> وكربونات الكالسيوم CaCO_3 بجرعة 0.5 مل/25 غم لكل فأر/يوم.

قد تم التضحية بالحيوانات المختبرية بعد يومين من آخر جرعة، بعد تخديرها بمركب الكلوروفورم (Chloroform). ومن ثم تم تشريحها من خلال فتحة في تجويف البطن، واستأصلت الأعضاء التي انتخبت لغرض الدراسة وتشريحها وهي (الكبد والكليتين)، ووضعت في مادة مثبتة (الفورمالين 10%). وجمعت عينات الدم Blood Collecting Samples من الحيوانات المختبرية، باستعمال طريقة سحب الدم مباشرة من القلب عن طريق ثقب قلب الحيوان Heart puncture، باستخدام محقنة (Needle Gauge 23x¼) وضع الدم المسحوب في أنبوبة خاصة بالمصل تسمى Gel tube.

3-2-7: الفحوص الكيموحياتية Biochemical Tests

بعد الانتهاء من سحب الدم، وُضعت العينات في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 3000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق، وذلك لغرض للحصول على المصل Serum، لغرض دراسة وظائف الكبد Liver function، ممثلة بقياس مستويات إنزيمات الكبد Liver enzymes والتي تشمل كل من Alkaline Phosphatase (ALP)، و Alanine Aminotransferase (ALT)، و Aspartate Aminotransferase (AST)، وكذلك البروتين الكلي Total protein و البيليروبين Bilirubin وايضاً لدراسة وظائف الكلى Renal functions، وذلك بقياس مستويات اليوريا Urea والكرياتينين Creatinine في الدم.

3-2-7-1: قياس مستويات إنزيمات الكبد (ALP، ALT، AST)، واليوريا، والكرياتينين، والبروتين الكلي، والبيليروبين في مصل الدم

تم قياس وتقدير مستويات إنزيمات الكبد ووظائف الكلى والبروتين الكلي والبيليروبين في مصل الدم باستخدام جهاز التحليل الكيميائي AU480 Chemistry Analyzer، وهو جهاز آلي بالكامل متخصص في اختبارات الكيمياء الحيوية السريرية. يتميز هذا الجهاز بقدرته على إجراء اختبارات متعددة في وقت قصير، وهو من إنتاج شركة Beckman Coulter الألمانية. يتم وضع المصل في حجرته المخصصة داخل الجهاز، ويتم إرسال البيانات عبر جهاز حاسوب متصل بالجهاز. بعد اكتمال الاختبار، تُعرض النتائج على شاشة الحاسوب باستخدام برنامج الجهاز.

3-2-8: تحضير المقاطع النسيجية Preparation of Histological Slides

بعد تخدير الحيوانات المختبرية والتضحية بها، سحب الدم. ثم استؤصلت الأعضاء التالية: (الكبد Liver، الكلية Kidney)، وغُسلت بمحلول (Normal saline) وثُبَّتت بوضعها في محلول فورمالين بنسبة 10%. تمهيداً لتحضير المقاطع النسيجية (Kiernan, 2015). وكانت الخطوات كما يلي:

1. التثبيت Fixation: وُضعت العينات في محلول Formoline بنسبة 10% لمدة 24 ساعة.
2. الغسل Washing: لإزالة محلول التثبيت الزائد، غُسلت المقاطع الأنسجة المحفوظة بالفورمالين بالماء لمدة ساعتين.
3. الانكاز Dehydration: تمت عملية الانكاز باستخدام سلسلة من تراكيز متزايدة من الإيثيلي كما يلي (70%، 80%، 90%، 100%). استُخدم كل تركيز لمدة ساعتين. لسحب الماء من العينات.

4. الترويق Clearing: تم ترويق العينات لإزالة محلول الانكاز واستبداله بمحلول يختلط بشمع البارافين المنصهر، لجعل الأنسجة أكثر شفافية وإزالة الدهون غير المرغوب فيها، استُخدم الزيلين Xylene لمدة 1.5-2 ساعة في كل مرة.

5. التشريب او الارتشاح Infiltration: تم تشريب النسيج جيداً بشمع البارافين المنصهر عند درجة حرارة 58 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة. ثم تُركت العينات داخل الشمع لمدة ساعتين أو أكثر.

6. الطمر Embedding: تم طمر العينات في قوالب نحاسية خاصة على شكل حرف (L-shaped)، وبعدها وُضعت القوالب على سطح مستوٍ لصب الشمع، مع وضع علامات على القوالب وتحديد اتجاه العينة. تُركت قوالب الشمع لتتجمد لمدة 24 ساعة قبل التقطيع.

7. التقطيع Sectioning: قُطعت القوالب باستخدام جهاز المشراح الدوار (Rotary microtome) إلى شرائح بسماكة 6-7 µl.

8. مجانسة وتحميل الشرائح: لغرض مجانسة شرائح النسيج وإزالة أي طيات ناتجة عن التقطيع، وُضعت الشرائح في حمام مائي عند درجة حرارة 40 درجة مئوية. ثم وُضعت الشرائح على شرائح زجاجية مغطاة بطبقة رقيقة من ألبومين ماير (Mayer's albumin)، واستُخدم الألبومين لتثبيت الشرائح، وتُركت على صفيحة ساخنة عند درجة حرارة 40 درجة مئوية لمدة 24 ساعة لتجفيفها من الماء. ثم أصبحت الأنسجة جاهزة للتصبيغ.

9. التصبيغ Staining: استُخدمت الصبغات التالية لتلوين مقاطع الأنسجة ودراسة بنيتها النسيجية: صبغة (Haris Hematoxline – Eosine stain).

10. الفحص المجهرى Microscopic examination: بعد التصبيغ، تُبَتَّت الشريحة ببلسم كندا (Canada Balsam)، مما جعل الأنسجة جاهزة للفحص المجهرى والتصوير. فُحصت المقاطع باستخدام مجهر ضوئي من نوع Olympus، وصُوِّرَت المقاطع النسيجية باستخدام كاميرا رقمية.

3-3: التحليل الإحصائي

التحليل الإحصائي تم باستخدام البرنامج الإحصائي الحزمة الاحصائية للعلوم الانسانية (Statistical package for social sciences)، الإصدار 25، وتحليل نتائج الدراسة باستعمال تحليل التباين أحادي الاتجاه (ANOVA) One-way analysis of variance، متبوعاً باختبار Tukey's Honestly Significant Difference (HSD) post-hoc test (Tukey's HSD)، وذلك لمقارنة متوسطات تراكيز المعاملات المختلفة مع المجموعة السيطرة ومع بعضها البعض. عُرضت البيانات كما $\pm$ Mean (Standard deviation (SD)، لثلاثة تكرارات. حُددت الدلالة الإحصائية عند مستوى $p < 0.05$ (Zar, 1999).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and discussion

4: النتائج والمناقشة Results & Discussion

1-4: عزل الفطريات وتشخيصها Isolation and Identification of fungi

أظهرت نتائج عزل الفطريات من عينات الفواكه الطازجة والمجففة المستوردة والمحلية، والتي جُمعت من أسواق محافظة الديوانية وأقضيته وجود عدة أنواع من الفطريات التي تم تشخيصها والتي شملت: *A. niger*, *A. flavus*, *P. expansum*, *A. Parasiticus*, *Rhizopus stolonifer*, *P. italicum*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Alternaria alternate*.

حيث بينت النتائج في الجدول (1-4)، بأنه يوجد هناك فروقاً معنوية، وكذلك يوجد تباين في التكرار النسبي المئوي للفطريات التي تم تشخيصها في الفواكه الطازجة والمجففة، المعقمة وغير المعقمة. فقد أظهرت النتائج بأن فطر *A. niger* سجل أعلى نسبة انتشار في كلتا الحالتين، حيث بلغت 17.72% في العينات غير المعقمة و20.29% في العينات المعقمة. وبالرغم من استخدام محلول هايوكلورات الصوديوم الذي يقتصر تأثيره على الفطريات التي توجد على الأسطح، فقد ازدادت نسبة التردد لفطر *A. niger* في العينات التي تم تعقيمها، رغم انخفاض عدد العزلات في العينات المعقمة، وذلك لأن فطر *A. niger* يعد من الفطريات التي تغزو الانسجة الداخلية للفواكه (Cohen et al., 2021).

وكذلك يرجع السبب إلى قدرة فطر *A. niger* على تكوين أعداد كبيرة من الوحدات التكاثرية حتى في الظروف البيئية غير المواتية، والتي تتميز بصغر أقطارها التي تقل عن 3-5 µm، وبالتالي قدرتها الكبيرة على الانتشار وتلويث تلك الفواكه (Samson, 2011).

بالنسبة لبقية الفطريات المعزولة فقد سجل فطر *A. flavus* نسبة تردد بلغت 15.18% في العينات غير المعقمة و 17.99% في العينات المعقمة، في حين كانت نسبة تردد فطر *P. expansum* في العينات غير المعقمة 12.88% ونسبته 15.27% في العينات المعقمة، وأما فطر *A. parasiticus* حيث سجل نسبة 10.70% في العينات غير المعقمة، و 12.13% في العينات المعقمة، وأن ارتفاع التردد النسبي لبعض الفطريات بعد التعقيم السطحي، مع انخفاض العدد الإجمالي للعزلات الفطرية في العينات المعقمة، ليس نتيجة زيادة فعالية في نموها. وإنما يشير استمرار وجودها بعد المعاملة بهيبوكلوريت الصوديوم إلى قدرتها على استعمار الأنسجة الداخلية للثمار أو البقاء في أماكن محمية يصعب على التعقيم الوصول إليها (Samson et al., 2019; Pitt and Hocking, 2009).

لا تدل نسب التردد العالية لبعض الفطريات بعد التعقيم السطحي على زيادة في نموها، بل على انخفاض في العدد الإجمالي للعزلات الفطرية بعد التعقيم، بالإضافة إلى قدرة هذه الفطريات على

استعمار الأنسجة الداخلية للثمار أو التواجد في أماكن يصعب على محلول التعقيم الوصول إليها (Agrios, 2005).

أما بالنسبة لفطر *Rhizopus stolonifer* فقد سجل نسبة (9.32% ، 2.51%) في العينات غير المعقمة والمعقمة على التوالي . حيث يعد هذا الفطر من الفطريات سريعة النمو التي تنتشر غالباً وتسبب تلوث سطحي على الثمار المخزونة والمتضررة (Liu et al., 2024).

كذلك أظهرت أنواع فطرية أخرى ترددات أقل من ذلك، فقد تم تسجيل نسب تردد بقية الفطريات المعزولة (*P. italicum*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *Alternaria alternate*) بمعدلات تردد بلغت (8.74% ، 7.11%) و (7.36% , 7.94%) و (5.98% , 6.06%) و (5.52% , 4.81%) و (3.91% , 3.34%) و (2.64% , 2.51%) على التوالي.

تتفق هذه النتائج مع ما لاحظته كل من (Ozer et al., 2012 ; Alawami, 2008)، حيث يتضح أن الفطريات التي تنتمي إلى أجناس *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* تساهم بشكل رئيسي في تلف الفواكه وتقوم بإنتاج السموم الفطرية.

الجدول (4-1): الفطريات المعزولة من الفواكه المعقمة و غير المعقمة سطحياً ونسبة تكرارها

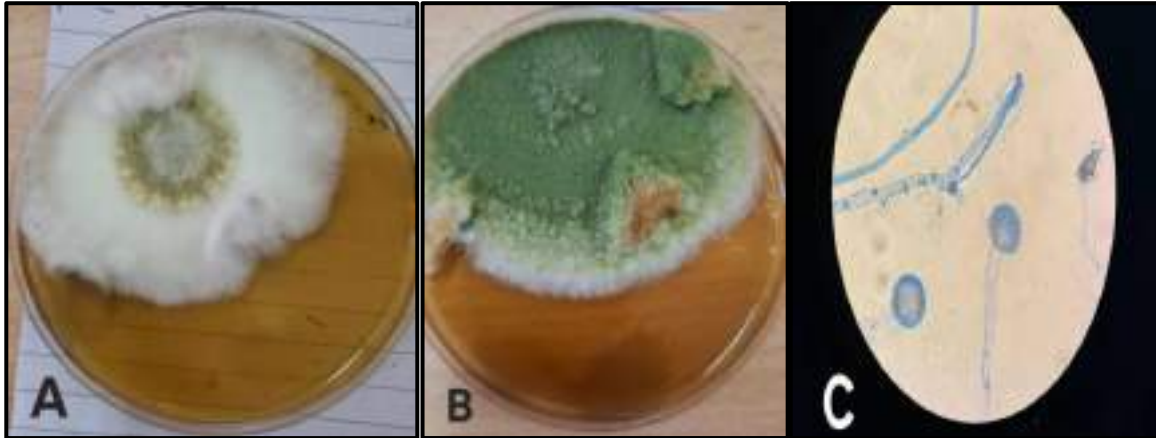
الانواع الفطرية Fungal Species	العينات غير المعقمة سطحياً Non-sterilized	العينات المعقمة سطحياً Surface-sterilized	نسبة الانخفاض % Reduction %
<i>A. niger</i>	154 (17.72%)	97 (20.29%)	37.0%
<i>A. flavus</i>	132 (15.18%)	86 (17.99%)	34.8%
<i>P. expansum</i>	112 (12.88%)	73 (15.27%)	34.8%
<i>A. parasiticus</i>	93 (10.70%)	58 (12.13%)	37.6%
<i>Rhizopus stolonifer</i>	81 (9.32%)	12 (2.51%)	85.2%
<i>P. italicum</i>	76 (8.74%)	34 (7.11%)	55.3%
<i>A. carbonarius</i>	64 (7.36%)	38 (7.94%)	40.6%
<i>A. ochraceus</i>	52 (5.98%)	29 (6.06%)	44.2%
<i>A. fumigatus</i>	48 (5.52%)	23 (4.81%)	52.1%
<i>A. terreus</i>	34 (3.91%)	16 (3.34%)	52.9%
<i>Alternaria alternata</i>	23 (2.64%)	12 (2.51%)	47.8%
Total isolates	869	478	
Grand total	1347		
X² total	113.46		
P value	< 0.0027		

2-4: التشخيص المظهري والمجهري للفطر المعزول *A. flavus* في هذه الدراسة

1-2-4- التشخيص المظهري والمجهري

تم تحديد الفطريات المعزولة على مستوى الجنس والنوع بناءً على الخصائص المظهر الخارجي للمستعمرة (Morphological features)، مثل لون المستعمرة وشكلها وقاعدتها. كما تم الأخذ بعين الاعتبار الخصائص المجهريّة، مثل حجم وشكل وترتيب الأبواغ والحوامل البوغية، وذلك باتباع المبادئ التصنيفية المعتمدة وباستخدام المفاتيح التصنيفية الواردة في (Frisvad et al., 2019).

تتميز مستعمرة *A. flavus* بنموها السريع ومظهرها المميز. يتغير لون سطحها من الأبيض في المراحل المبكرة إلى الأخضر المصفر الفاتح أو الأخضر الزيتوني مع نضوج الأبواغ. قد يكون للمستعمرة ملمس مخملي أو صوفي أو مسحوق كثيف نظراً لكثرة الأبواغ. مورفولوجياً، تكون الحواف مسطحة عموماً، بينما يكون المركز مرتفعاً وقد يُظهر بنية مجمعة تشبه الدماغ. يكون الجانب السفلي للمستعمرة عادةً بلون كريمي باهت إلى ذهبي مصفر، مع إمكانية ملاحظة تصبغات ذهبية. وقد يكون مائلاً إلى الحمرة أحياناً. إضافةً إلى ذلك، قد يفرز سطح المستعمرة قطرات من سائل شفاف أو أصفر أو بني (Khan et al., 2020). يوضح ذلك الشكل (1-4).



الشكل (1-4): يبين لون وشكل مستعمرات فطر *A. flavus*

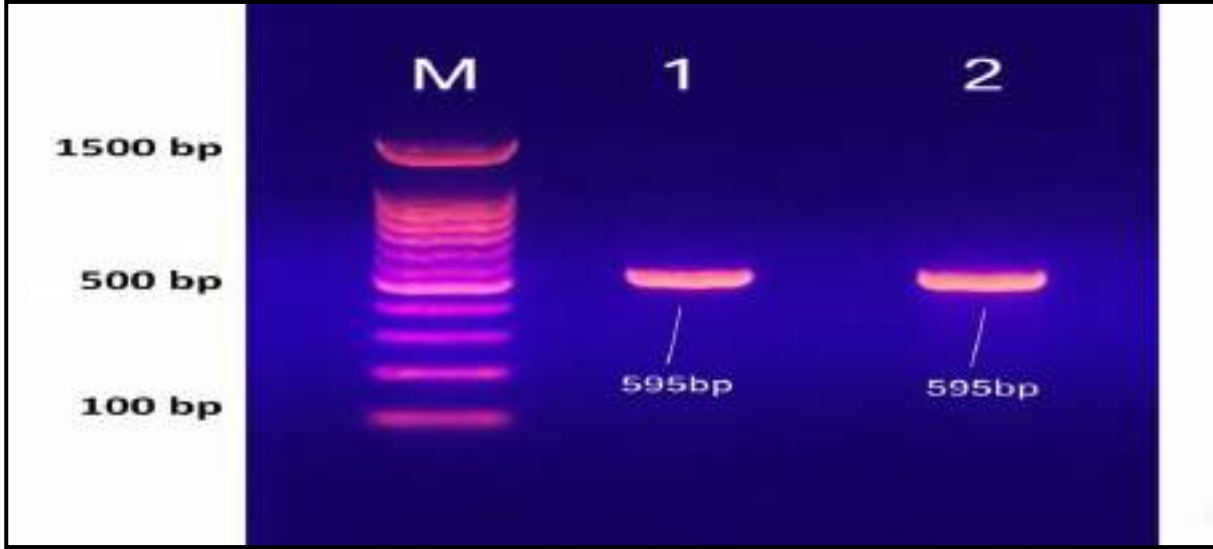
(A) لون وشكل *A. flavus* المعزول من عينات العنب المجفف (B) لون وشكل *A. flavus* بعد

5 أيام . C. الخيوط الفطرية Hyphae والكونيديات Conidia.

2-2-4: التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Diagnosis by Polymerase Chain Reaction (PCR)

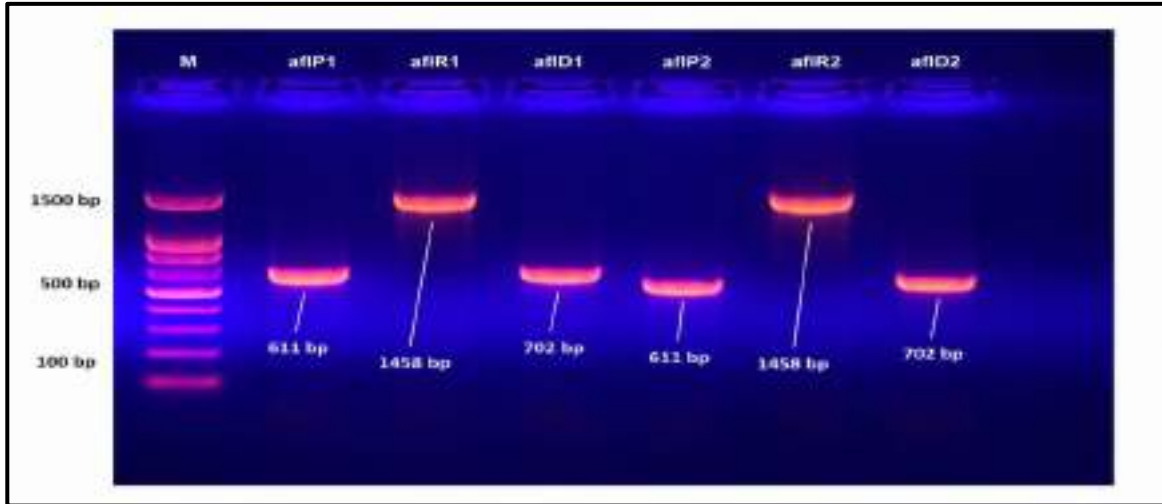
تم اختيار فطر *A. flavus* لإتمام التجارب المختبرية عليه ولدعم التشخيص المظهري والمجهري للفطر، استخدم التشخيص الجزيئي بواسطة تقنية تفاعل PCR لزيادة التأكد من صحة تشخيص

الفطريات. وتم استعمال البادئ الامامي ITS1 و البادئ الخلفي ITS4 لعزلة الفطرية حيث بلغت مسافة الترحيل الكهربائي لنواتج الحامض النووي (PCR products) لفطر *A. flavus* مع البادئ ITS1 و ITS4 (595bp)، كما مبين في الشكل (2-4). ويتفق هذا مع ما توصل اليه *Khare et al.* (2018) في عزل وتشخيص أنواع فطرية منتجة للسموم من الفواكه والمواد الغذائية بطريقة PCR.



الشكل (2-4): صورة الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز لناتج الحمض النووي PCR product ، والمضاعف بواسطة تفاعل PCR وباستخدام زوج البوادي ITS1 و ITS4. لعزلة فطر *A. flavus*. حيث M: تمثل Marker (100 – 1500bp)، والمسارات (1-2) تُظهر العزلات الموجبة لفطر *A. flavus* عند (595bp).

كذلك تم الكشف عن الجينات المسؤولة عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين باستخدام تفاعل PCR، والذي يشمل كل من الجين التنظيمي *aflR* والجينات البنيوية *aflD* و *aflP*، وهي مكونات أساسية في مسار التخليق الحيوي للأفلاتوكسين في فطر *A. flavus*. حيث أظهر الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز وجود حزم DNA واضحة تتوافق مع أحجام التضخيم المتوقعة 1458bp لجين *aflR*، و 702bp لجين *aflD*، و 611bp لجين *aflP*، ويؤكد وجود هذه الجينات في العزلات المدروسة إلى قدرتها على تخليق Aflatoxins، حيث يعمل الجين *aflR* كمنشط نسخ رئيسي لمجموعة جينات التخليق الحيوي للأفلاتوكسين، بينما يشفر الجينان *aflD* و *aflP* إنزيمات تُشارك في المراحل المبكرة والمتأخرة من التخليق الحيوي للأفلاتوكسين، على التوالي. تتوافق هذه النتائج مع الدراسات التي حددت هذه الجينات كعلامات جزيئية موثوقة على وجود الجينات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية وكذلك لتقييم قدرة عزلات فطر *A. flavus* على إنتاج الأفلاتوكسينات (Sohrabi and Taghizadeh, 2018).

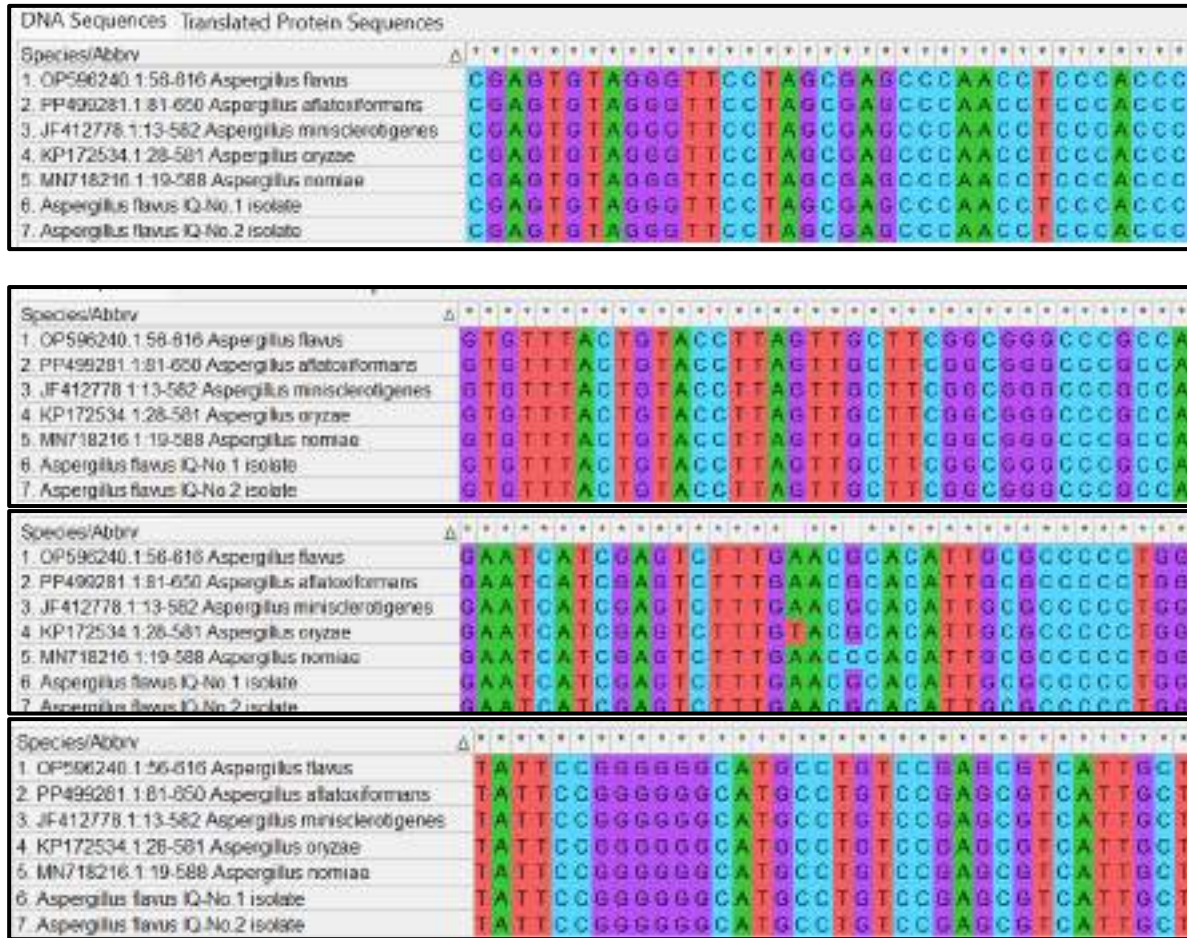


الشكل (3-4). يوضح الكشف عن جينات *aflP* و *aflR* و *aflD* في الحمض النووي الجينومي المستخلص من فطر *A. flavus* باستخدام تفاعل PCR باستخدام Specific primers. تم تحليل نواتج تفاعل PCR المُضخمة بواسطة الترحيل الكهربائي على هلام الأغاروز بنسبة 1.5%. وتم الكشف عن الحزمة المحددة التي تتوافق مع الحجم الجزيئي المتوقع لجينات *aflP* 611bp ، و *aflR* 1458bp ، و *aflD* 702bp. يشير المسار M: Marker (100-1500bp)

4-2-2-1- نتائج تسلسل الحمض النووي لمنطقة ITS : Results of DNA Sequencing for the Internal Transcribed Spacer (ITS) Region

أُجري تحليل تسلسل الحمض النووي (DNA Sequencing Analysis) على عزلتين محليتين من فطر *A. flavus* (IQ.No.1 and IQ.No.2) استناداً إلى منطقة الفاصل الداخلي المنسوخ (The internal transcribed spacer (ITS)).

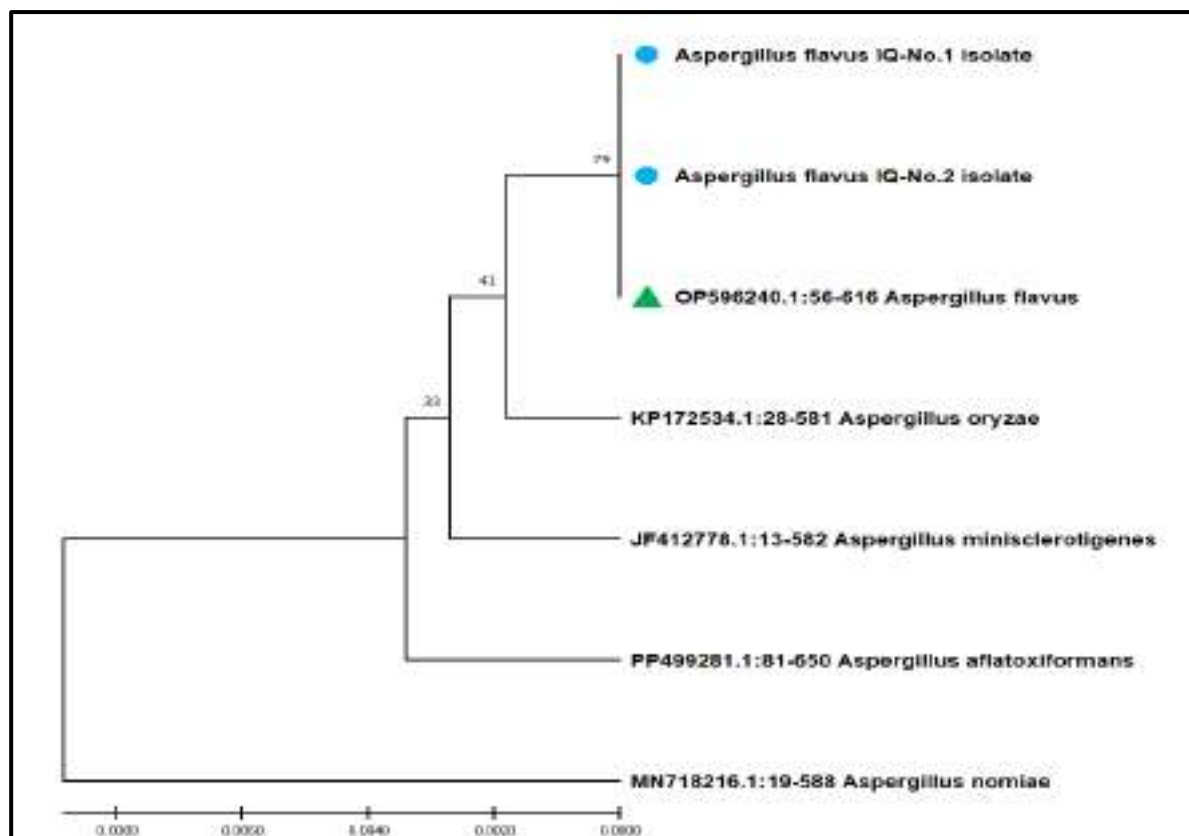
حيث كشف تحليل المحاذاة للتسلسلات المتعددة (The multiple sequence alignment analysis) عن درجة عالية من التشابه في التسلسل بين عزلتي *A. flavus* المحليتين وأنواع أخرى من جنس *Aspergillus* ، كما يتضح من وجود مواقع نيوكليوتيدية محفوظة مُشار إليها بعلامات النجمة. ومع ذلك، أبرزت المحاذاة أيضاً بعض الطفرات الاستبدالية (Substitution mutations) في تسلسل جين الحمض النووي الريبوزي (RNA) لمنطقة ITS كما في الشكل (4-4).



الشكل (4-4): يبين تحليل محاذاة التسلسل المتعدد (Multiple sequence alignment analysis) لجين الحمض النووي الريبوزي (RNA) للفواصل المنسوخة الداخلية (Internal transcribed spacer ribosomal RNA) في عزلات *A. flavus* المحلية وأنواع *Aspergillus* ذات الصلة في قاعدة بيانات NCBI-Genbank. تم إنشاء تحليل المحاذاة المتعددة باستخدام أداة ClustalW. أظهر تحليل المحاذاة تشابهاً في محاذاة النيوكليوتيدات (*) وطفرات استبدال في جين الحمض النووي الريبوزي للفواصل المنسوخ الداخلي بين العزلات.

لتحديد العلاقة الجينية بين عزلتي *A. flavus* المحليتين، أُجري تحليل الشجرة التطوري لتحليل الشجرة التطورية (Phylogenetic tree analysis)، شكل (4-5). وباعتماد على تسلسلات منطقة ITS-1 لعزلة فطر *A. flavus* المحلية ومقارنتها مع تسلسلات المنطقة ذاتها لبعض عزلات الفطر *A. flavus* العالمية والمحلية والمسجلة في (NCBI) بعد الحصول على التتابع النيوكليوتيدي لحزمة الحامض النووي للعزلة المحلية. وباستخدام خوارزمية طريقة تجميع الأزواج غير الموزونة مع المتوسط الحسابي (The Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean (UPGMA) وطريقة الاحتمالية المركبة القصوى (The Maximum Composite Likelihood method) لحساب المسافات التطورية. أظهر تحليل الشجرة التطور الوراثي بأن عزلة *A. flavus* المحلية ترتبط

ارتباطاً وثيقاً بسلالة *A. flavus* المرجعية في قاعدة بيانات NCBI-BLAST (Accession number OP596240.1) رقم التسجيل، بمسافة وراثية إجمالية تتراوح بين (00.0080-0.0020%).



الشكل (4-5): تحليل شجرة التطور الجيني (Phylogenetic tree analysis) بناءً على التسلسل الجزيئي لجين الحمض النووي الريبوزي للفاصل المنسوخ الداخلي (Internal transcribed spacer ribosomal RNA gene) في عزلات *A. flavus* المحلية. استُخدمت هذه العزلات للتحقق من الهوية الجينية. تم بناء شجرة التطور الجيني باستخدام طريقة تجميع الأزواج غير الموزونة مع المتوسط الحسابي (Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean (UPGMA tree method))، وحُسبت المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمالية المركبة القصوى في برنامج MEGA (MEGA 6.0 version). أظهرت عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.2) و (IQ.No.1) صلة قرابة وثيقة بعزلة *A. flavus* (OP596240.1) في قاعدة بيانات NCBI-BLAST، حيث تراوحت التغيرات الجينية الكلية بين (0.0080-0.0020%).

علاوة على ذلك، قدّم تحليل تطابق تسلسل الحمض النووي الريبوزي (RNA) باستخدام NCBI-BLAST تأكيداً إضافياً للهوية الوراثية للعزلة المحلية، حيث بلغت نسبة التطابق بين تسلسل الحمض النووي الريبوزي (RNA) وتسلسل الحمض النووي الريبوزي (RNA) لسلالة *A. flavus* المرجعية (99.25-99.45%). كما في الجدول (4-2).

الجدول (2-4): نسبة تطابق تسلسل التماثل باستخدام برنامج NCBI-BLAST بين عزلات فطر *A. flavus* المحلية وعزلات الفطريات القريبة منها في برنامج NCBI-BLAST:

فطر <i>A. flavus</i> المحلي	Accession number	Homology sequence identity (%)		
		NCBI Blast identity	NCBI accession number	Identity (%)
IQ.No.1	PZ556422	<i>A. flavus</i>	OP596240.1	99.45%
IQ.No.2	PZ556423	<i>A. flavus</i>	OP596240.1	99.25%

2-2-2-4- نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *aflP* ناقل ميثيل O-methyltransferase (*omtA*) المسؤول عن تخليق الأفلاتوكسين

أظهر تحليل تسلسل الحمض النووي لجين *aflP* ناقل ميثيل O-methyltransferase (*omtA*)، المسؤول عن تخليق الأفلاتوكسين، بأن عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.1 و IQ.No.2)، تمتلك درجة عالية من التشابه الجيني (98.45%) مع سلالة *A. flavus* ذات الرقم المرجعي (CECT:2687 (JN217222.1)، مما يؤكد هويتها التصنيفية ويشير إلى وجود تباين جيني محدود، كما في الشكل (4-6).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrev	
1 JN217222.1 Aspergillus flavus CECT 2687	TATCTGATAGGAACCGCAGCTGAAATGCGAGAA-ACAGCTACCAAA
2 Aspergillus flavus IQ.No.2 omtA gene	TATCTGATAGGAACCGCAGCTGAGATGCGAGAA-ACAGCTACCAAA
3 Aspergillus flavus IQ.No.1 omtA gene	TATCTGATAGGAACCGCAGCTGAGATGCGAGAA-ACAGCTACCAAA

الشكل (4-6): تحليل محاذاة التسلسل المتعدد لجين O-methyltransferase (*omtA*) في عزلات محلية من فطر *A. flavus* وسلالة *A. flavus* ذات الصلة من بنك الجينات NCBI. تم إنشاء تحليل المحاذاة المتعددة باستخدام أداة ClustalW. أظهر تحليل المحاذاة تشابه محاذاة النيوكليوتيدات (*) وطفرات الاستبدال في جين O-methyltransferase (*omtA*) بين العزلات.

كشف تحليل تسلسل الحمض النووي المتعدد (The multiple sequence alignment) عن ثلاثة اختلافات في النيوكليوتيدات المفردة (SNPs) Single nucleotide polymorphisms في كل عزلة (A→C، G→C، و A→G)، مما أدى إلى استبدال الأحماض الأمينية (H→Q و D→G)

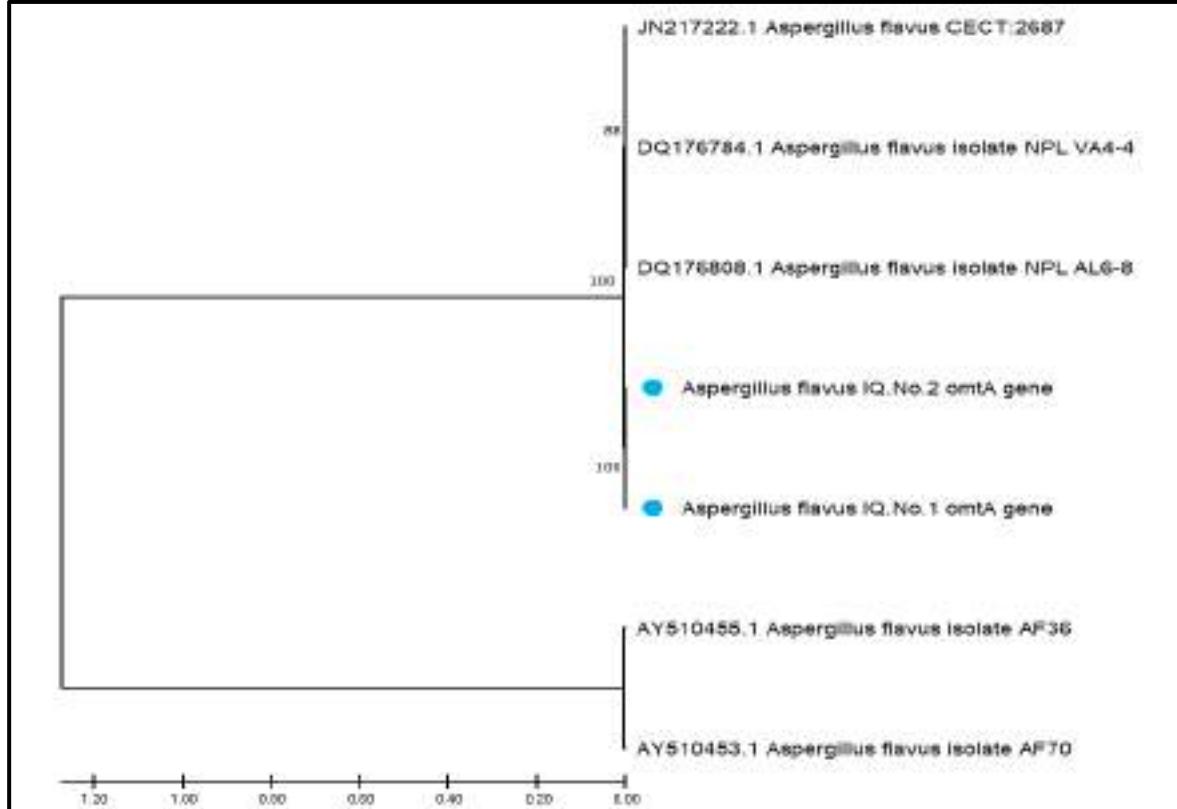
المصنفة كطفرات خاطئة Missense Mutation. أنتجت هذه التغيرات النوكليوتيدية معدل تباين جيني قدره 1.55%، مما يشير إلى تباين تطوري طفيف ضمن المنطقة المشفرة لجين *omtA* كما في الجدول (3-4).

جدول (3-4): تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني للجين *afIP*

Isolate No.	Accession Number	SNP No.	SNP Type	Amino Acid Substitution	Type of Mutation	Substitution Mutation %	Identity (%)
IQ.No.1	PZ556422	3	A→C, G→C, A→G	D→G, H→Q	Missense	1.55%	98.45%
IQ.No.2	PZ556423	3	A→C, G→C, A→G	D→G, H→Q	Missense	1.55%	98.45%

بما أن جين *omtA* يُشفّر إنزيم O-methyltransferase ، وهو إنزيم رئيسي يُشارك في المراحل المتأخرة من التخليق الحيوي للأفلاتوكسين، فإن تعدد الأشكال التسلسلية داخل هذا الجين قد يؤثر على النشاط الأنزيمي، أو الآليات التنظيمية، أو قدرة العزلات على إنتاج الأفلاتوكسين. ومع ذلك، فإن التطابق التسلسلي العالي الملاحظ يُشير إلى أن المناطق الوظيفية للجين تظل محفوظة بشكل كبير، مما يعكس الدور الأساسي لـ *omtA* في الحفاظ على مسارات التخليق الحيوي للأفلاتوكسين في فطر *A. flavus*. حيث ظهر أن جينات التخليق الحيوي للأفلاتوكسين محفوظة بشكل عام بين عزلات *A. flavus* المُنتجة للسموم، على الرغم من أن الطفرات النقطية (Point mutations) وتعدد الأشكال التسلسلية (Sequence polymorphisms) يُمكن أن تُساهم في التنوع الجيني والاختلافات في القدرة على إنتاج السموم (Okoth et al., 2018; Kovács et al., 2026) تدعم النتائج جدوى استخدام تسلسل جين *omtA* كعلامة جزيئية موثوقة للتوصيف الجيني والتقييم التطوري لعزلات فطر *A. flavus* المنتجة للأفلاتوكسين.

أكد التحليل التطوري لتسلسلات جين *aflP* (*omtA*) الجزئية بأن هوية عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.2 و IQ.No.1). شكلت صلة وثيقة بسلالة (JN217222.1) *A. flavus* CECT 2687 ، حيث أظهرت مستوى منخفضاً من التباين الجيني (0.20- 1.20%). وتم إنشاء الشجرة التطورية باستخدام طريقة UPGMA، مع حساب المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمالية المركبة القصوى في برنامج MEGA 6.0. كما في الشكل (4-7).



الشكل (4-7): تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي من *O-methyltransferase* (*omtA*) gene في عزلات محلية من فطر *A. flavus*. تم استخدام هذه العزلات للتحقق من الهوية الجينية. تم بناء شجرة التطور الجيني باستخدام طريقة (UPGMA) Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean tree method ، وحُسبت المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمالية المركبة القصوى في برنامج MEGA (الإصدار 6.0). أظهرت عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.1 و IQ.No.2) تبايناً جينياً مشابهاً لعزلة *A. flavus* CECT:2687 (JN217222.1) في قاعدة بيانات NCBI-BLAST، حيث تراوحت التغيرات الجينية الكلية بين (0.20- 1.20%).

4-2-2-3- نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين تخليق الأفلاتوكسين (*aflD*):

أظهر تحليل تسلسل الحمض النووي لجين تخليق الأفلاتوكسين *aflD* في عزلتين محليتين من فطر *A. flavus* (IQ.No.1 و IQ.No.2) تطابقاً تاماً في النيوكليوتيدات (100%) مع سلالة *A. flavus* (strain ITEM 8094 GenBank accession FN398171.1)، وهو ما تم تأكيده من خلال

محاذاة التسلسلات المتعددة (Multiple sequence alignment) باستخدام برنامج ClustalW. كما في الشكل (4-8).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. Aspergillus flavus IQ.No.1 aflD gene	ACATGGTGGCGCAAGTTCCACTTTGAGAACAAATGGCTCACGG
2. Aspergillus flavus IQ.No.2 aflD gene	ACATGGTGGCGCAAGTTCCACTTTGAGAACAAATGGCTCACGG
3. FN398171.1 Aspergillus flavus strain ITEM 8094	ACATGGTGGCGCAAGTTCCACTTTGAGAACAAATGGCTCACGG

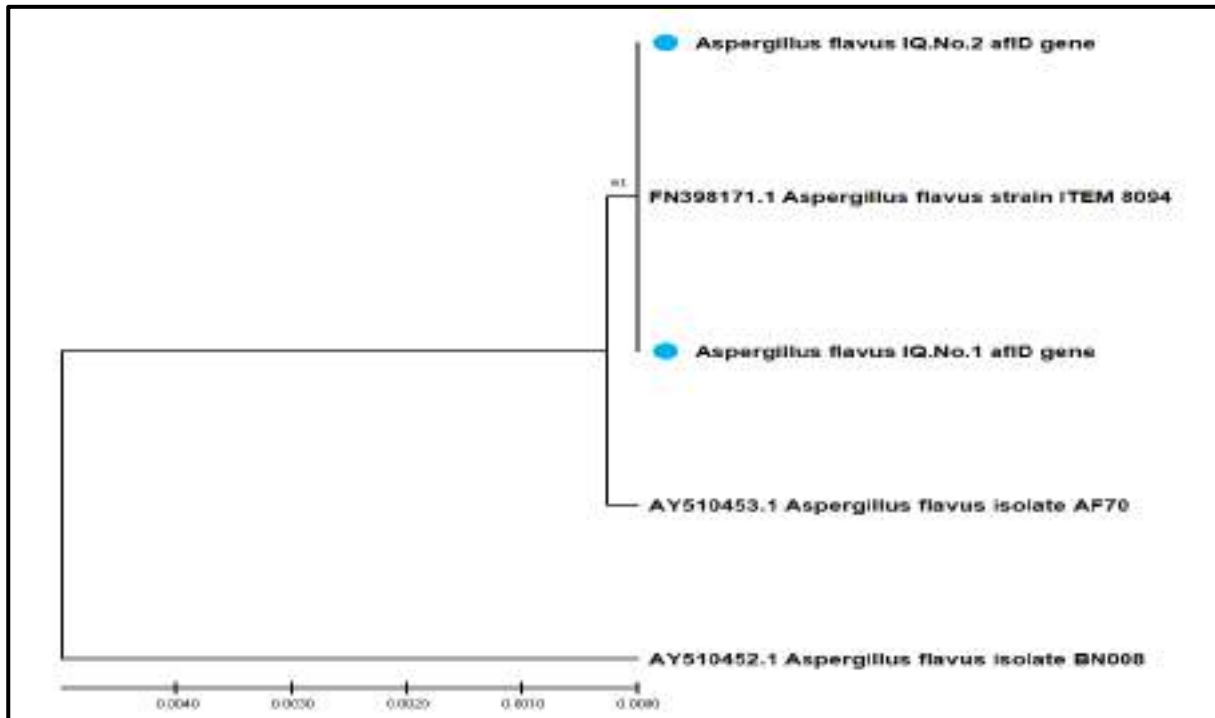
الشكل (4-8): تحليل محاذاة التسلسل المتعدد لجين *aflD* (Multiple sequence alignment analysis of *aflD* gene). تم إنشاء تحليل المحاذاة المتعددة باستخدام أداة ClustalW. أظهر تحليل المحاذاة تشابه محاذاة النيوكليوتيدات (*) وطفرات الاستبدال في جين *aflD* بين العزلات.

كذلك لم يتم الكشف عن أي تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة (Single nucleotide polymorphisms (SNPs) أو استبدالات الأحماض الأمينية في أي من العزلتين، مما يشير إلى أن جميع الطفرات الملحوظة كانت طفرات صامتة (Silent mutation) ولم تحدث أي تغييرات في تسلسل البروتين المتوقع كما في الجدول (4-4).

الجدول (4-4): تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني للجين *aflD*

Isolate No.	Accession Number	SNP No.	SNP Type	Amino Acid Substitution	Type of Mutation	Substitution Mutation %	Identity (%)
IQ.No.1	PZ556422	0	-	-	Silent	0.0%	100%
IQ.No.2	PZ556423	0	-	-	Silent	0.0%	100%

بالإضافة إلى ذلك، دعمت الشجرة التطورية الشكل (4-9)، والتي تم إنشاؤها باستخدام طريقة UPGMA القرابة الجينية الوثيقة للعزلتين المحليتين بالسلالة المرجعية، حيث تراوحت التغيرات الجينية الكلية من (0.20% إلى 1.20%) فقط. وتشير هذه النتائج إلى أن جين *aflD* محفوظ بدرجة عالية بين عزلات *A. flavus* التي تم تحليلها، وأن غياب الطفرات غير المترادفة يدل على إمكانية الحفاظ على سلامة المسار الحيوي لتخليق الأفلاتوكسين في هذه السلالات (Kumar et al., 2016; Ahmad et al., 2025).



الشكل (4-9): تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي لجين *aflD* في عزلات *A. flavus* المحلية المستخدمة في التحقق الجيني. تم بناء الشجرة التطورية باستخدام Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean (UPGMA) tree method، وحُسبت المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمالية المركبة القصوى في برنامج MEGA (الإصدار 6.0). أظهرت عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.1 و IQ.No.2) صلة قرابة وثيقة بسلالة (FN398171.1) *A. flavus* ITEM 8094 في قاعدة بيانات NCBI-BLAST، وذلك عند نسبة تغيرات جينية إجمالية تتراوح بين (0.20% و 1.20%).

4-2-2-4- نتائج تحليل تسلسل الحمض النووي لجين تخليق الأفلاتوكسين (*aflR*):

أُجري تحليل تسلسل الحمض النووي لجين (*aflR*) لتحديد الاختلافات الجينية (Mutations) بين عزلتين محليتين من فطر *A. flavus* (IQ.No.1 و IQ.No.2) وسلالة (*A. flavus* CHL133) ذات الصلة في قاعدة بيانات NCBI-Blast. كما في الشكل (4-10).

DNA Sequences Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	
1. Aspergillus flavus IQ No.1 aflR gene	ACCATATCTCCGCCAAGGCGATCTCCGGGACCGATCCG
2. Aspergillus flavus IQ No.2 aflR gene	ACCATATCTCCGCCAAGGCGATCTCCGGGACCGATCCG
3. MH752565.1 Aspergillus flavus isolate CHL133	CCATATCTCTCCGCCCGGGCATCTCCCGGAACCGATCCG

DNA Sequences Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	
1. Aspergillus flavus IQ No.1 aflR gene	CGCAATCCGCGCGCTCCAGTCCCGTTGATTCAACT
2. Aspergillus flavus IQ No.2 aflR gene	CGCAATCCGCGCGCTCCAGTCCCGTTGATTCAACT
3. MH752565.1 Aspergillus flavus isolate CHL133	CGCAATCCGCGCGCTCCAGTCCCGTTGATTCAACT

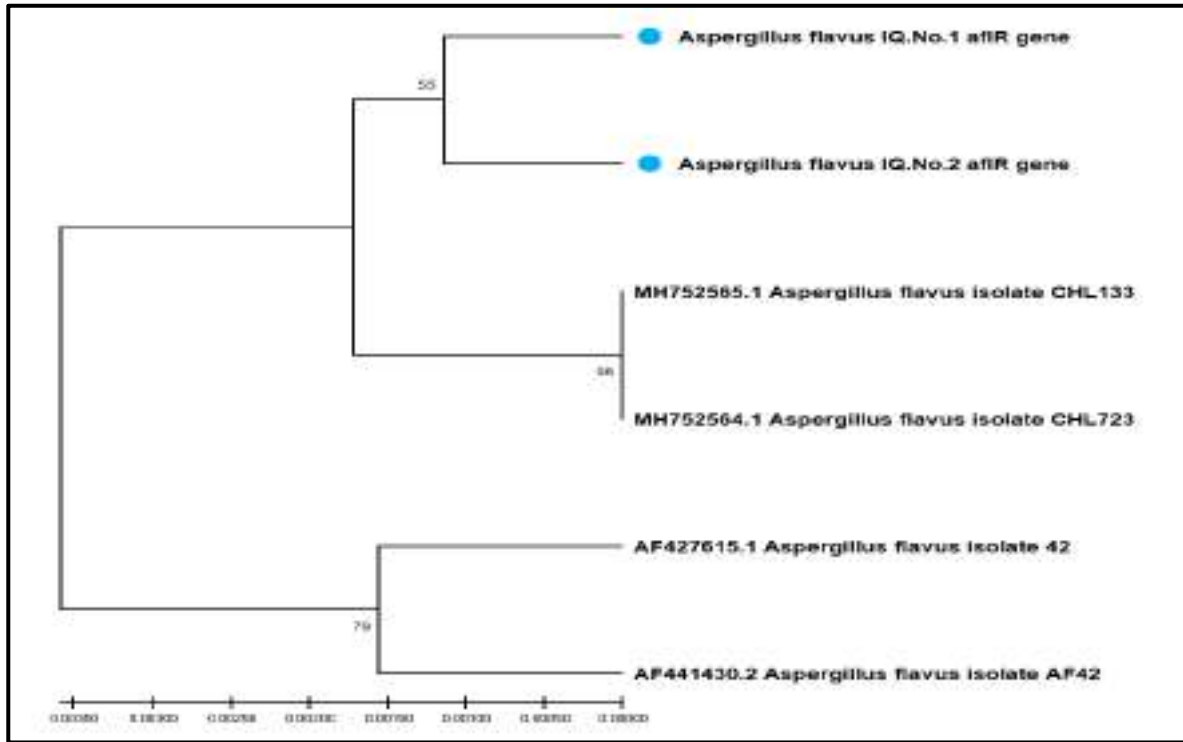
الشكل (4-10): تحليل محاذاة التسلسل المتعدد (Multiple sequence alignment analysis) لجين *aflR* في عزلات محلية من فطر *A. flavus* وسلالة *A. flavus* ذات الصلة من بنك الجينات NCBI. تم إنشاء تحليل المحاذاة المتعددة (The multiple alignment analysis) باستخدام أداة ClustalW. أظهر تحليل المحاذاة تشابه محاذاة النيوكليوتيدات (*) وطفرات الاستبدال (Substitution mutations) في جين *aflR* بين العزلات.

كشف تحليل جين *aflR*، وهو منظم نسخ رئيسي لمسار التخليق الحيوي للأفلاتوكسين، عن طفرات استبدال (Missense mutations) مختلفة في عزلتين محليتين من فطر *A. flavus* مقارنةً بالسلالة المرجعية (MH752565.1) *A. flavus* CHL133. حملت العزلة IQ.No.1 طفرة استبدال واحدة من C→A، مما أدى إلى استبدال Aspartate-to-Glycine (D→G)، بينما أظهرت العزلة IQ.No.2 ثلاثة تغييرات نيوكليوتيدية (C→A, A→C, C→T) أدت إلى استبدال حمضين أميين (D→G and H→Q). وصُنفت جميع الطفرات على أنها طفرات استبدال (Substitution mutation)، بمعدلات استبدال بلغت 0.42% و 1.63% للعزلتين IQ.No.2 و IQ.No.1 على التوالي، مما أسفر عن تطابق في التسلسل بنسبة 99.58% و 98.37%. كما في الجدول (4-5).

جدول (4-5): تطابق تسلسل التماثل والتنوع الجيني للجين *aflR*

Isolate No.	Accession Number	SNP No.	SNP Type	Amino Acid Substitution	Type of Mutation	Substitution Mutation %	Identity (%)
IQ.No.1	PZ556422	1	C→A	D→G	Missense	0.42%	99.58%
IQ.No.2	PZ556423	3	C→A, A→C, C→T	D→G, H→Q	Missense	1.63%	98.37%

بالإضافة إلى ذلك، أكد التحليل التطوري لشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis لجين *aflR* شكل (4-11)، وجود قرابة جينية وثيقة مع السلالة المرجعية، حيث تراوحت التغيرات الجينية الكلية بين 0.0010% و 0.0040%. وقد تُغير هذه الطفرات غير المترادفة (Non-synonymous mutations) في جين *aflR* وظيفة ارتباط البروتين المُشَفَّر بالحمض النووي أو وظيفته التنظيمية، مما يؤثر على مستويات إنتاج الأفلاتوكسين. وتتفق هذه النتيجة مع الدراسات السابقة التي تُشير إلى أن تعدد الأشكال في جين *aflR* يُمكن أن يُعدّل كفاءة التخليق الحيوي للأفلاتوكسين (Albakri et al., 2021).



الشكل (4-11): تحليل الشجرة التطوري الجيني لتسلسل جزئي لجين *aflR* في عزلات محلية من فطر *A. flavus*. تم استخدام هذه العزلات للتحقق من الهوية الجينية. تم بناء شجرة التطور الجيني باستخدام Unweighted Pair Group method with Arithmetic Mean (UPGMA tree method)، وحُسبت المسافات التطورية باستخدام طريقة الاحتمالية المركبة القصوى في برنامج MEGA (الإصدار 6.0). أظهرت عزلات *A. flavus* المحلية (IQ.No.2) و (IQ.No.1) تبايناً جينياً مشابهاً لعزلة (MH752565.1) *A. flavus* CHL133 في قاعدة بيانات NCBI-BLAST، حيث تراوحت التغيرات الجينية الكلية بين 0.0010% و 0.0040%.

3-4: نتائج التجارب المختبرية:

4 - 3 - 1: استخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) للكشف عن سم Aflatoxin B1 الذي ينتجه فطر *A. flavus* :

أظهرت نتائج تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) أن معظم العزلات الفطرية المدروسة قادرة على إنتاج سم الأفلاتوكسين B1، كما هو موضح في الجدول (4-6) والملحق 1. وقد ظهر السم عند زمن احتجاز قدره 4.08 دقيقة، وهو نفس زمن احتجاز المحلول القياسي للسم. وللتأكد من أن هذه القيمة تخص المحلول القياسي، أُعيد حقن المذيب فقط. حيث أنه لم تظهر أي قمة عند نفس زمن الاحتجاز، ولكن القمة عادت للظهور عند إعادة حقن المحلول القياسي، مما يؤكد أن زمن الاحتجاز البالغ 4.08 دقيقة خاص بسم Aflatoxin B1. وتُعد تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (HPLC) من أكثر الطرق دقةً وحساسيةً للكشف عن سموم Aflatoxins وتقدير تركيزاتها في عينات الأغذية الملوثة بالفطريات (Mahfuz et al., 2020).

وبعد حقن رواشح العزلات الفطرية الموضحة في الجدول (4-6)، ظهرت قمم عند نفس زمن الاحتجاز للمادة القياسية، مما يشير إلى وجود سم AFB1 في العزلات المختبرة بناءً على تطابق زمن الاحتجاز في ظل نفس الظروف التحليلية. ولتأكيد هوية المركب، أُضيف 50 µl من السم القياسي إلى العينة المحقونة سابقاً وأُعيد تحليلها. لوحظ ازدياد في مساحة قمة الكروماتوغرافيا للعينة. تُستخدم هذه الطريقة للتحقق من هوية المركبات وتقليل احتمالية التداخل بين المركبات ذات أزمنة الاحتفاظ المتشابهة (Rahmani et al., 2009).

قد تم تسجيل أعلى تركيز لسم AFB1 في راسح عزلة فطر *A. flavus* من عينة عنب مجفف غير معقم، حيث بلغ 215.9ppb. وأُخذت هذه العينة من مركز محافظة الديوانية. بينما، سُجل أدنى تركيز في عينة معزولة من فطر *A. flavus* من عينة تين طازج معقم، حيث بلغ 51.4ppb. تشير هذه النتائج إلى قدرة الفطريات الملوثة للفواكه الطازجة والمجففة على إنتاج الأفلاتوكسينات بدرجات متفاوتة، تبعاً لنوع العينة والظروف البيئية المحيطة.

جدول (4-6) تقدير تراكيز سموم Aflatoxin B1 (AFB1) التي ينتجها الفطر *A. flavus*

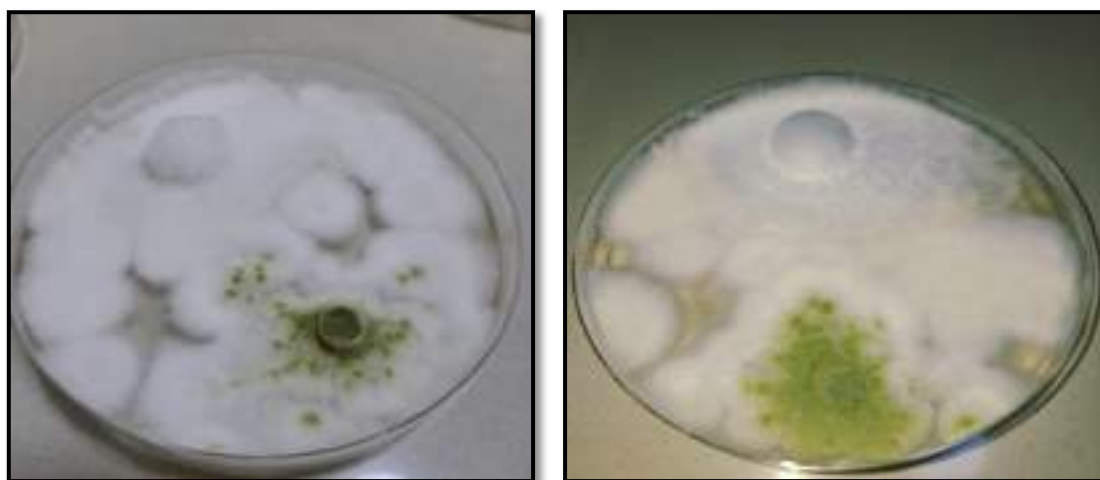
ت	نوع العينة	المصدر	الفطر المعزول	تركيز السم المحسوب (ng/ml) ppb =
1	عنب مجفف غير معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	215.9
2	عنب طازج غير معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	174.9
3	عنب مجفف معقم	الشامية	<i>A. flavus</i>	88.7
4	عنب طازج معقم	عفك	<i>A. flavus</i>	65.7
5	مشمش مجفف غير معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	200.1
6	مشمش طازج غير معقم	الشامية	<i>A. flavus</i>	166.0
7	مشمش مجفف معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	79.8
8	مشمش طازج معقم	الشامية	<i>A. flavus</i>	60.5
9	تين مجفف غير معقم	الشامية	<i>A. flavus</i>	186.9
10	تين طازج غير معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	150.8
11	تين مجفف معقم	عفك	<i>A. flavus</i>	70.6
12	تين طازج معقم	مركز الديوانية	<i>A. flavus</i>	51.4

2-3-4: تأثير فطر *P. ostreatus* على نمو فطر *A. flavus* الملوث باستخدام تقنية التضاد Dual culture على وسط PDA الصلب:

بينت النتائج المخبرية التي بحثت في نشاط فطر *P. ostreatus* ضد الفطر المعزول من العينة التي اعطت اعلى تركيز لسم، بأن له القدرة على تثبيط نمو الفطر السام *A. flavus* بشكل كامل. وقد لوحظ ذلك أيضاً في الوسط الزراعي PDA. وتم حساب درجة التضاد وفقاً لمقياس النقاط الخمس الذي وصفه (Ginterová et al., 1980; Dennis and Webster 1971). حيث كان مقياس التضاد من الدرجة الاولى. ويعود ذلك سبب النشاط المثبط لفطر *P. ostreatus* ضد الفطريات الملوثة

للعينات، إلى عدة عوامل، منها قدرته على النمو والاستعمار السريع، والتنافس على العناصر الغذائية والمساحة كلما زادت مدة الحضانة، وكذلك قدرته على إفراز العديد من الأنزيمات المحللة مثل *glucanases* و *chitinases*. وكما أن له القدرة على إنتاج إنزيمات محللة للكنين مثل *laccase* و *manganese peroxidase*. ويمكن لهذه الأنزيمات أن تؤثر سلباً على جدران الخلايا الفطرية وتساهم في تحلل الأفلاتوكسين B1. وعلاوة على ذلك، يقوم فطر *P. ostreatus* على إفراز مستقلبات نشطة بيولوجياً تثبط إنبات الأبواغ، ونمو الخيوط الفطرية، وتخليق الأفلاتوكسين، مما يعزز فعاليته كعامل مكافحة بيولوجية ضد الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين (Zapaśnik, et al., 2025).

تتفق هذه النتائج مع نتائج (Gao et al., 2025)، الذي أوضح العلاقة التضادية بين فطر *P. ostreatus* والفطر السام *A. flavus*. ويُعزى ذلك إلى قدرة فطر المحاري العالية على تثبيط الفطريات الممرضة من خلال التطفل المباشر على غزل الفطر، وقدرته على إتلاف جدران الخلايا عن طريق إفراز إنزيمات متنوعة أو إنتاج مضادات حيوية. كما يُسهم التنافس على الغذاء والمساحة في هذه القدرة التثبيطية العالية. يوضح الشكل (4-12) كيف يتحكم الفطر المحاري في فطريات *A. flavus*.



شكل (4-12): نمو فطر *P. ostratus* ضد الفطر السام *A. flavus*

4-4: تأثير المعاملات في النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*

1-4-4: تأثير راسح فطر *P. ostreatus* على النمو الشعاعي Radial growth للفطر *A. flavus* على الوسط الصلب PDA:

تُشير النتائج الموضحة في الجدول (4-7) إلى أن المعاملة بمستخلص فطر المحاري بتركيز مختلفة أحدثت فروقاً معنوية. إذ سُجِّل أعلى معدل تثبيط لنمو فطر *A. flavus*، بنسبة 68.3%، في وسط

PDA المحتوي على 30% من مستخلص الفطر المحاري، وبمتوسط قطر مستعمرة يبلغ 2.60 سم. وفي المقابل، بلغ متوسط قطر المستعمرة 4.23 سم مع معدل تثبيط 48.4% عند تركيز 10%. في حين بلغ متوسط قطر المستعمرة 3.47 سم مع معدل تثبيط 57.7% عند تركيز 20%. أما بالنسبة لمتوسط قطر المستعمرات في المجموعة السيطرة فكان 8.20 سم. ونتيجة لذلك يتضح تأثير تراكيز مستخلص الفطر المحاري على النمو الشعاعي للفطريات التي تُلوث الفاكهة الطازجة والمجففة، حيث أنه توجد علاقة طردية بين تركيز مستخلص الفطر المحاري ومعدل التثبيط. بالإضافة إلى ذلك، أن راسح الفطر المحاري، يحتوي كميات من المركبات الفعالة بيولوجياً مثل (المركبات الفينولية والفلافونويدات، وبيتا-جلوكان (Beta-glucan) التي تؤدي إلى تثبيط نمو الفطر الملوث وتوافق النتيجة مع كل من (Hasan and Abdulhadi, 2023; Cilerdzic et al., 2015).

حيث أن تأثير تراكيز راسح الفطر المحاري المختلفة، كانت واضحة على فطر *A. flavus*، الذي كان نموه ضعيفاً بينما كان النمو كثيفاً في معاملة السيطرة. وتتفق نتائج الدراسة مع ما ذكره (Chowdhury et al., 2015) مع أن الفطر المحاري يمتاز باحتوائه على العديد من المضادات الميكروبية ومضادات الأكسدة والمواد البايولوجية الفعالة وكذلك يتميز بسرعة النمو للغزل الفطري على الأوساط الزراعية وهذا ما ذكره (Vamanu, 2012). لذلك يعمل على تثبيط نمو الفطريات الملوثة والمعزولة من الفواكه.

2-4-4: تأثير كربونات الكالسيوم CaCO_3 على النمو الشعاعي للفطر الممرض *A. flavus* على الوسط الصلب PDA

بينت النتائج الموضحة في الجدول (4-7)، لهذه المعاملة والتي تتضمن تأثير فاعلية كربونات الكالسيوم بتراكيزها المختلفة على النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*، بأن هناك فروق معنوية على النمو الشعاعي لفطر *A. flavus* بالقياس مع معاملة المقارنة ويزداد تأثيرها على نمو الفطر الممرض بزيادة التركيز، فقد بلغت أعلى نسبة تثبيط للفطر في للوسط الزرعي PDA الحاوي على تركيز 30% من كربونات الكالسيوم إذ كان معدل أقطار المستعمرات 4.17 سم وبنسبة تثبيط 49.1% ، وفي المقابل كانت أقل نسبة تثبيط في المعاملة ذات التركيز 10% والتي بلغ معدل أقطار المستعمرات فيها 5.13 سم بنسبة تثبيط بلغت 37.4% ، أما بالنسبة لتركيز 20% فقد كان معدل نمو أقطار المستعمرات 4.67 سم و بنسبة تثبيط بلغت 43.0% بالمقارنة مع معدل أقطار المستعمرات في معاملة السيطرة والتي بلغت 8.20 سم. حيث أن إضافة CaCO_3 إلى الوسط الزرعي PDA يؤدي إلى تثبيط نمو بعض الفطريات ومنها فطر *A. flavus*، ويعود السبب في ذلك، إلى تأثير كربونات الكالسيوم على فطر *A. flavus*، حيث تؤدي إلى تغيير درجة حموضة الوسط (pH) وتصبح قلوية. مما يؤدي إلى تثبيط نمو الخيوط

الفطرية وكذلك تأثيرها على سلامة الغشاء الخلوي وهذا ما يتفق مع (Miura et al., 2022) ; (Divya et al., 2023).

3-4-4 : تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم CaCO_3 وراشح الفطر المحاري في النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* على الوسط الصلب PDA

أشارت النتائج المبينة في الجدول (4-7) والتي تتضمن اختبار تأثير التداخل بين CaCO_3 وراشح الفطر المحاري في النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* المعزول من الفواكه الطازجة والمجففة، ووضحت النتائج بأن هناك فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة لراشح فطر *P. ostreatus* وكربونات الكالسيوم، وقد ظهر تأثير كبير في نمو فطر *A. flavus* حيث كانت معدلات أقطار مستعمرات الفطر الملوثة تتناسب تناسب عكسي مع تراكيز راشح الفطر المحاري و CaCO_3 . فبالنتالي، نلاحظ انخفاض معدلات أقطار المستعمرات للفطر *A. flavus* كلما زاد تركيز راشح الفطر المحاري و CaCO_3 ، ويؤدي ذلك إلى ازدياد نسب التثبيط، فكانت نتيجة راشح الفطر المحاري و CaCO_3 معا عالية في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *A. flavus* مقارنة باستعمال كل منهما على حدة في المعاملات المختلفة. إذ بلغ معدل أقطار مستعمرات الفطر *A. flavus* عند تركيز 30% لراشح الفطر المحاري و CaCO_3 ، 2.07 سم وكانت نسبة التثبيط 74.8% ويعد أكثر تأثيراً من كل المعاملات على انفصال، أما عند التركيز 10% فقد بلغ معدل أقطار المستعمرات الفطرية 2.93 سم وبلغت نسبة التثبيط 64.2، بينما كان معدل أقطار المستعمرات عند تركيز 20% قد بلغ 2.30 سم ونسبة تثبيط 72.0% بالمقارنة مع معدل اقطار المستعمرات في معاملة السيطرة 8.20 سم شكل (4-9). لذلك فإن التأثير التآزري بين راشح الفطر المحاري وكربونات الكالسيوم نتيجة الجمع بينهما يؤدي إلى زيادة نسب التثبيط وكذلك يعزز من تقليل نمو الفطريات وإنتاج السموم مقارنة بأستخدام كل عامل على انفراد. وذلك لأن كل منهما يعمل بألية مختلفة ومتكاملة في تثبيط نمو الفطريات المنتجة للسموم. إذ يحتوي راشح الفطر المحاري على مركبات وإنزيمات حيوية تعمل على تحليل جدران الخلايا الفطرية. بينما تعمل كربونات الكالسيوم في تعديل درجة الحموضة (pH) وكذلك تقليل الظروف الملائمة لنمو الفطريات وهذا يتفق مع (Zapaśnik et al., 2025; Das et al., 2015).

جدول (4-7) تأثير راشح الفطر *P. ostreatus* وكربونات الكالسيوم CaCO_3 والتداخل بينهما على النمو الشعاعي لفطر *A. flavus*

Treatment	Concentration mg/ml and percentage dilutions	Mean Radial Growth (cm) $\pm$ SD	Growth Inhibition (%) vs. Control	Statistical Significance (p < 0.05)
<i>P. ostreatus</i> filtrate (1)	10%	4.23 $\pm$ 0.55	48.4%	p < 0.0019
	20%	3.47 $\pm$ 0.15	57.7%	p < 0.0063
	30%	2.60 $\pm$ 0.45	68.3%	p < 0.0041
Calcium Carbonate filtrate (2)	10%	5.13 $\pm$ 0.21	37.4%	p < 0.0078
	20%	4.67 $\pm$ 0.21	43.0%	p < 0.0058
	30%	4.17 $\pm$ 0.25	49.1%	p < 0.0041
Combined Treatment (1+2)	10%	2.93 $\pm$ 0.32	64.2%	p < 0.0047
	20%	2.30 $\pm$ 0.20	72.0%	p < 0.0028
	30%	2.07 $\pm$ 0.25	74.8%	p < 0.0036
Control (Untreated)	-	8.20 $\pm$ 0.00	0%	

4-5: تأثير المعاملات في الوزن الجاف للفطر للفطر *A. flavus*

4-5-1: تأثير راشح الفطر المحاري *P. ostreatus* على الوزن الجاف للفطر *A. flavus* في الوسط السائل PDB:

يوضح الجدول (4-8) نتائج القدرة التنشيطية لراشح الفطر المحاري *P. ostreatus* على الوزن الجاف للفطر الملوث *A. flavus* في الوسط السائل PDB، إذ يلاحظ انخفاض معدلات الوزن الجاف بصورة معنوية عند مقارنتها بمعاملات السيطرة. حيث يتراوح معدل الوزن الجاف للفطر الملوث في الوسط السائل PDB بتركيز 30% حوالي 1.08 غم بنسبة تثبيط بلغت 66.0%، وكان معدل الوزن الجاف للفطر الملوث في تركيز 10% حوالي 1.50 غم وبنسبة تثبيط بلغت 52.8%. أما بالنسبة لتركيز 20% فكان معدل وزن النمو الفطري حوالي 1.33 غم، بنسبة تثبيط 58.2%، بالمقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت معدلات الوزن فيها 3.18 غم، يتبين من هذا الاختبارات أن

راشح الفطر المحاري لديه تأثير تثبيطي على نمو الفطر الملوث للعينات على الأوساط السائلة والصلبة، وذلك لإحتواء راشح الفطر المحاري *P. ostreatus* على مركبات حيوية فعالة كالأنزيمات المحللة لجدار الخلية الفطرية والفينولات، والتي تؤثر على نمو الفطر الملوث وكذلك على قدرته على إنتاج السموم الفطرية وهذا يتفق مع (Hussien & Saadon, 2022).

4-5-2: تأثير كربونات الكالسيوم CaCO_3 على الوزن الجاف لفطر *A. flavus* الملوث في الوسط السائل PDB:

تبين النتائج الموضحة في الجدول (4-8) وجود فروق معنوية في معاملة كربونات الكالسيوم CaCO_3 ، حيث ظهرت أعلى نسبة تثبيط للفطر الملوث *A. flavus*، في الوسط السائل عند التركيز 30% من CaCO_3 إذ بلغ معدل أوزان المستعمرات الفطرية 1.63غم، أي بنسبة تثبيط 48.7%، بينما كانت أقل نسبة تثبيط لنمو في التركيز 10%، حيث بلغ معدل أوزان المستعمرات الفطرية حوالي 1.87غم، أي بنسبة تثبيط 41.2%، وأما بالنسبة لتركيز 20%، فكانت معدل أوزان المستعمرات الفطرية 1.70غم، أي بنسبة تثبيط بلغت 46.5%، بالمقارنة مع معدل أوزان المستعمرات في معاملة السيطرة 3.18غم. حيث تعمل كربونات الكالسيوم على رفع درجة حموضة الوسط (pH)، ويؤدي ذلك إلى تحييد الأحماض العضوية التي ينتجها الفطر أثناء النمو الايضى، مما يؤدي إلى تغيير البيئة المثالية لتكون الفطريات. بالإضافة إلى ذلك أن استخدام المركبات القلوية كوسيلة لمنع تكاثر الفطريات وعملياتها التكاثرية يُسهم في تثبيط نمو وإنتاج أبواغ فطر *A. flavus*، التي تؤثر على المواد الملوثة بها وهذا يتفق مع (Divya et al., 2023 ;Liu, He, and Li 2023)

4-5-3: تأثير التداخل بين كربونات الكالسيوم CaCO_3 وراشح الفطر المحاري *P. ostreatus* في الوزن الجاف للفطر *A. flavus* في الوسط السائل PDB:

أوضحت النتائج المختبرية والمبينة في الجدول (4-8) تأثير التداخل بين راشح الفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 على النمو الشعاعي للفطر الملوث *A. flavus*، حيث بينت النتائج أن التداخل بينهما كان أكثر فاعلية في التأثير على تثبيط النمو الفطري، بالمقارنة مع تأثير كل منهما بشكل منفرد. وكذلك يزداد تأثير التثبيط بزيادة التركيز. حيث بلغت أعلى نسبة تثبيط 70.8% في تركيز 30% للفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 ، وكان معدل الوزن الجاف للفطر الملوث 0.93غم. أما بالنسبة لتركيز 10%، فقد بلغ معدل الوزن الجاف للفطر الملوث 1.10غم، وبنسبة تثبيط بلغت 65.4%. وبينما في التركيز 20% بلغ معدل الوزن الجاف لمستعمرات الفطر الملوث حوالي 1.02غم وبنسبة تثبيط بلغت 67.9%. بالمقارنة مع معدل أوزان المستعمرات في معاملة السيطرة والتي بلغت حوالي 3.18غم. ومن الجدير بالذكر أن نسبة التثبيط في معاملات التداخل في الجدولين (4-7)، (4-8)

أظهرت أعلى نسب تثبيط من بين المعاملات الأخرى، أما فيما يخص تأثير الفطر المحاري فقد أثبت مختبرياً، بأن له قدره على تثبيط النمو الفطري في المعاملات بالتخفيف المختلفة في الأوساط الصلبة والسائلة، أعلى من المعاملات الكيميائية المماثلة CaCO_3 وبذلك تتفق مع (Alheeti *et al.*, 2013).

جدول (4-8) تأثير راشح الفطر *P.ostreatus* وكربونات الكالسيوم CaCO_3 وتداخلهما على الوزن الجاف للفطر الملوث *A. flavus* في الوسط السائل PDB:

Treatment	Concentration mg/ml and percentage dilutions	Mean Mycelial Weight (g) ± SD	Growth Inhibition (%) vs. Control	Statistical Significance (p < 0.05)
<i>P. ostreatus</i> Filtrate	10%	1.50 ± 0.30	52.8%	p < 0.0033
	20%	1.33 ± 0.15	58.2%	p < 0.0035
	30%	1.08 ± 0.13	66.0%	p < 0.0048
Calcium Carbonate (CaCO_3)	10%	1.87 ± 0.15	41.2%	p < 0.0051
	20%	1.70 ± 0.10	46.5%	p < 0.0038
	30%	1.63 ± 0.15	48.7%	p < 0.0011
Combined Treatment	10%	1.10 ± 0.10	65.4%	p < 0.0031
	20%	1.02 ± 0.08	67.9%	p < 0.0019
	30%	0.93 ± 0.02	70.8%	p < 0.0028
Control (Untreated)	-	3.18 ± 0.00	0%	

4-6: دراسة تأثير سم Aflatoxin B1 داخل جسم الكائن الحي

4-6-1: قياس تغيرات أوزان الجسم في الفئران البيضاء المختبرية خلال فترة المعاملة:

أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-9) اختلافاتٍ معنوية بين المجموعات التجريبية خلال فترة الدراسة. وكشف التحليل الإحصائي عن تأثيرات بالغة الدلالة للوقت، ومجموعة المعاملة وتداخل بينهما ($p < 0.0001$)، مما يشير إلى أن التغيرات الملحوظة في وزن الجسم كانت مرتبطة ارتباطاً مباشراً بالتسمم بالأفلاتوكسين B1 والتدخلات الوقائية المُعطاة.

أظهرت المجموعة السيطرة زيادةً تدريجية طبيعية في وزن الجسم من 25.0 غم إلى 27.7 غم، أي بزيادة قدرها 10.8%. كذلك، أظهرت مجموعة مستخلص الفطر الحيوي (*P. ostreatus*) زيادةً مماثلة (10.4%)، دون وجود أي فرقٍ ذو دلالة إحصائية عن المجموعة السيطرة. تشير هذه النتيجة إلى أن مستخلص الفطر *P. ostreatus* لم يحدث آثاراً ضارة على نمو الفئران المختبرية، بالإضافة إلى ذلك فإنه يمتلك فوائد غذائية وفسيولوجية تدعم عملية التمثيل الغذائي الطبيعية كما تتوافق النتيجة مع (Zhao et al., 2024).

على العكس من ذلك، أظهرت الفئران التي تعرضت للأفلاتوكسين B1 وحده انخفاضاً ملحوظاً في وزن الجسم، حيث انخفض من 25.0 غم إلى 21.9 غم، أي ما يعادل خسارة قدرها 12.4%. وتتفق هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي تُبين أن الأفلاتوكسين B1 يُضعف بشكل كبير عملية النمو وزيادة وزن الجسم في الحيوانات المختبرية. ويرجع سبب انخفاض أوزان أجسام الفئران إلى أن الأفلاتوكسين B1 يسبب تسمماً كبدياً، مما يؤثر سلباً على تخليق البروتين الكبدي واستقلاب العناصر الغذائية. وكذلك، يؤدي الإجهاد التأكسدي الناتج عن الأفلاتوكسين B1 إلى خلل في وظائف الميتوكوندريا وانخفاض إنتاج الطاقة الخلوية. بالإضافة إلى ذلك، إن التعرض للأفلاتوكسين يقلل من استهلاك العلف بسبب فقدان الشهية واضطرابات الجهاز الهضمي، مما يُقلل من توافر العناصر الغذائية اللازمة للنمو وبهذا تتفق النتيجة مع (Moloi et al., 2024).

كما أظهرت المجموعة التي جرعت بالأفلاتوكسين B1 بالإضافة إلى راشح الفطر *P. ostreatus* تعافياً جزئياً في أوزان جسم الفئران، حيث حققت زيادة نهائية قدرها 1.2% مقارنةً بفقدان الوزن الملحوظ في مجموعة الأفلاتوكسين B1. ويُعزى هذا التحسن إلى وجود مركبات نشطة بيولوجياً في الفطر المحاري، بما في ذلك بيتا جلوكان، والمركبات الفينولية، والسكريات المتعددة، والفلافونويدات، والأنزيمات المضادة للأكسدة. حيث أن هذه المركبات تمتلك خصائص قوية مضادة للأكسدة، مما يقلل من الإجهاد التأكسدي ويحد من تلف الأنسجة الناجم عن السموم. بالإضافة إلى ذلك، قد يُعزز

بيتاجلوكان وظيفة المناعة ويُحسّن من استخدام العناصر الغذائية، وبالتالي يدعم استعادة النمو وتتفق النتيجة مع (Rafai et al., 2025).

بينما أظهرت المجموعة المعاملة بـ AFB1 و CaCO_3 تحسناً مقارنةً بالمجموعة المعاملة بالسم، على الرغم من أن أوزان جسم الفئران المختبرية ظل أقل من القيمة الأولية 3.6-%. حيث أن كربونات الكالسيوم تعمل على التقليل من سمية الأفلاتوكسين من خلال آليات الامتصاص في الجهاز الهضمي، مما يُقلل من امتصاص السم والتعرض الجهازى له. مما يؤدي إلى انخفاض آثاره الضارة على الكبد والكلى. وبالتالي، استعادة جزئية لأداء نمو الجسم، وبهذا تتفق النتيجة مع (Lima et al., 2024).

بينما بالنسبة للمجموعة المعاملة بـ AFB1 وراشح الفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 ، والتي جرعت الحيوانات فيها بكل من راشح الفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 . أظهرت هذه المجموعة زيادة كبيرة في وزن الجسم (6.8%+)، مقارنةً بالمجموعة المسيطرة. حيث تُشير الفعالية الفائقة للعلاج المركب إلى وجود تفاعل تآزري بين العاملين. من المرجح أن كربونات الكالسيوم قللت من امتصاص الأفلاتوكسين B1 في الأمعاء، بينما عزز راشح الفطر المحاري الدفاعات المضادة للأكسدة وحفزت ترميم الأنسجة. ونتيجة لذلك، وفرت العاملة المركبة تأثيرات وقائية وعلاجية، مما أدى إلى حماية أكبر ضد تثبيط النمو الناجم عن الأفلاتوكسين.

جدول (4-9): يوضح تأثير سم Aflatoxin B1 في أوزان الفئران البيضاء

معدل الأوزان (غم) $\pm$ الخطأ القياسي					المعاملات	المجاميع
نسبة التغير %	التغير في الأوزان	قبل التضحية	بعد عشرة أيام من التجريع	قبل بداية التجريع		
+10.8%	$+2.7 \pm 0.3$	27.7 ± 0.3	26.3 ± 0.3	25.0 ± 0.3	مجموعة السيطرة	المجموعة الأولى
-12.4%	-3.1 ± 0.5	21.9 ± 0.5	23.4 ± 0.4	25.0 ± 0.2	راشح فطر <i>A. flavus</i>	المجموعة الثانية
+10.4%	$+2.6 \pm 0.3$	27.6 ± 0.3	26.2 ± 0.3	25.0 ± 0.2	فقط <i>P. ostreatus</i> راشح الفطر	المجموعة الثالثة
+1.2%	$+0.3 \pm 0.3$	25.4 ± 0.3	24.6 ± 0.3	25.1 ± 0.2	راشح الفطر <i>A. flavus</i> + راشح الفطر <i>P. ostreatus</i>	المجموعة الرابعة
-3.6%	-0.9 ± 0.3	24.1 ± 0.3	23.9 ± 0.2	25.0 ± 0.2	+ <i>A. flavus</i> راشح فطر CaCO_3	المجموعة الخامسة
+6.8%	$+1.7 \pm 0.3$	26.7 ± 0.3	25.3 ± 0.3	25.0 ± 0.2	راشح الفطر + <i>A. flavus</i> + راشح لفطر <i>P. ostreatus</i> + CaCO_3	المجموعة السادسة

2-6-4: فحوصات الدم الكيموحياتية

4-2-6-1: تقدير فعالية إنزيمات الكبد ALT, AST, ALP

تُظهر البيانات الإحصائية المعروضة في الجدول (4-10) تأثير راشح الفطر السام والمتمثل بالسم الفطري AFB1 في رفع مستويات إنزيمات الكبد (ALT, AST, ALP) في مصل دم الفئران البيضاء، مقارنةً بالمجموعة السيطرة، مما يؤكد تلف الكبد الحاد الناتج عن السم. ففي مجموعة AFB1 وحدها، ارتفعت مستويات إنزيمات الكبد إلى U/L (152.7، 194.4، 281.3) على التوالي، مقارنةً في المجموعة السيطرة إذ بلغ مستوى الأنزيمات U/L (34.9، 85.6، 120.8)، ويلاحظ من ذلك وجود فروق معنوية في المجموعة التي جرعت بالسم مع المجموعة السيطرة، وأن سبب الإرتفاع في مستويات الأنزيمات يعود إلى تأثير السموم الفطرية في خلايا وأنسجة الكبد إذ أحدثت تحلل في خلايا الكبد التي تحتوي على هذه الأنزيمات، وأدت إلى تحررها في الدم وأرتفاع مستواها في مصل الدم، مما ينتج نخرًا في خلايا الكبد، كما يشير ارتفاع مستويات الأنزيمات إلى تلف خلوي شديد قد يترافق مع تأثيرات على الميتوكوندريا (Giannini et al., 2005).

أما بالنسبة لمجموعة التي جرعت براشح الفطر المحاري *P. ostreatus* وحده، فلم تُظهر أي فروقاً معنوية ذات دلالة إحصائية بالمقارنة مع المجموعة السيطرة. حيث كانت مستويات الأنزيمات الكبد (33.4، 83.0، 116.4) U/L على التوالي، مما يشير إلى أن راشح الفطر *P. ostreatus* لا يسبب تلفاً للكبد في الظروف الطبيعية، بل يكون آمناً. وتتوافق هذه النتيجة مع دراسات حديثة تُشير إلى أن بعض سلالات البروبيوتيك والفطريات المفيدة لا ترفع مستويات إنزيمات الكبد، بل قد تحسّن وظائف الكبد (Zhu et al., 2019).

أما بالنسبة للمجموعة التي جرعت بسم الأفلاتوكسين B1 وراشح الفطر *P. ostreatus*، فقد لوحظ انخفاض ملحوظ في جميع مستويات الأنزيمات مقارنةً بمجموعة الأفلاتوكسين B1 وحدها، حيث كانت مستويات الأنزيمات U/L (76.6، 111.6، 175.9) على التوالي. مما يشير هذا إلى التأثير الوقائي الجزئي لراشح الفطر الحيوي *P. ostreatus* ضد سمية الأفلاتوكسين B1، والذي يُرجع إلى قدرته على تحليل السم في الأمعاء، أو تقليل امتصاصه (Zapaśnik et al., 2025).

كما أظهرت المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 و CaCO_3 تحسناً طفيفاً، وإن كان بدرجة أقل من المجموعة المعاملة بالفطر الحيوي *P. ostreatus* حيث كانت المستويات U/L (133.5، 206.3، 93.7) على التوالي، مما يعكس دور كربونات الكالسيوم في تقليل السمية الخلوية عن طريق تثبيت

أغشية الخلايا وتقليل الإجهاد التأكسدي، ولكنه لا يصل إلى فعالية الفطريات الحيوية وحدها. وتتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة تشير إلى أن كربونات الكالسيوم يخفف من سمية الأفلاتوكسين B1 عن طريق تعديل مسارات الاستماتة الخلوية (Mughal *et al.*, 2016).

كما لوحظ أن أقوى تأثير وقائي في المجموعة المعاملة بـ AFB1+Both (كربونات الكالسيوم + الفطر الحيوي *P. ostreatus*)، حيث انخفض مستويات الأنزيمات U/L (61.9، 98.5، 153.7) على التوالي، وهي قيم قريبة من قيم المجموعة السيطرة. ويشير هذا إلى وجود تأثير تآزري بين كربونات الكالسيوم والفطريات الحيوية في الحماية من سموم AFB1، وربما من خلال آليات تشمل التحلل الحيوي للسموم، وتقليل الامتصاص، والنشاط المضاد للأكسدة، واستقرار غشاء الخلية، وتعزيز إفراز الصفراء (Guerre, 2020).

جدول (10-4) تأثير سم Aflatoxin B1 في معدل مستويات إنزيمات الكبد في مصل دم الفئران البيضاء المختبرية

المجاميع	المعاملات	ALT U/L	AST U/L	ALP U/L
المجموعة الأولى	السيطرة	34.9 ± 2.4	85.6±3.8	120.8±7.6
المجموعة الثانية	راشح فطر <i>A. flavus</i>	152.7 ± 10.2	194.4±10.5	281.3±17.4
المجموعة الثالثة	راشح الفطر المحاري <i>P. ostreatus</i> فقط	33.4 ± 2.1	83.0±3.6	116.4±6.9
المجموعة الرابعة	راشح فطر <i>A. flavus</i> + راشح فطر <i>P. ostreatus</i>	76.6 ± 5.7	111.6±7.4	175.9±12.5
المجموعة الخامسة	راشح الفطر <i>A. flavus</i> + CaCO ₃	93.7 ± 6.8	133.5±9.1	206.3±14.8
المجموعة السادسة	راشح الفطر <i>A. flavus</i> + راشح الفطر <i>P. ostreatus</i> + CaCO ₃	61.9 ± 4.7	98.5±7.2	153.7±10.9
	LSD	p < 0.0028	p < 0.0034	p < 0.0047

4-2-6-2: تقدير مستويات الكرياتينين واليوريا والبروتين الكلي والبيليروبين في دم الفئران البيضاء المختبرية:

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (4-11) أن التعرض للأفلاتوكسين B1 يُضعف وظائف الكلى بشكل ملحوظ، كما يتضح من الإرتفاعات الكبيرة في مستويات الكرياتينين واليوريا في الدم، مصحوبة بانخفاض في البروتين الكلي وارتفاع في مستويات البيليروبين. وتبين هذه النتائج التأثير الثابت للأفلاتوكسين B1 كعامل سام للكلى، وهي خاصية موثقة في العديد من الأنواع والظروف التجريبية. وأكدت التحليلات الإحصائية وجود فروق دالة إحصائية بين المجموعات لجميع المؤشرات الحيوية.

4-2-6-2-1- مؤشر وظائف الكلى وتشمل الكرياتينين واليوريا والبروتين الكلي والبيليروبين

أظهرت النتائج في الجدول (4-11) أن تعرض الفئران البيضاء لسم AFB1 (المجموعة الثانية) أدى إلى تدهور حاد في وظائف الكلى، وتمثل في ارتفاع ملحوظ في الكرياتينين 0.88 mg/dL مقارنة بالمجموعة السيطرة 0.41 mg/dL ، وكذلك ارتفاع اليوريا 72.1 mg/dL مقابل 38.8 mg/dL في المجموعة السيطرة. هذه المؤشرات تعكس انخفاضاً حاداً في معدل الترشيح الكبيبي Glomerular Filtration Rate (GFR) وخللاً في الأنابيب الكلوية، وهو يتماثل مع الطبيعة السمية لسم AFB1، وتأثيراتها المعروفة على الكلى. وتتوافق هذه النتائج مع دراسة (Ismail et al., 2024) التي أظهرت أن AFB1 يحفز الإجهاد التأكسدي وموت الخلايا المبرمج في الخلايا النيبية القريبة، مما يؤدي إلى تراكم الفضلات النيتروجينية في الدم. وهذه النتائج توافق إلى ما توصل إليه (Ashi et al., 2024).

بالإضافة إلى ذلك، سجلت المجموعة الثانية والمعرضة لـ AFB1 انخفاضاً في البروتين الكلي 4.9 mg/dL مقابل المجموعة السيطرة 6.8 g/dL ، وارتفاعاً حاداً في البيليروبين 1.24 mg/dL بالمقارنة مع المجموعة السيطرة $0.30 \pm \text{mg/dL}$. حيث ينخفض البروتين الكلي نتيجة تثبيط تصنيع البروتينات في الكبد بسبب السمية الكبدية للأفلاتوكسين B1، إضافة إلى فقدان البروتين عبر البول بسبب الضرر الكلوي. وقد بينت الدراسات أن AFB1 يُحدث تغيرات وظيفية ونسجية في الكلية، خاصة في النيبات القريبة (Proximal Tubules)، مما يؤدي إلى اضطراب إعادة امتصاص البروتينات وزيادة طرحها، وبالتالي انخفاض تركيز البروتينات المصلية وتتوافق النتيجة مع (Ghallab et al., 2021).

أما ارتفاع البيليروبين فهو يعكس غالباً إصابة كبدية مصاحبة (لأن AFB1 سم كبدي بشكل أساسي)، ولكن الكلى المتضررة تسهم أيضاً في تقليل تصفية البيليروبين المرتبط بالألبومين، مما يفسر الإرتفاع الشديد في المجموعة المعرضة للسم وحده.

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (4-11) أن الأفلاتوكسين B1 وحده يزيد بشكل ملحوظ من مستويات الكرياتينين واليوريا في الدم، بينما يُقلل من البروتين الكلي ويرفع مستوى البيليروبين، مما يدل على إصابة الكلى. تتوافق هذه النتائج مع (Li et al., 2018) التي تشير إلى أن الأفلاتوكسين B1 يُسبب سمية الكلى من خلال الإجهاد التأكسدي وتلف الأنابيب الكلوية.

وأما بالنسبة للمجموعة الثالثة المعاملة براشح الفطر *P. ostreatus* فقط أعطت نتائج مقارنة من المجموعة السيطرة، حيث كانت مستوى الكرياتينين 0.39 mg/dL، ومستوى اليوريا 37.8 mg/dL، وكذلك بالنسبة لمستويات البروتين الكلي 7.0 mg/dL، ومستوى البيليروبين 0.29 mg/dL، مما يؤكد أن راشح الفطر الحيوية آمن على الكلى ولا يسبب سمية ذاتية. وهذا قد يعود إلى أن راشح الفطر *P. ostreatus* يعمل بصورة موضعية داخل الجهاز الهضمي، حيث يقلل من امتصاص السموم الفطرية أو يرتبط بها، دون امتصاصه بشكل ملحوظ إلى الدورة الدموية وتتفق النتيجة مع (Zapaśnik et al., 2025).

تجدر الإشارة إلى أن المعاملة بالفطر الحيوي وحده (بدون الأفلاتوكسين B1) أعطى مستويات ومؤشرات حيوية مماثلة لمجموعة السيطرة، مما يشير إلى أنه لا يؤثر سلباً على وظائف الكلى

أما بالنسبة للمجموعة الرابعة المعاملة بـ AFB1 + *P. ostreatus*، حيث يلاحظ تحسن في المؤشرات بوضوح. إذ كانت مستويات الكرياتينين 0.56 mg/dL واليوريا 49.1 mg/dL أقل بكثير من المجموعة المعاملة بـ AFB1 فقط، وكذلك كانت مستويات البروتين الكلي 6.0 mg/dL، ومستوى البيليروبين 0.62 mg/dL. مما يشير إلى حماية جزئية. يُعزى هذا التأثير الوقائي إلى امتصاص السموم الفطرية أو تعزيز مسارات إزالة السموم وتتفق النتائج مع (Zapaśnik et al., 2025).

أما بالنسبة للمجموعة الخامسة مجموعة AFB1 + Calcium Carbonate، أظهرت تحسناً لكن أقل من مجموعة الفطر *P. ostreatus*، حيث بلغ مستوى الكرياتينين 0.66 mg/dL ومستوى اليوريا 58.0 mg/dL. وكانت مستويات البروتين الكلي والبيليروبين 5.5 mg/dL، و 0.80 mg/dL على التوالي. وذلك لأن كربونات الكالسيوم قد تعمل على تقليل سمية AFB1 عبر تقليل امتصاصه في الأمعاء أو عبر تثبيت أغشية الخلايا الكلوية. وتتفق نتائج الدراسة مع (Al-Habib et al., 2007)، حيث لوحظ انخفاض في المؤشرات مقارنةً بالمجموعة الثانية، وإن كان بدرجة أقل من الفطريات الحيوية.

بالنسبة للمجموعة السادسة مجموعة (*P. ostreatus* + CaCO₃ + AFB1) حيث لوحظ تحسن في مستويات كل من الكرياتينين 0.49 mg/dL ونسبة اليوريا 44.2 mg/dL، والبروتين الكلي mg/dL

6.3 والبيليروبين 0.48 mg/dL، حيث كانت النتائج مقارنة جداً للمجموعة السيطرة. هذا يدل على تأثير تآزري Synergistic. ويرجع السبب في ذلك ان راشح الفطر *P. ostreatus* يعمل على إزالة السم ميكانيكياً، بينما كربونات الكالسيوم تعمل على تعزيز مقاومة الخلايا الكلوية وتقليل الإجهاد التأكسدي.

قد لوحظ التحسن الأبرز في هذه المجموعة، حيث اقتربت المستويات من القيم الطبيعية، مما يشير إلى التأثير الوقائي التآزري. وبالمثل، كانت مستويات البروتين الكلي والبيليروبين أقرب ما يكون إلى المعدل الطبيعي في المجموعة المركبة وتتفق النتائج مع (Ahmed et al., 2020).

جدول (4-11) تأثير سم Aflatoxin B1 في معدل مستويات اليوريا والكرياتينين والبروتين الكلي والبيليروبين في دم الفئران البيضاء المختبرية

المجاميع	المعاملات	الكرياتينين mg/dL	اليوريا mg/dL	البروتين الكلي g/dL	البيليروبين mg/dL
المجموعة الأولى	مجموعة السيطرة	0.41±0.03	38.8±1.9	6.8±0.2	0.30±0.02
المجموعة الثانية	راشح فطر <i>A. flavus</i>	0.88±0.04	72.1±4.3	4.9±0.3	1.24±0.09
المجموعة الثالثة	راشح الفطر المحاري فقط <i>P. ostreatus</i>	0.39±0.03	37.8±2.0	7.0±0.2	0.29±0.02
المجموعة الرابعة	راشح فطر <i>A. flavus</i> + راشح فطر <i>P. ostreatus</i>	0.56±0.04	49.1±3.5	6.0±0.3	0.62±0.05
المجموعة الخامسة	راشح الفطر <i>A. flavus</i> + CaCO ₃	0.66±0.05	58.0±4.2	5.5±0.3	0.80±0.07
المجموعة السادسة	راشح الفطر <i>A. flavus</i> + راشح الفطر + <i>P. ostreatus</i> CaCO ₃	0.49±0.04	44.2±3.1	6.3±0.3	0.48±0.04
P-value					
		p < 0.0019	p<0.0028	p < 0.0023	p < 0.0039

4-6-3: نتائج دراسة التغيرات النسيجية :

4-6-3-1: تأثير راشح الفطر السام *A. flavus* في بعض أعضاء الفئران البيضاء المختبرية:

1- الكبد Liver

أظهرت نتائج الفحص المجهرى للأنسجة المأخوذة من كبد المجموعة السيطرة للفئران البيضاء المختبرية، عدم وجود أي تغيرات مرضية ولوحظت الخلايا الكبدية على شكل حبال منظمة جيداً تشع من الوريد المركزي وتفصلها جيوب كبدية منتظمة كما في الشكل (4-13). وتتوافق هذه النتائج مع البنية المجهرية المميزة لأنسجة الكبد السليمة التي تم الإبلاغ عنها في دراسات (Pawlina and Ross, 2018)، ونؤكد أن الحيوانات التجريبية حافظت على وظائفها الفسيولوجية والكبدية الطبيعية في ظل الظروف القياسية.

بينما كشف الفحص المجهرى لشرائح أنسجة الكبد في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 (AFB1) الشكل (4-14)، عن تغيرات حادة في بنية خلايا الكبد الطبيعية، بما في ذلك فقدان الترتيب المميز للخلايا الكبدية في الحبال، واضطراب الجيوب الكبدية، وتشوه التنظيم الشعاعي المحيط بالوريد المركزي. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ احتقان دموي، ونخر في الخلايا الكبدية في بعض المناطق، وارتشاحاً طفيفاً للخلايا للمفاوية في المنطقة البابية. والذي يشير إلى استجابة التهابية تؤدي إلى تلف الأنسجة الناجم عن السم. علاوة على ذلك، قد ينتج احتقان الأوعية الدموية عن ضعف تدفق الدم الكبدى وتلف بطانة الأوعية الدموية الناجم عن الإجهاد التأكسدي، مما يزيد من تفاقم نقص الأكسجة في الأنسجة وتدهور الخلايا. ويرجع سبب هذه التغيرات المرضية إلى التحول الحيوي للأفلاتوكسين B1 إلى aflatoxin B1-8,9- epoxide شديد التفاعل بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450 الكبدية. ويحفز هذا المستقلب إنتاجاً مفرطاً لأنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS)، مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي، وببروكسدة الدهون، وتلف غشاء الخلية، وفي النهاية، موت خلايا الكبد. وتتوافق نتائج الدراسة، مع دراسات مماثلة في سمية الأفلاتوكسين B1، مما يؤكد أن الكبد هو العضو المستهدف الرئيسي المتأثر بهذا السم الفطري (Yassein and Zghair, 2012; Rushing and Selim, 2019).

كذلك تتفق هذه النتائج مع نتائج (Dohnal et al., 2014) والتي تصف التهاب الكبد والنخر واضطرابات الدورة الدموية بعد التعرض لـ AFB1، مما يسلط الضوء على الدور الحاسم للضرر التأكسدي والالتهاب في التسبب في سمية الكبد الناجمة عن الأفلاتوكسين (Rawal et al., 2010).

أما بالنسبة للمجموعة التي جرعت براشح الفطر *P. ostreatus* فقط. فقد أظهر الفحص المجهرى لأنسجة الكبد نمطاً بنوياً طبيعياً تماماً، يتميز بخلايا كبدية منظمة في حبال متميزة تشع من الوريد

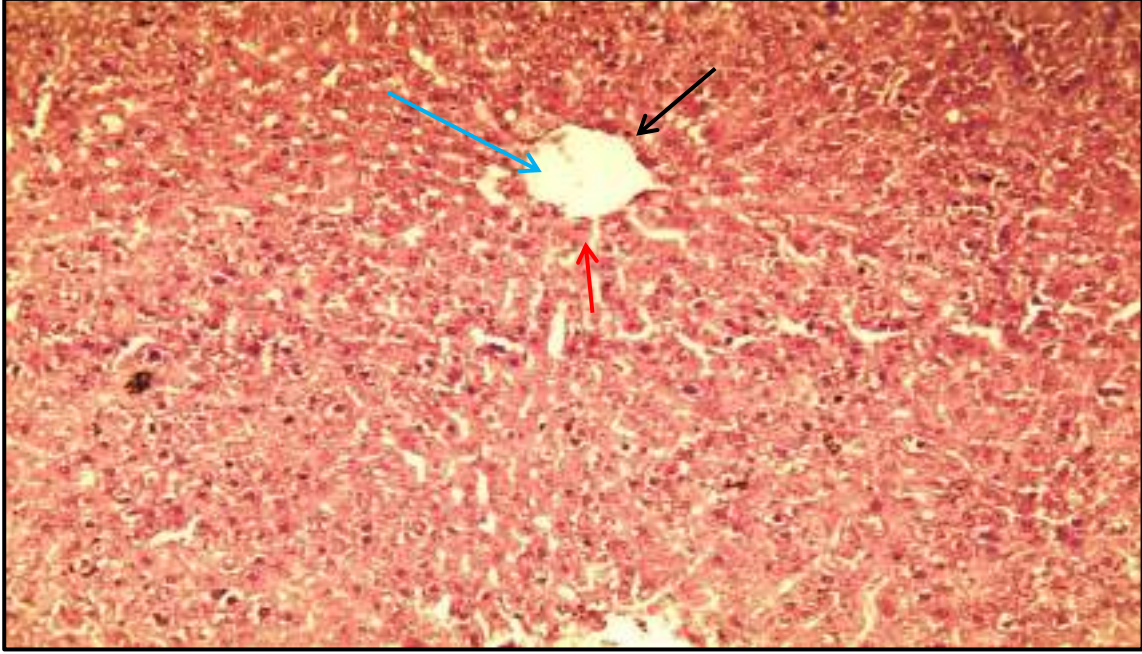
المركزي، مع جيوب كبدية سليمة تفصل بين هذه الحبال كما في الشكل (4-15). حيث أن المركبات الحيوية المستخلصة من الفطريات قد تُظهر خصائص وقائية للكبد بدلاً من الخصائص السامة لها في ظل ظروف معينة (Venmathi et al., 2022). وأظهرت الدراسات أن مستخلصات الفطريات الطبية تحافظ على بنية خلايا الكبد عن طريق تقليل الإجهاد التأكسدي والحفاظ على سلامة البطانة الجيبية. بالإضافة إلى ذلك، فإن الجرعات المنخفضة من المستخلصات الفطرية لم تسبب سمية كبدية. لذلك، تتوافق النتائج الحالية مع مجموعة متزايدة من الأدلة التي تشير إلى أن الجرعات التي يتحملها الجسم من العوامل الحيوية كالرواشح الفطرية لا تؤثر سلباً على نسيج الكبد (Sadowska et al., 2026).

بالنسبة للمجموعة المجرعة بالأفلاتوكسين B1 وفطر المحاري *P. ostreatus*، أظهر الفحص المجهرى عن تحسن ملحوظ في بنية الكبد مقارنةً بمجموعة المجرعة بـ Aflatoxin B1. ومع ذلك، ظلت تغيرات نخرية بسيطة في خلايا الكبد قابلة للملاحظة في مناطق متفرقة، واستمر ارتشاح طفيف للخلايا اللمفاوية في منطقة البوابة الكبدية الشكل (4-16). وتتوافق هذه النتائج مع (Jackson III and Pryor, 2017) حول الإمكانات الوقائية لرواشح الفطر الحيوي، ويُعزى ذلك على الأرجح إلى المركبات النشطة بيولوجياً والتي تقلل من الإجهاد التأكسدي وتعديل الاستجابات المناعية.

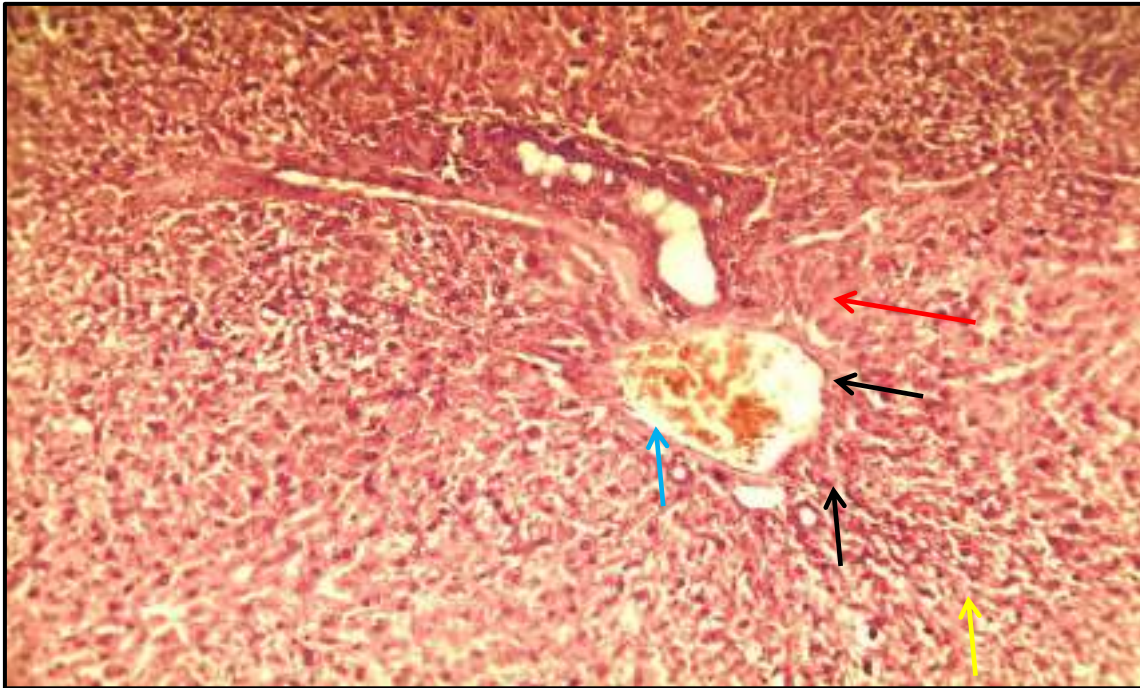
بينما في المجموعة التي جرعت بـ Aflatoxin B1 مع CaCO_3 ، أظهر الفحص المجهرى لأنسجة حفاظاً جزئياً على بنية الكبد. ومع ذلك، لوحظ احتقان وعائي طفيف، إلى جانب تغيرات نخرية موضعية طفيفة في الخلايا الكبدية الشكل (4-17). ويُعتقد أن CaCO_3 لها تأثيرات وقائية كيميائية من خلال ربط الأفلاتوكسينات في الجهاز الهضمي أو تعديل الإجهاد التأكسدي، على الرغم من أن فعاليتها تبدو معتدلة مقارنة بالتدخلات مستخلصات الفطريات الحيوية الأخرى (El-Nekeety et al., 2015; Abdel-Wahhab et al., 2017).

أما بالنسبة للمجموعة المجرعة بالأفلاتوكسين B1 وفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 ، أظهر الفحص المجهرى لأنسجة الكبد بنيةً سليمةً للحبل الكبدى، حيث تشع الخلايا الكبدية من الوريد المركزي وتفصلها الجيوب الكبدية، مما يشير إلى الحفاظ على التنظيم الفسيوي. ومع ذلك، لوحظ احتقان وعائي وتغيرات نخرية طفيفة في الخلايا الكبدية في عدة مناطق، مصحوبةً بتسلل طفيف للخلايا اللمفاوية في منطقة البوابة الشكل (4-18). وتشير هذه النتيجة إلى أن الإعطاء المتزامن لفطر المحاري و كربونات الكالسيوم لها تأثيراً وقائياً تآزرياً ضد السمية الناجمة عن AFB1، فهما يُخففان من تلف الكبد، ويُثبطان الإجهاد التأكسدي، ويُعكسان التغيرات النسيجية المرضية الضارة في أنسجة أكباد الفئران المخبرية. وتتفق نتائج الدراسة مع الدراسات الأخرى والتي تبين أن كلا المعاملتين تمتلكان

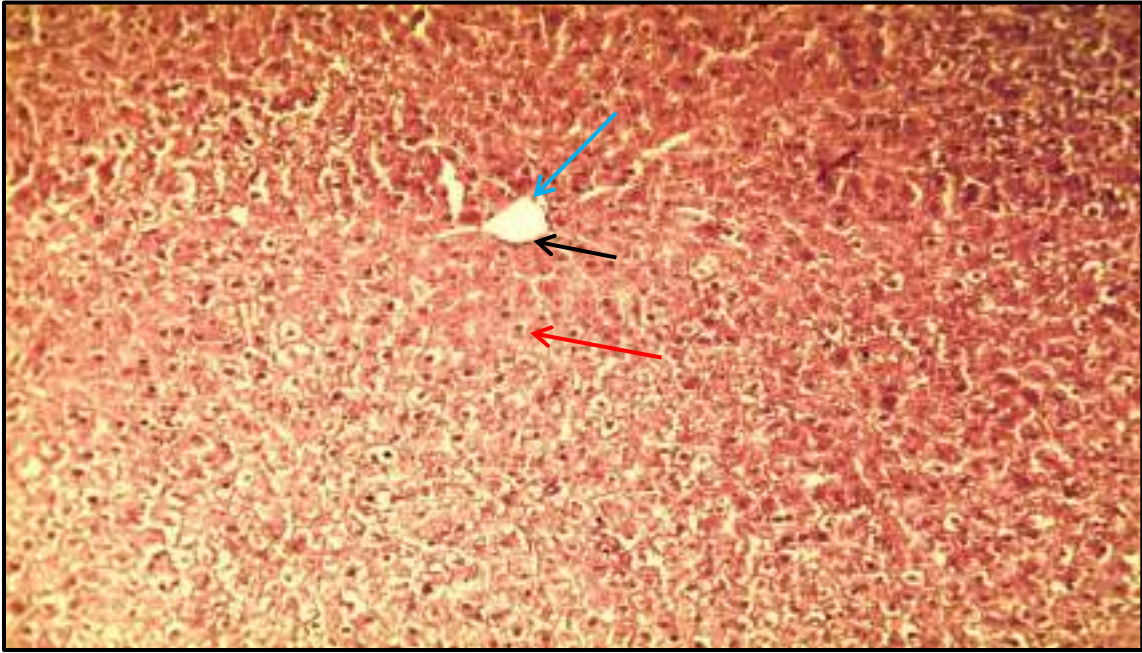
خصائص وقائية كيميائية، لذا فإن تأثيرهما المشترك يتطلب تحسناً دقيقاً للجرعة وتوقيت الإعطاء
(Jackson *et al.*, 2017 ;Naguib *et al.*, 2014).



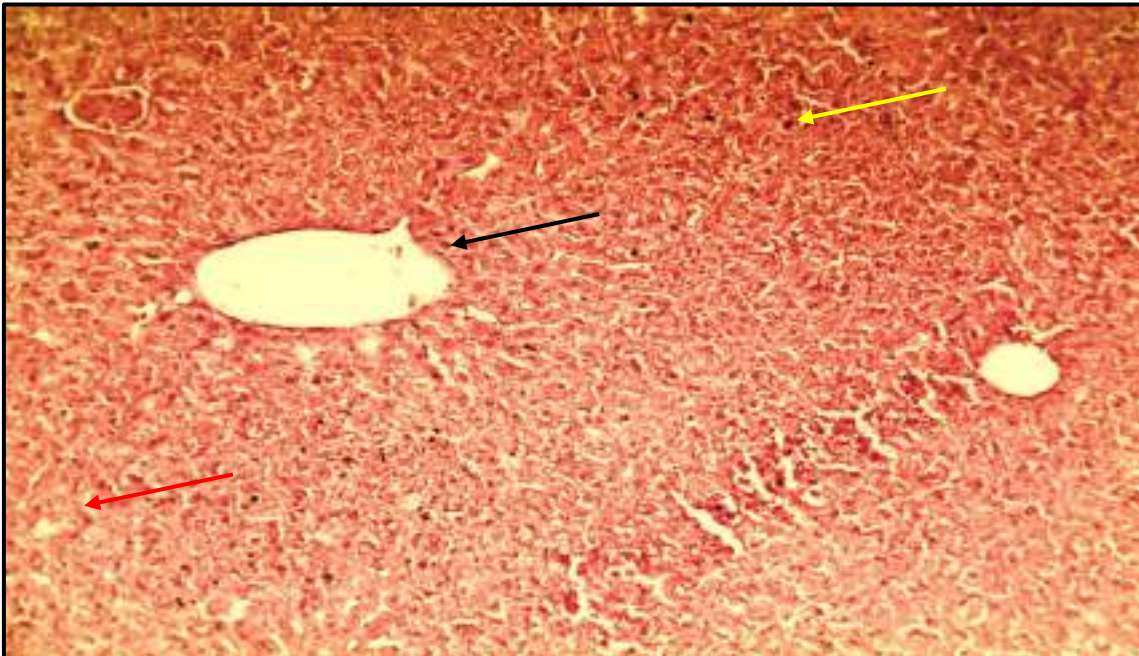
شكل (4-13) : مقطع عرضي من كبد المجموعة السيطرة تُظهر بنية الكبد الطبيعية. تترتب الخلايا الكبدية (السهم الأسود) في حبال تفصلها الجيوب الكبدية (السهم الأحمر) وتتشع باتجاه الوريد المركزي (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



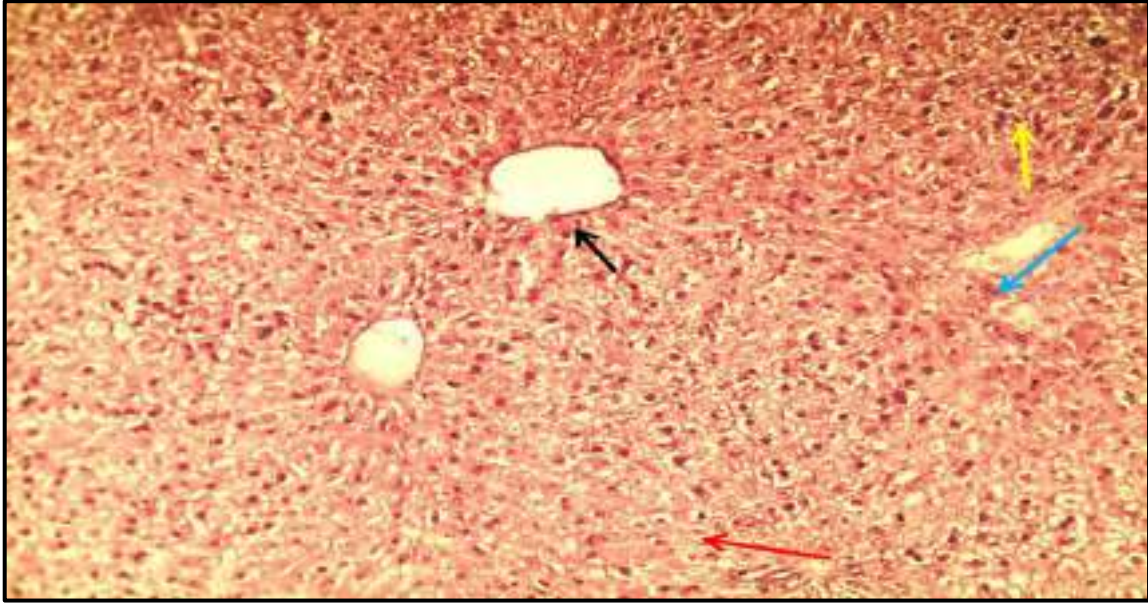
شكل (4-14) : مقطع عرضي من كبد فأر معاملة بـ AFB1، تُظهر اضطراباً في بنية الكبد (السهم الأسود)، واحتقان الأوعية الدموية (السهم الأزرق)، ونخر الخلايا الكبدية (السهم الأحمر)، وتسلاً خفيفاً للخلايا الليمفاوية (السهم الأصفر) (H&E) 40X.



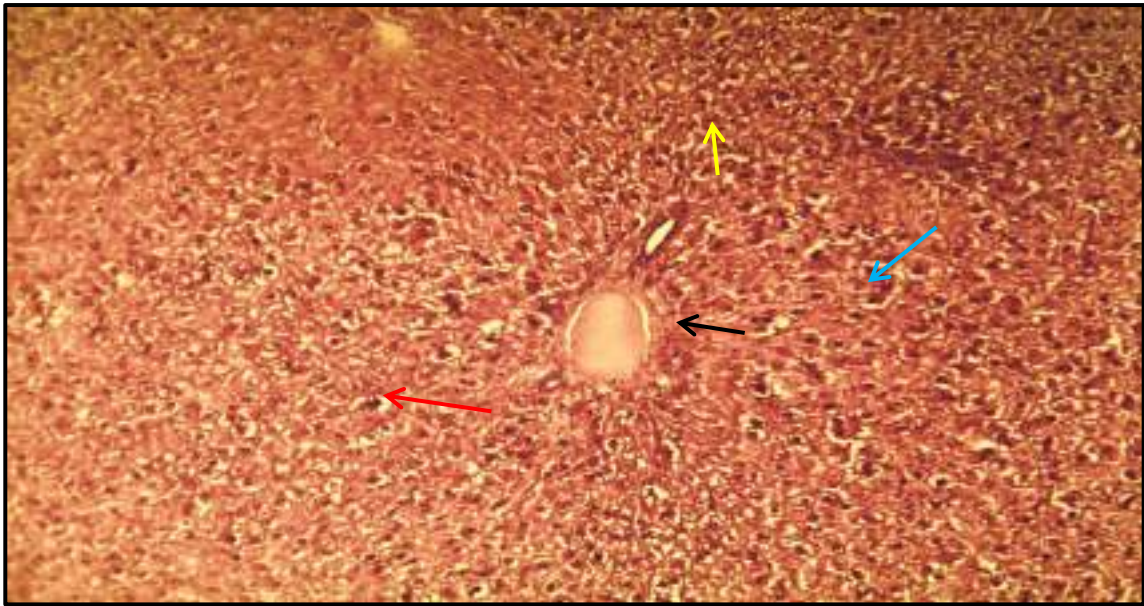
شكل (4-15) : مقطع عرضي من كبد فأر المجموعة المعاملة بالفطر الحيوي تظهر بنية كبدية طبيعية مع خلايا كبدية (السهم الأسود) مرتبة في حبال، مفصولة بجيوب كبدية (السهم الأحمر)، ومنتشعة من الوريد المركزي (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



شكل (4-16) : مقطع عرضي من كبد المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 والفطر الحيوي، تُظهر استعادة جزئية لبنية الكبد (السهم الأسود) مع نخر خلوي كبدي طفيف (السهم الأحمر) وتسلل لمفاوي طفيف (السهم الأصفر) (H&E) 40X.



شكل (4-17) : مقطع عرضي من كبد فأر المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + كربونات الكالسيوم تُظهر استعادة بنية الكبد مع خلايا الكبد المرتبة في حبال وتشع من الوريد المركزي (السهم الأسود)، مصحوبة باحتقان وعائي خفيف (السهم الأزرق)، ونخر خفيف في خلايا الكبد (السهم الأحمر)، وتسلل لمفاوي خفيف في منطقة البوابة (السهم الأصفر). 40X (H&E)



شكل (4-18) مقطع عرضي من كبد المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + الفطر الحيوي + كربونات الكالسيوم وتظهر استعادة بنية الكبد مع خلايا الكبد المرتبة في حبال وتشع من الوريد المركزي (السهم الأسود)، مصحوبة باحتقان وعائي طفيف (السهم الأزرق)، ونخر خلوي كبدي متوسط (السهم الأحمر)، وتسلل لمفاوي خفيف في منطقة البوابة (السهم الأصفر). 40X (H&E)

2- الكلية Kidney :

بينت نتائج التشخيص المجهرى للمقاطع النسيجية لكلية الفئران البيضاء المختبرية إلى وجود تغيرات مرضية نسيجية Histopathological Changes، حيث أظهرت المجموعة السيطرة بنية كلوية طبيعية تتميز بكبيبات Glomerulars محددة جيداً، ومحفظة بومان Bowman's capsule سليمة، وأنابيب ملتوية قريبة وبعيدة Proximal and distal convoluted tube طبيعية مبطنة بخلايا طلائية مكعبة سليمة كما في الشكل (4-19).

في المقابل، أظهرت المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 (AFB1) في الشكل (4-20) تغيرات مرضية واضحة، بما في ذلك تنكس الظهارة الأنبوبية، وتوسع ملحوظ في مساحة بومان، ونزيفاً heamorrhage حاداً داخل نسيج الكلى. قد يُعزى الضرر الملحوظ إلى الإجهاد التأكسدي، وتأكسد الدهون، واضطراب أغشية الخلايا الناجم عن نواتج أيض الأفلاتوكسين B1، مما يؤدي في النهاية إلى تنكس الخلايا وتلف الأنسجة، وتتفق نتائج الدراسة مع (Li et al., ; Al-Habib et al., 2007) (2018).

تتوافق هذه النتائج مع الدراسات المنشورة التي تُحدد الكلية كعضو مستهدف رئيسي لسم الأفلاتوكسين (B1 AFB1)، حيث يُحفز هذا السم الإجهاد التأكسدي ويُنشط مسارات الاستماتة الخلوية apoptotic pathways (Ofori-Attah et al., 2024).

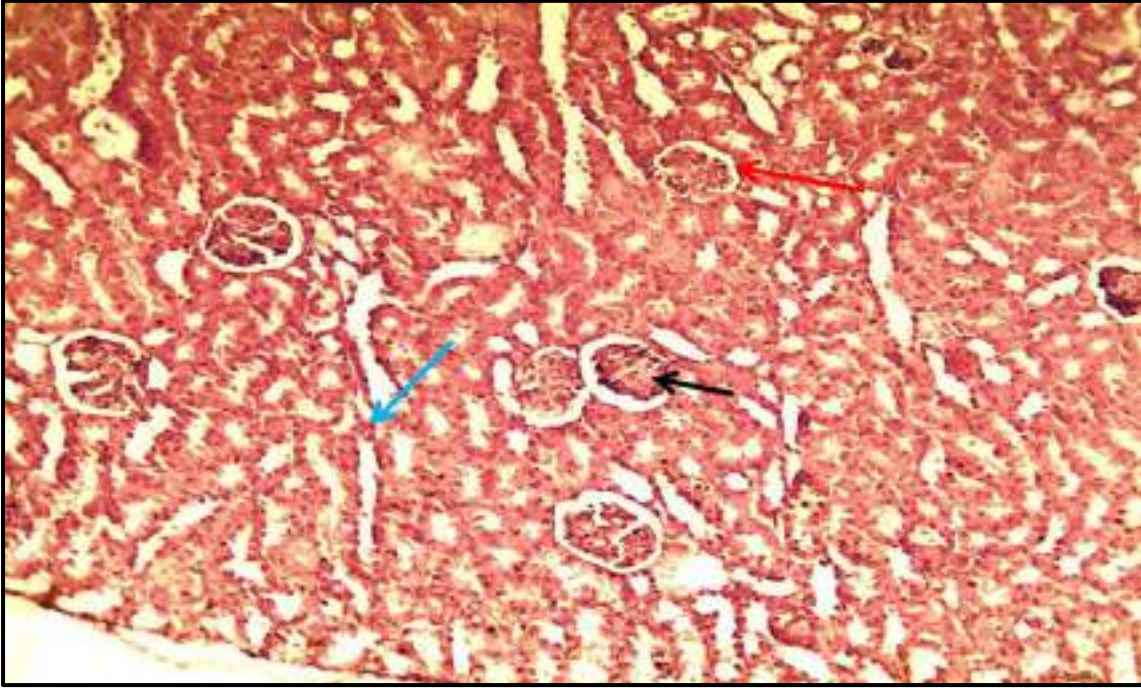
كما أظهر الفحص المجهرى لعينات من كلى فئران جرعت براشح الفطر الحيوي *P. ostreatus*، بنية كلوية طبيعية، تتميز بكبيبات سليمة مستديرة محاطة بمحفظة بومان، بالإضافة إلى أنابيب ملتوية قريبة وبعيدة طبيعية مبطنة بخلايا طلائية مكعبة. تشير هذه النتائج إلى أن إعطاء الفطريات الحيوية بالجرعة المختبرة لم يحدث أي آثار سامة على الكلى أو تغيرات بنيوية ملحوظة في أنسجة الكلى. يُعتبر الحفاظ على الشكل الطبيعي للكبيبات والأنابيب مؤشراً هاماً على صحة الكلى وسلامتها الوظيفية. وقد تتفق النتائج مع (Dkhil et al., 2020)، حيث وصفت البنية النسيجية الطبيعية لكلى. لذلك، فإن غياب الآفات النسيجية المرضية في هذه الدراسة يشير إلى أن المعاملة بالفطر الحيوي لم تكن مرتبطة بآثار كلوية ضارة في ظل الظروف التجريبية المستخدمة كما في الشكل (4-21).

قد أظهرت المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 مع فطر *P. ostreatus* تغيرات نسيجية مرضية مماثلة؛ إلا أن شدة الآفات بدت أقل مقارنةً بالمجموعة التي تلقت الأفلاتوكسين B1 فقط. بقي التنكس الأنبوبي وتوسع حيز بومان واضحين، بينما كانت التغيرات النزفية أقل انتشاراً. تشير هذه النتائج إلى أن الفطريات الحيوية قد تُمارس تأثيراً وقائياً جزئياً ضد السمية الكلوية الناجمة عن الأفلاتوكسين B1،

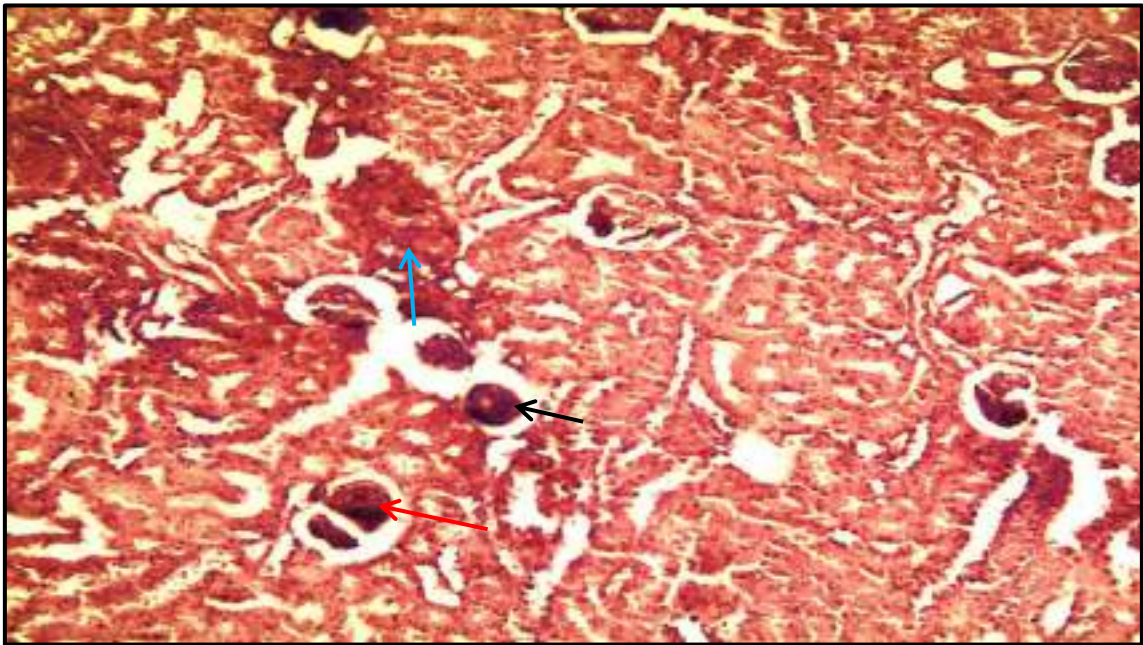
ربما من خلال آليات تتعلق بامتصاص السموم أو النشاط المضاد للأكسدة، على الرغم من عدم تحقيق حماية كاملة. (22-4).

كذلك، أظهرت مقاطع الكلى في الفئران المعاملة بالأفلاتوكسين B1 وكربونات الكالسيوم CaCO_3 تغيرات تنكسية في الأنابيب الكلوية مصحوبة بنزيف وتوسع في حيز بومان الشكل (23-4)، مما يدل على استمرار تلف الكلى.

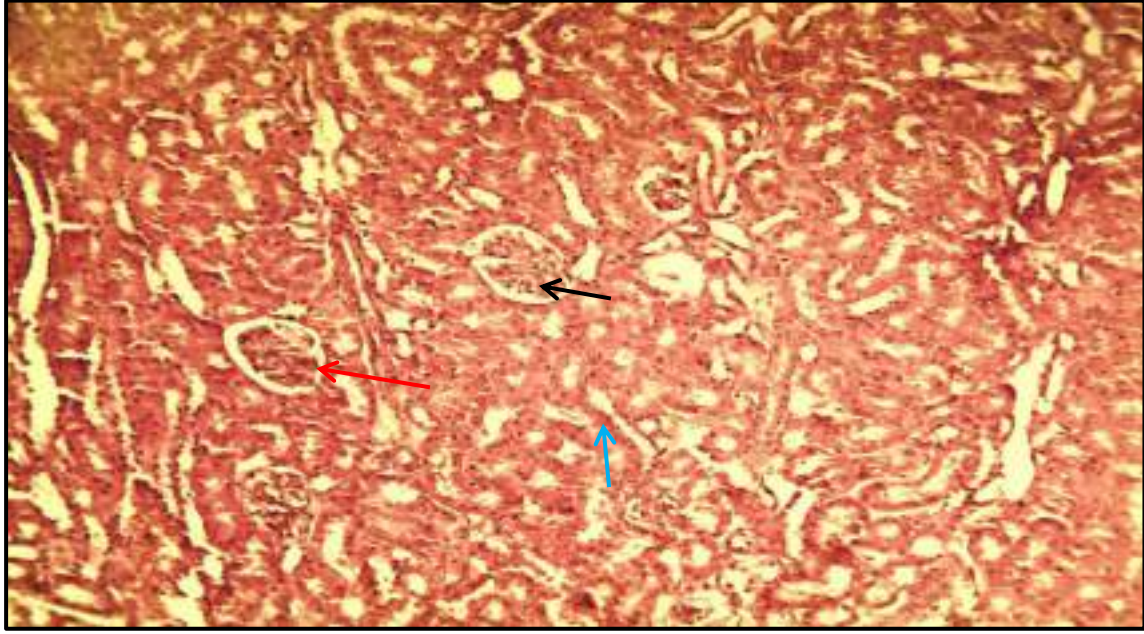
أما الفحص المجهرى لأنسجة كلية الفأر في المجموعة المعاملة براشح الفطر السام A. *flavus* وكربونات الكالسيوم CaCO_3 وراشح الفطر المحاري *P. ostreatus* معاً، فيظهر تنكساً في الخلايا المبطنة للأنابيب الكلوية وتوسعاً في حيز محفظة بومان المحيطة بالكبيبة، بالإضافة إلى نزيف متوسط كما في الشكل (24-4).



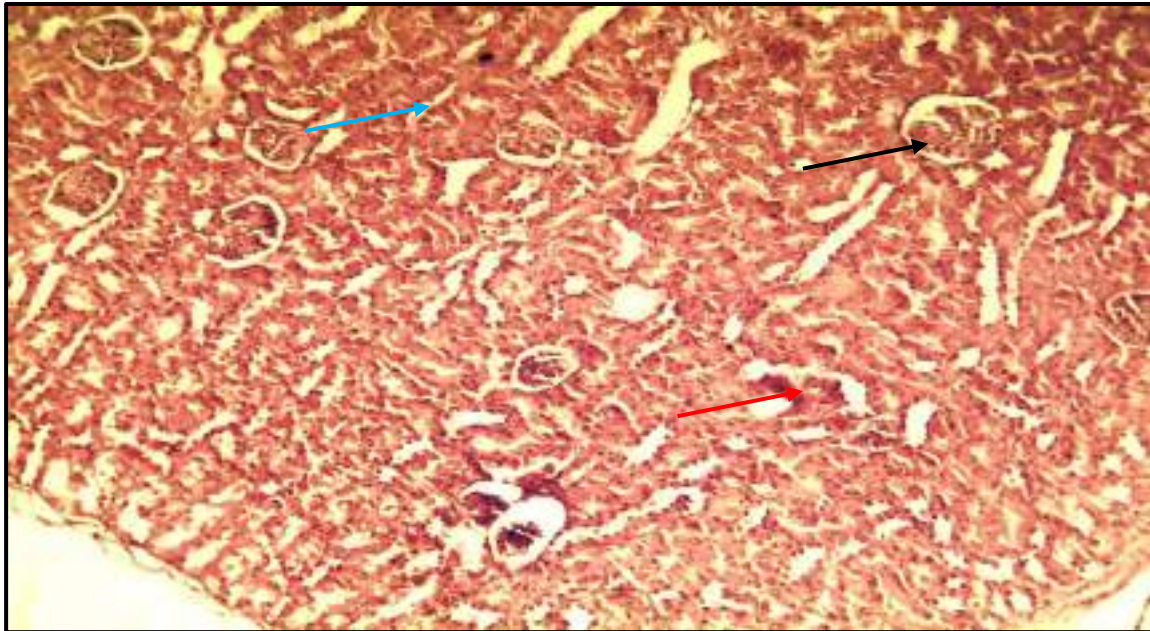
شكل (4-19): مقطع عرضي للكلى من المجموعة السيطرة يظهر نسيج الكلى الطبيعي مع الكبيبات السليمة (السهم الأسود)، ومحفظة بومان (السهم الأحمر)، والأنابيب المتلوية القريبة والبعيدة المبطننة بخلايا طلائية مكعبة (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



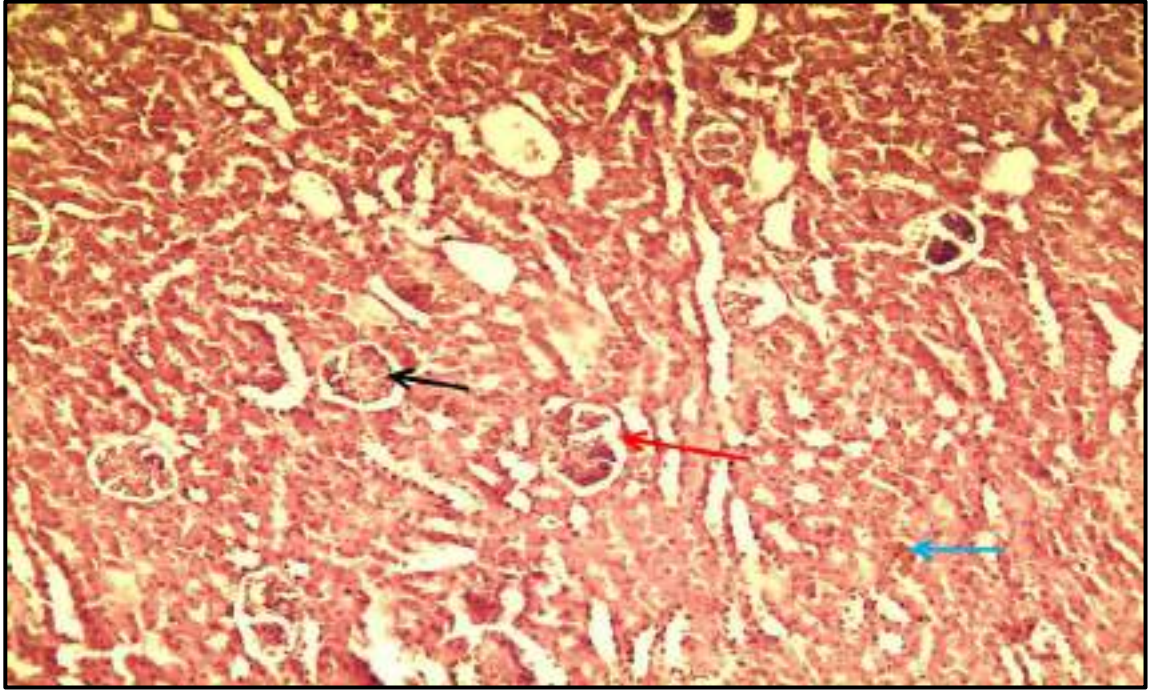
شكل (4 - 20) مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 يوضح تغيرات نسيجية مرضية كلوية شديدة، بما في ذلك تنكس ظهاري أنبوبي واسع النطاق (السهم الأسود)، وتوسع مساحة بومان (السهم الأحمر)، ونزيف واضح (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



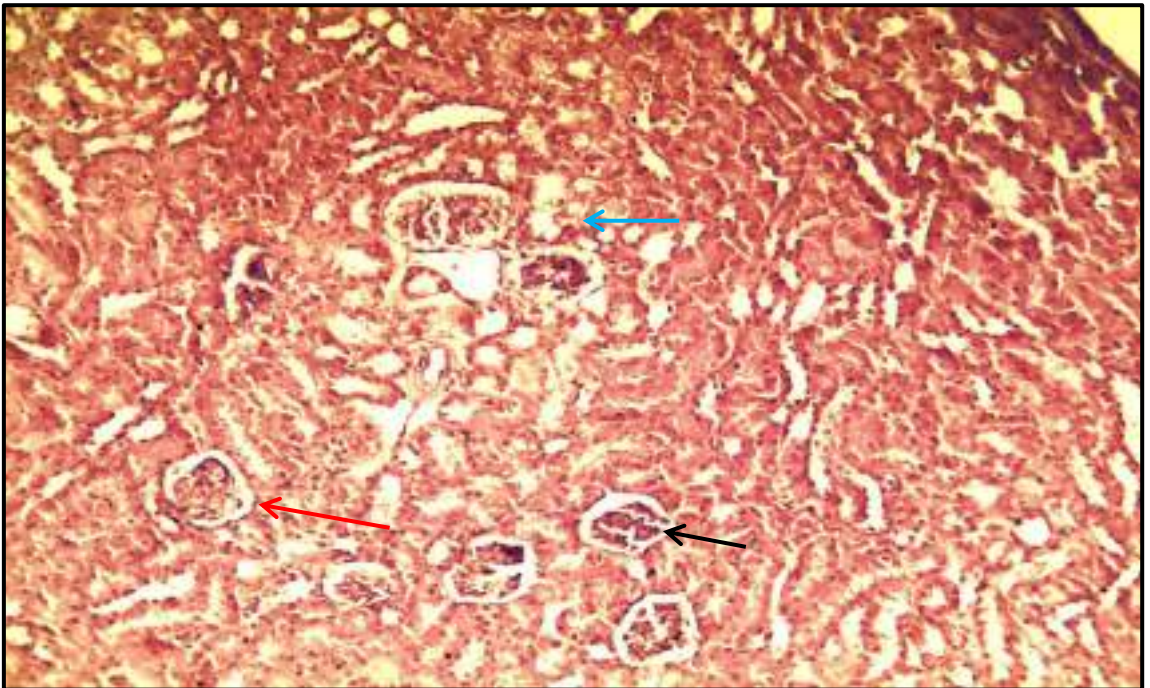
(شكل (4-21): مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالفطر الحيوي، يوضح الحفاظ على النسيج الكلوي مع الكبيبات الطبيعية (السهم الأسود)، ومحفظة بومان (السهم الأحمر)، والأنابيب الملتوية القريبة والبعيدة المبطنة بخلايا طلائية مكعبة (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



(شكل (4-22): مقطع عرضي للكلى في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + الفطر الحيوي يوضح تغيرات نسيجية مرضية كلوية معتدلة، بما في ذلك تنكس الظهارة الأنبوبية (السهم الأسود)، وتوسع مساحة بومان (السهم الأحمر)، ونزيف معتدل (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



شكل (4-23): مقطع عرضي للكلية في المجموعة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 + كربونات الكالسيوم يوضح تغيرات نسيجية مرضية كلوية معتدلة، بما في ذلك تنكس الظهارة الأنبوبية (السهم الأسود)، وتوسع مساحة بومان (السهم الأحمر)، ونزيف معتدل (السهم الأزرق) (H&E) 40X.



شكل (4-24): مقطع عرضي للكلية في المجموعة المعاملة بالتركيبية (أفلاتوكسين B1 + الفطر الحيوي + كربونات الكالسيوم) يوضح تغيرات نسيجية مرضية كلوية معتدلة، بما في ذلك تنكس الظهارة الأنبوبية (السهم الأسود)، وتوسع مساحة بومان (السهم الأحمر)، ونزيف معتدل (السهم الأزرق) (H&E) 40X.

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendation

5- الاستنتاجات والتوصيات

1-5- الاستنتاجات Conclusions

إن أهم ما توصلت إليه الدراسة الحالية من استنتاجات يتمثل في الآتي:

- 1- أظهرت الدراسة تنوعاً فطرياً في الفواكه الطازجة والمجففة، وكان فطر *A. niger* الأكثر تكراراً، يليه *A. flavus*، مما يؤكد أهمية هذه الفطريات بوصفها من الملوثات الفطرية المهمة للفواكه.
- 2- أكد التشخيص الجزيئي أهمية كبيرة للكشف عن الفطر والجينات المسؤولة عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين وأظهرت النتائج نسبة تطابق عالية بين العينات قيد الدراسة والعينات المرجعية في البنك الجيني. مما يدعم دقة التشخيص الجزيئي للعزلات المنتجة للأفلاتوكسين، إلى جانب الكشف الكيميائي عن AFB1.
- 3- أثبتت عزلات *A. flavus* قدرتها على إنتاج الأفلاتوكسين (AFB1) B1 ، وسُجل أعلى تركيز للسم بلغ 215.9 ppb في إحدى عينات العنب المجفف غير المعقم، في حين ارتبطت المستويات الأقل بالعينات الطازجة والمعقمة، مما يشير إلى أهمية ظروف التجفيف والتخزين والمعاملة في الحد من تراكم السم.
- 4- أظهر راشح الفطر المحاري (*P. ostreatus*) وكربونات الكالسيوم (CaCO_3) تأثيراً تثبيطياً واضحاً في نمو *A. flavus* ، وكان التأثير مرتبطاً بتركيز كل منهما.
- 5- حقق الجمع بين راشح الفطر *P. ostreatus* و CaCO_3 أعلى فاعلية تثبيطية ووقائية مقارنة باستخدام كل عامل منفرداً، مما يشير إلى وجود تأثير تآزري بين العامل الحيوي والعامل الكيميائي في الحد من نمو الفطر وتقليل آثاره السمية.
- 6- أدى التعرض لراشح *A. flavus* المحتوي على AFB1 إلى تأثيرات سمية واضحة في الحيوانات المختبرية، تمثلت في اضطرابات في وزن الجسم، وارتفاع مؤشرات إنزيمات الكبد، وتغير مؤشرات وظائف الكلى، فضلاً عن حدوث تغيرات نسيجية في الكبد والكليتين.
- 7- أظهرت المعالجة المشتركة بـ *P. ostreatus* و CaCO_3 أفضل تأثير وقائي بين المعاملات المختبرة، إذ أسهمت في الحد من الاضطرابات الكيميائية الحيوية والتغيرات النسيجية المرتبطة بالتعرض لـ AFB1، مما يدعم إمكانية الاستفادة من هذا التداخل في تقليل السمية.
- 8- أكدت النتائج أن سم AFB1 يمتلك تأثيراً سميّاً واضحاً، ولاسيما على الكبد والكليتين، وأن شدة التأثيرات المرضية ترتبط بدرجة التعرض للسم، بما يشمل تركيزه ومدة التعرض، وهو ما انعكس في التغيرات الوظيفية والنسجية المسجلة.

2-5- التوصيات Recommendations

- 1- يُعدّ الرصد والكشف المستمر عن المنتجات الغذائية والفواكه للكشف عن تلوثها بفطر *A. flavus* وسم الأفلاتوكسين B1 أمراً ضرورياً وبالغ الأهمية لحماية الصحة العامة وصحة الحيوان. وينبغي تنفيذ برامج توعية عامة لتثقيف المنتجين والمستهلكين حول المخاطر المرتبطة بتلوث الأفلاتوكسين وطرق الوقاية منه.
- 2- يجب توفير ظروف تخزين مناسبة للمواد الغذائية، بما في ذلك تقليل نسبة الرطوبة والتحكم في درجة الحرارة، لمنع نمو الفطريات المنتجة لسموم وكذلك منع إنتاج السموم.
- 3- استخدام طرق الكشف السريعة والحساسة بشكل روتيني للكشف المبكر عن التلوث بسم الأفلاتوكسين Aflatoxin.
- 4- يُوصى بتشجيع استخدام مكافحة البيولوجية، بما في ذلك استخدام سلالات غير منتجة للأفلاتوكسين من فطر *A. flavus* مثل سلالة *A. flavus* strain AF36، وفطريات مكافحة الحيوية واستخدام الكائنات الحية الدقيقة المفيدة، للحد من تلوث الأفلاتوكسين.
- 5- إجراء المزيد من الدراسات على أعضاء أخرى كالرئة والبنكرياس والطحال على الحيوانات المختبرية. ومعرفة تأثير تلك الأعضاء بالسم الفطري. بالإضافة إلى ، إجراء دراسات على الجينات المسؤولة عن إنتاج Aflatoxin في فطر *A. flavus* المنتج لسم.
- 6- يوصى بالبحث عن عوامل طبيعية، أو بيولوجية فعالة قادرة على تخفيف الآثار السامة للأفلاتوكسين B1 وحماية أنسجة الأعضاء التي يستهدفها السم من التلف.

المصادر

References

- Abbas, Asmaa, Ranjit K. Prajapati, Emil Aalto-Setälä, Alexander A. Baykov, and Anssi M. Malinen. 2024. "Aflatoxin Biosynthesis Regulators AflR and AflS: DNA Binding Affinity, Stoichiometry, and Kinetics." *Biochemical Journal* 481(12):805–21.
- Abbas, H. K., J. R. Wilkinson, R. M. Zablotowicz, CESARE Accinelli, C. A. Abel, H. A. Bruns, and M. A. Weaver. 2009. "Ecology of *Aspergillus Flavus*, Regulation of Aflatoxin Production, and Management Strategies to Reduce Aflatoxin Contamination of Corn." *Toxin Reviews* 28(2–3):142–53.
- Abbott, Walter S. 1925. "A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide." *J. Econ. Entomol* 18(2):265–67.
- Abdel-Azeem, Ahmed M., Mohamed A. Abdel-Azeem, Shimal Y. Abdul-Hadi, and Amira G. Darwish. 2019. "Aspergillus: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications." Pp. 121–79 in *Recent advancement in white biotechnology through fungi: volume 1: diversity and enzymes perspectives*. Springer.
- Abdelaziz, Amer M., Deiaa A. El-Wakil, Mohamed S. Attia, Omar M. Ali, Hamada AbdElgawad, and Amr H. Hashem. 2022. "Inhibition of *Aspergillus Flavus* Growth and Aflatoxin Production in *Zea Mays* L. Using Endophytic *Aspergillus Fumigatus*." *Journal of Fungi* 8(5):482.
- Abrehame, Solomon, Valsa Remony Manoj, Merry Hailu, Yu-Yi Chen, Yu-Chun Lin, and Yen-Po Chen. 2023. "Aflatoxins: Source, Detection, Clinical Features and Prevention." *Processes* 11(1):204.
- Achaglinkame, Matthew Atongbiik, Nelson Opoku, and Francis Kweku Amagloh. 2017. "Aflatoxin Contamination in Cereals and Legumes to Reconsider Usage as Complementary Food Ingredients for Ghanaian Infants: A Review." *Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism* 10:1–7.
- Adjovi, Yann Christie Sissinto, Joli Prince Mintognisse Fossou, and Ulrich Hilarion Ahehehinou. 2025. "A Silent Killer in the Word: Review on *Aspergillus Flavus* Strains." *Toxicon* 108225.

- Agrios, George N. 2005. *Plant Pathology*. Elsevier.
- Ahmad, Tanvir, Shihua Wang, and Yang Liu. 2025. "Aspergillus Flavus and Aflatoxins." *Toxins* 17(7):326.
- Ahmed, Osama M., Hossam Ebaid, El-Shaymaa El-Nahass, Mahmoud Ragab, and Ibrahim M. Alhazza. 2020. "Nephroprotective Effect of Pleurotus Ostreatus and Agaricus Bisporus Extracts and Carvedilol on Ethylene Glycol-Induced Urolithiasis: Roles of NF-KB, P53, Bcl-2, Bax and Bak." *Biomolecules* 10(9):1317.
- Ajmal, Maryam, Wendy Bedale, Abida Akram, and Jae-Hyuk Yu. 2022. "Comprehensive Review of Aflatoxin Contamination, Impact on Health and Food Security, and Management Strategies in Pakistan." *Toxins* 14(12):845.
- Al-Habib, May Fadhil Majid, Akram Abood Jaffar, and Hayder Hammadi Abdul-Ameer. 2007. "Aflatoxin B1-Induced Kidney Damage in Rats." *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad* 49(1):147–51.
- Alassane-Kpembi, Imourana, Gerd Schatzmayr, Ionelia Taranu, Daniela Marin, Olivier Puel, and Isabelle Paule Oswald. 2017. "Mycotoxins Co-Contamination: Methodological Aspects and Biological Relevance of Combined Toxicity Studies." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(16):3489–3507.
- Albakri, Ali H., Mohammed Baqur S. Al-Shuhaib, Sabah L. Alwan, Sayed AbdulAzeez, and J. Francis Borgio. 2021. "Deleterious Missense Variants in the Aflatoxin Biosynthesis Genes Explain the Low Toxicity of Aspergillus Flavus from Infected Rice." *Microbial Pathogenesis* 152:104605.
- Alghamdi, Rana G., Nidal M. Zabermawi, Faizah A. Altihani, Fardos M. Bokhari, Rania M. Makki, Shahira A. Hassoubah, Zeina W. Sharawi, and Azhar A. Najjar. 2023. "Diversity and Density of Fungi Isolated from Dried Fruits." *Journal of Biochemical Technology* 14(4–2023):45–55.
- Alheeti, M. N. O., S. S. S. Al-Saeedi, I. A. Al-Assaffii, and V. Sabaratnam. 2013. "Antifungal Activities of Mycelia and Culture Filtrate of Four Oyster

- Mushroom Species (*Pleurotus* Spp.) against Pathogenic Fungi.” in *The 7th International Medicinal Mushroom Conference, Beijing, China*.
- Amaiike, Saori, and Nancy P. Keller. 2011. “*Aspergillus Flavus*.” *Annual Review of Phytopathology* 49(1):107–33.
- Anidah, Anidah, Winiati P. Rahayu, Siti Nurjanah, and Ina Retnowati. 2023. “Molecular Characterization of *Aspergillus Flavus* Toxigenicity in Agricultural Commodities in Indonesia.” *Biotropia* 30(2):195–205.
- Araújo, Wesley Moraes de, Emanuel Pereira Silva, Gessymara Cainã Sales da Silva, Lívia Soares de França Silva, Francinalva Dantas de Medeiros, José Eduardo Gonçalves, Bruna Braga Dantas, Kelvyn Kennedy de Figueiredo Silva, Anauara Lima e Silva, and Josean Fechine Tavares. 2025. “One-Health Approach to Managing Aflatoxin-Producing *Aspergillus Flavus* Using Spent Mushroom Substrate of *Pleurotus* Spp.” *ACS Omega*.
- Arias, Maykel, Llipsy Santiago, Matxalen Vidal-García, Sergio Redrado, Pilar Lanuza, Laura Comas, M. Pilar Domingo, Antonio Rezusta, and Eva M. Gálvez. 2018. “Preparations for Invasion: Modulation of Host Lung Immunity during Pulmonary Aspergillosis by Gliotoxin and Other Fungal Secondary Metabolites.” *Frontiers in Immunology* 9:2549.
- Arias, Renee S., Valerie A. Orner, Jaime Martinez-Castillo, and Victor S. Sobolev. 2021. “*Aspergillus* Section Flavi, Need for a Robust Taxonomy.” *Microbiology Resource Announcements* 10(48):e00784-21.
- Arrieta-Aguirre, Inés, Pilar Menéndez-Manjón, Giulia Carrano, Ander Diez, Íñigo Fernandez-de-Larrinoa, and María-Dolores Moragues. 2023. “Molecular Identification of Fungal Species through Multiplex-QPCR to Determine Candidal Vulvovaginitis and Antifungal Susceptibility.” *Journal of Fungi* 9(12):1145.
- Ashi, H., E. H. Hamed, B. Refaat, H. M. Almughamsi, L. A. Neyaz, T. F. H. Alahmadi, S. H. Arafa, O. T. Alami, F. AL-RAHMANI, and E. H. ALQURASHI. 2024. “Comparative Impacts of Saudi Arabian and Egyptian

- Aspergillus Flavus*-Associated Aflatoxin B1 on Rats.” *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)* 14(1):356–70.
- Asurmendi, Paula, C. Barberis, L. Pascual, A. Dalcero, and L. Barberis. 2015. “Influence of *Listeria Monocytogenes* and Environmental Abiotic Factors on Growth Parameters and Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus Flavus*.” *Journal of Stored Products Research* 60:60–66.
- Avalos, Javier, and M. Carmen Limón. 2021. “Fungal Secondary Metabolism.” *Encyclopedia* 2(1):1–13.
- Awuchi, Chinaza Godseill, Erick Nyakundi Ondari, Sarah Nwozo, Grace Akinyi Odongo, Ifie Josiah Eseoghene, Hannington Twinomuhwezi, Chukwuka U. Ogbonna, Anjani K. Upadhyay, Ademiku O. Adeleye, and Charles Odilichukwu R. Okpala. 2022. “Mycotoxins’ Toxicological Mechanisms Involving Humans, Livestock and Their Associated Health Concerns: A Review.” *Toxins* 14(3):167.
- Awuchi, Chinaza Godswill, Erick Nyakundi Ondari, Ifie Josiah Eseoghene, Hannington Twinomuhwezi, Ikechukwu Otuosorochi Amagwula, and Sonia Morya. 2021. “Fungal Growth and Mycotoxins Production: Types, Toxicities, Control Strategies, and Detoxification.” in *Fungal reproduction and growth*. IntechOpen.
- Awuchi, Chinaza Godswill, Erick Nyakundi Ondari, Chukwuka U. Ogbonna, Anjani K. Upadhyay, Katarzyna Baran, Charles Odilichukwu R. Okpala, Małgorzata Korzeniowska, and Raquel P. F. Guiné. 2021. “Mycotoxins Affecting Animals, Foods, Humans, and Plants: Types, Occurrence, Toxicities, Action Mechanisms, Prevention, and Detoxification Strategies—A Revisit.” *Foods* 10(6):1279.
- Balina, Abebe, Abriham Kebede, and Yobsan Tamiru. 2018. “Review on Aflatoxin and Its Impacts on Livestock.” *Journal of Dairy and Veterinary Sciences* 6(2):e555685.

- Bancroft, John D., and Marilyn Gamble. 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier health sciences.
- Battilani, Paola, P. Toscano, H. J. Van der Fels-Klerx, A. Moretti, Marco Camardo Leggieri, C. Brera, A. Rortais, T. Goumperis, and T. Robinson. 2016. "Aflatoxin B1 Contamination in Maize in Europe Increases Due to Climate Change." *Scientific Reports* 6(1):24328.
- Bell, D. K. 1982. "WELLS. HD; MARKHAM, CR." *Vitro Antag Onism of Tn—Choderma Species against Six Funsal Plant Pathogens. Phytopatholo—GY* 72(4):379–82.
- Benkerroum, Noredine. 2020a. "Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(4):1215.
- Benkerroum, Noredine. 2020b. "Chronic and Acute Toxicities of Aflatoxins: Mechanisms of Action." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(2):423.
- Bennett, J. W., S. Kale, and Juijiang Yu. 2007. "Aflatoxins: Background, Toxicology, and Molecular Biology." Pp. 355–73 in *Foodborne diseases*. Springer.
- Beuchat, L. R. 1995. "Chapter 14-Media for Detecting and Enumerating Yeasts and Moulds." *Progress in Industrial Microbiology* 34:229–42.
- Beyene, Achenef Melaku, Xiangwei Du, Dwayne E. Schrunk, Steve Ensley, and Wilson K. Rumbeiha. 2019. "High-Performance Liquid Chromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Techniques for Detection and Quantification of Aflatoxin B1 in Feed Samples: A Comparative Study." *BMC Research Notes* 12(1):492.
- Bhatnagar-Mathur, Pooja, Sowmini Sunkara, Madhurima Bhatnagar-Panwar, Farid Waliyar, and Kiran Kumar Sharma. 2015. "Biotechnological Advances for Combating *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin Contamination in Crops." *Plant*

- Science* 234:119–32.
- Blount, W. P. 1961. "Turkey" X" Disease." *J. Brit. Turkey Fed.* 9:52–54.
- Brown, Lottie, Mario Cruciani, Charles Oliver Morton, Alexandre Alanio, Rosemary A. Barnes, J. Peter Donnelly, Ferry Hagen, Rebecca Gorton, Michaela Lackner, and Juergen Loeffler. 2025. "The Molecular Diagnosis of Invasive Fungal Diseases with a Focus on PCR." *Diagnostics* 15(15):1909.
- Caceres, Isaura, Anthony Al Khoury, Rhoda El Khoury, Sophie Lorber, Isabelle P. Oswald, André El Khoury, Ali Atoui, Olivier Puel, and Jean-Denis Bailly. 2020. "Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review." *Toxins* 12(3):150.
- Cai, Jize, Meiqu Lu, Qin Huang, Fengbo Bai, Di Zhao, Haoyun Jiang, and Junquan Chen. 2025. "A Review of Nano-Calcium Carbonate and Its Applications: Preparation, Necessities, Biomedicine, and Environment." *Particle & Particle Systems Characterization* e00093.
- Calado, Thalita, Armando Venâncio, and Luís Abrunhosa. 2014. "Irradiation for Mold and Mycotoxin Control: A Review." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 13(5):1049–61.
- Campanella, V., Antonio Ippolito, and Franco Nigro. 2002. "Activity of Calcium Salts in Controlling Phytophthora Root Rot of Citrus." *Crop Protection* 21(9):751–56.
- Cancer, International Agency for Research on. 2012. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans." *IARC Sci Publ* 100:385.
- Cano, P. M., Olivier Puel, and Isabelle P. Oswald. 2018. "Mycotoxins: Fungal Secondary Metabolites with Toxic Properties." Pp. 318–71 in *Fungi*. CRC Press.
- Cao, Weiya, Pan Yu, KePeng Yang, and Dongli Cao. 2022. "Aflatoxin B1: Metabolism, Toxicology, and Its Involvement in Oxidative Stress and Cancer Development." *Toxicology Mechanisms and Methods* 32(6):395–419.
- Chakrabarti, Arunaloke, Shiv Sekhar Chatterjee, Ashim Das, and M. R.

- Shivaprakash. 2011. "Invasive Aspergillosis in Developing Countries." *Medical Mycology* 49(Supplement_1):S35–47.
- Chowdhury, Mohammed Mehadi Hassan, Khadizatul Kubra, and Sheikh Rashel Ahmed. 2015. "Screening of Antimicrobial, Antioxidant Properties and Bioactive Compounds of Some Edible Mushrooms Cultivated in Bangladesh." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 14(1):8.
- Cilerdzic, Jasmina, Mirjana Stajic, Jelena Vukojevic, Ivan Milovanovic, and Nikolina Muzgonja. 2015. "Antioxidant and Antifungal Potential of *Pleurotus Ostreatus* and *Agrocybe Cylindracea* Basidiocarps and Mycelia." *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16(2):179–86.
- Cohen, Yuval, Ran Shulhani, Yehuda Rot, Hanita Zemach, Eduard Belausov, Maayan Grinberg-Baran, Menachem Borenstein, Shimon Pivonia, David Ezra, and Dani Shtienberg. 2021. "Aspergillus Niger, the Causal Agent of Black Mould Disease in Date Fruits, Infects and Colonizes Flowers and Young Fruitlets." *Plant Pathology* 70(5):1195–1208.
- Colakoglu, Fatma, and Hasan Hüseyin Donmez. 2012. "Effects of Aflatoxin on Liver and Protective Effectiveness of Esterified Glucomannan in Merino Rams." *The Scientific World Journal* 2012(1):462925.
- Colle, J., A. Fraser, P. Marmion, and A. Simmans. 1996. "MackiaMacartnre Practical Medical Microbiology 14 Th Ed Churchill Living Stone New York."
- Contam, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, Dieter Schrenk, Margherita Bignami, Laurent Bodin, James Kevin Chipman, Jesús del Mazo, Bettina Grasl-Kraupp, Christer Hogstrand, Laurentius Hoogenboom, and Jean-Charles Leblanc. 2020. "Risk Assessment of Aflatoxins in Food." *EFSA Journal* 18(3):e06040.
- Dai, Yaqi, Kunlun Huang, Boyang Zhang, Liye Zhu, and Wentao Xu. 2017. "Aflatoxin B1-Induced Epigenetic Alterations: An Overview." *Food and Chemical Toxicology* 109:683–89.
- Dam, Loes, Pablo Cruz-Morales, Nabila Rodriguez Valerón, Ana Calheiros de

- Carvalho, Diego Prado Vásquez, Moritz Lübke, Line Kloster Pedersen, Rasmus Munk, Morten Otto Alexander Sommer, and Leonie Johanna Jahn. 2024. "GastronOmics: Edibility and Safety of Mycelium of the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus*." *Current Research in Food Science* 9:100866.
- Daou, Rouaa, Karine Joubrane, Richard G. Maroun, Lydia Rabbaa Khabbaz, Ali Ismail, and André El Khoury. 2021. "Mycotoxins: Factors Influencing Production and Control Strategies." *AIMS Agriculture and Food* 6(1):416–47.
- Das, Arijit, Sourav Bhattacharya, Muthusamy Palaniswamy, and Jayaraman Angayarkanni. 2015. "Aflatoxin B1 Degradation during Co-Cultivation of *Aspergillus Flavus* and *Pleurotus Ostreatus* Strains on Rice Straw." *3 Biotech* 5(3):279–84.
- Dennis, C., and J. Webster. 1971. "Antagonistic Properties of Species-Groups of *Trichoderma*. III. Hyphal Interaction."
- Dhakal, Aayush, Muhammad F. Hashmi, and Evelyn Sbar. 2020. "Aflatoxin Toxicity."
- Diao, Enjie, Xiangyang Li, Zheng Zhang, Wenwen Ma, Ning Ji, and Haizhou Dong. 2015. "Ultraviolet Irradiation Detoxification of Aflatoxins." *Trends in Food Science & Technology* 42(1):64–69.
- Divya, V., K. Malarkodi, S. Mathiyazhagan, V. Manonmani, T. Anand, and A. Velayutham. 2023. "Effect of PH on the Mycelial Growth of *Aspergillus Niger* and *Aspergillus Flavus*."
- Dixit, S. N., S. C. Tripathi, and R. R. Upadhyay. 1976a. "Pinto , M. ; Gencal." *Economic Botany* 371–74.
- Dixit, S. N., S. C. Tripathi, and R. R. Upadhyay. 1976b. "The Antifungal Substance of Rose Flowers (*Rosa Indica*)." *Economic Botany* 371–74.
- Dkhil, Mohamed A., Marwa S. M. Diab, Maha S. Lokman, Heba El-Sayed, Amira A. Bauomy, Esam M. Al-Shaebi, and Saleh Al-Quraishy. 2020. "Nephroprotective Effect of *Pleurotus Ostreatus* Extract against Cadmium Chloride Toxicity in Rats." *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*

- 92(01):e20191121.
- Dohnal, Vlastimil, Qinghua Wu, and Kamil Kuča. 2014. "Metabolism of Aflatoxins: Key Enzymes and Interindividual as Well as Interspecies Differences." *Archives of Toxicology* 88(9):1635–44.
- Doi, Kunio, and Koji Uetsuka. 2014. "Mechanisms of Mycotoxin-Induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis through Oxidative Stress-Related Pathways." *Journal of Toxicologic Pathology* 27(1):1–10.
- Donato, Cindy Johana Romero, Eugenia Cendoya, Luisina Delma Demonte, María Rosa Repetti, Sofía Noemí Chulze, and María Laura Ramirez. 2022. "Influence of Abiotic Factors (Water Activity and Temperature) on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus Flavus* in a Chickpea-Based Medium." *International Journal of Food Microbiology* 379:109841.
- Eaton, David L., and John D. Groopman. 2013. *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*. Elsevier.
- Ekwomadu, Theodora I., Stephen A. Akinola, and Mulunda Mwanza. 2021. "Fusarium Mycotoxins, Their Metabolites (Free, Emerging, and Masked), Food Safety Concerns, and Health Impacts." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18(22):11741.
- El-Ramady, Hassan, Neama Abdalla, Zakaria Fawzy, Khandsuren Badgar, Xhensila Llanaj, Gréta Törös, Peter Hajdú, Yahya Eid, and József Prokisch. 2022. "Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation." *Sustainability* 14(6):3667.
- Eskola, Mari, Gregor Kos, Christopher T. Elliott, Jana Hajšlová, Sultan Mayar, and Rudolf Krska. 2020. "Worldwide Contamination of Food-Crops with Mycotoxins: Validity of the Widely Cited 'FAO Estimate' of 25%." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60(16):2773–89.
- Faraji, Hamed, Farideh Tabatabaee Yazdi, and Nematollah Razmi. 2022. "The Influence of Ultraviolet Radiation on Aflatoxin Producing *Aspergillus*

- Species' Isolated from Iranian Rice.” *Toxicology Reports* 9:1528–36.
- Farian, Ewelina. 2020. “Mycotoxins in Fresh Fruit–Harmful Compounds of Natural Origin.” *Environmental Medicine*.
- Fernandes, Luana, Francieli Graeff, Arij Jelassi, Michael Sulyok, Carolina Garcia, Nuno Rodrigues, José Alberto Pereira, Albino Bento, Alifa Kanoun, and Paula Rodrigues. 2022. “Effect of Relative Humidity on the Quality and Safety of Peeled Almond Kernels (*Prunus Dulcis* Mill.) during Simulated Maritime Transport/Storage.” *Journal of Food Science* 87(12):5363–74.
- Fink-Greernmels, Johanna. 1999. “Mycotoxins: Their Implications for Human and Animal Health.” *Veterinary Quarterly* 21(4):115–20.
- Flaishman, Moshe A., Victor Rodov, and Ed Stover. 2008. “The Fig: Botany, Horticulture, and Breeding.”
- Forbes, Betty A., Daniel F. Sahm, and Alice S. Weissfeld. 2007. *Diagnostic Microbiology*. Mosby St Louis.
- Fountain, Jake C., Prasad Bajaj, Manish Pandey, Spurthi N. Nayak, Liming Yang, Vinay Kumar, Ashwin S. Jayale, Anu Chitikineni, Weijian Zhuang, and Brian T. Scully. 2016. “Oxidative Stress and Carbon Metabolism Influence *Aspergillus Flavus* Transcriptome Composition and Secondary Metabolite Production.” *Scientific Reports* 6(1):38747.
- Frisvad, Jens Christian, V. Hubka, C. N. Ezekiel, S. B. Hong, A. Novškovš, A. J. Chen, M. Arzanlou, T. O. Larsen, F. Sklenšř, and W. Mahakarnchanakul. 2019. “Taxonomy of *Aspergillus* Section *Flavi* and Their Production of Aflatoxins, Ochratoxins and Other Mycotoxins.” *Studies in Mycology* 93(1):1–63.
- Fuquay, John W., Paul L. H. McSweeney, and Patrick F. Fox. 2011. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press.
- Gao, Jing, Jiayu Xu, Zhihong Liang, and Antonio Francesco Logrieco. 2025. “Synergistic Antagonism of *Pleurotus Pulmonarius* and *Trichoderma* Spp. against *Aspergillus Flavus*.” *Bioresource Technology Reports* 102453.

- Geisen, Rolf, Najim Touhami, and Markus Schmidt-Heydt. 2017. "Mycotoxins as Adaptation Factors to Food Related Environments." *Current Opinion in Food Science* 17:1–8.
- Geiser, D. M., M. A. Klich, Jens Christian Frisvad, S. W. Peterson, J. Varga, and Robert A. Samson. 2007. "The Current Status of Species Recognition and Identification in *Aspergillus*." *Studies in Mycology* 59(1):1–10.
- Gemedé, Habtamu Fekadu. 2025. "Toxicity, Mitigation, and Chemical Analysis of Aflatoxins and Other Toxic Metabolites Produced by *Aspergillus*: A Comprehensive Review." *Toxins* 17(7):331.
- Ghallab, Ahmed, Reham Hassan, Maiju Myllys, Wiebke Albrecht, Adrian Friebe, Stefan Hoehme, Ute Hofmann, Abdel-latif Seddek, Albert Braeuning, and Lars Kuepfer. 2021. "Subcellular Spatio-Temporal Intravital Kinetics of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Liver and Kidney." *Archives of Toxicology* 95(6):2163–77.
- Giannini, Edoardo G., Roberto Testa, and Vincenzo Savarino. 2005. "Liver Enzyme Alteration: A Guide for Clinicians." *Cmaj* 172(3):367–79.
- Ginterová, A., M. Polster, and O. Janotková. 1980. "The Relationship between *Pleurotus Ostreatus* and *Aspergillus Flavus* and the Production of Aflatoxin." *Folia Microbiologica* 25(4):332–36.
- Gonçalves, Ana, A. Gkrillas, J. áL Dorne, Chiara Dall'Asta, Roberta Palumbo, Nelson Lima, Paola Battilani, Armando Venâncio, and Paola Giorni. 2019. "Pre-and Postharvest Strategies to Minimize Mycotoxin Contamination in the Rice Food Chain." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18(2):441–54.
- Gong, Andong, Mengge Song, and Jingbo Zhang. 2024. "Current Strategies in Controlling *Aspergillus Flavus* and Aflatoxins in Grains during Storage: A Review." *Sustainability* 16(8):3171.
- Gong, Yun Yun, Sinead Watson, and Michael N. Routledge. 2016. "Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological

- Studies.” *Food Safety* 4(1):14–27.
- González-Curbelo, Miguel Ángel, and Bulent Kabak. 2023. “Occurrence of Mycotoxins in Dried Fruits Worldwide, with a Focus on Aflatoxins and Ochratoxin A: A Review.” *Toxins* 15(9):576.
- Gotah, Ahmed, Key Whang, and Coralia V Garcia. 2018. “Determination of Aflatoxins in Rice Using Quechers and Fluorescence HPLC.” *Scientific Study & Research. Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry* 19(2):133–41.
- Gouda, Mona M., Mohamed Hisham Yassin, El-Sayed M. Embaby, Marwa A. Younos, and Amira E. Sehim. 2024. “Detection of Toxigenic Fungi Associated Some Dried Fruits.” *Journal of Basic and Environmental Sciences* 11(3):219–40.
- Grenier, Bertrand, Ana-Paula Loureiro-Bracarense, John F. Leslie, and Isabelle P. Oswald. 2014. “Physical and Chemical Methods for Mycotoxin Decontamination in Maize.” *Mycotoxin Reduction in Grain Chains* 116–29.
- Guerre, Philippe. 2020. “Mycotoxin and Gut Microbiota Interactions.” *Toxins* 12(12):769.
- Gündüz, Alperen, Emine Yalçın, and Kültiğın Çavuşoğlu. 2021. “Combined Toxic Effects of Aflatoxin B2 and the Protective Role of Resveratrol in Swiss Albino Mice.” *Scientific Reports* 11(1):18081.
- Gurikar, Chennappa, D. P. Shivaprasad, Luis Sabillón, N. A. Nanje Gowda, and Kaliramesh Siliveru. 2023. “Impact of Mycotoxins and Their Metabolites Associated with Food Grains.” *Grain & Oil Science and Technology* 6(1):1–9.
- Hamad, Gamal M., Taha Mehany, Jesus Simal-Gandara, Sarah Abou-Alella, Okon J. Esua, Mosaad A. Abdel-Wahhab, and Elsayed E. Hafez. 2023. “A Review of Recent Innovative Strategies for Controlling Mycotoxins in Foods.” *Food Control* 144:109350.
- Hasan, Ghazwan Qasim, and Shimal Younis Abdulhadi. 2023. “Molecular Characterization of Wild *Pleurotus Ostreatus* (MW457626) and Evaluation of

- β -Glucans Polysaccharide Activities.” *ArXiv Preprint ArXiv:2303.06187*.
- Hassane, A. M. A., A. A. El-Shanawany, N. F. Abo-Dahab, A. M. Abdel-Hadi, U. M. Abdul-Raouf, and M. Mwanza. 2017. “Influence of Different Moisture Contents and Temperature on Growth and Production of Aflatoxin B1 by a Toxigenic *Aspergillus Flavus* Isolate in Wheat Flour.” *Journal of Ecology of Health & Environment* 5(3):77–83.
- He, Wei-Jie, Limin Zhang, Shu-Yuan Yi, Xue-Ling Tang, Qing-Song Yuan, Mao-Wei Guo, Ai-Bo Wu, Bo Qu, He-Ping Li, and Yu-Cai Liao. 2017. “An Aldo-Keto Reductase Is Responsible for *Fusarium* Toxin-Degrading Activity in a Soil *Sphingomonas* Strain.” *Scientific Reports* 7(1):9549.
- Hoog, G. S. de, Josep Guarro, JFMJ Gene, and Maria José Figueras. 2000. *Atlas of Clinical Fungi*.
- Hou, Xuwen, Liyao Liu, Dan Xu, Daowan Lai, and Ligang Zhou. 2024. “Involvement of LaeA and Velvet Proteins in Regulating the Production of Mycotoxins and Other Fungal Secondary Metabolites.” *Journal of Fungi* 10(8):561.
- Houbraken, J., Sándor Kocsubé, Cobus M. Visagie, Neriman Yilmaz, X. C. Wang, M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, and R. A. Samson. 2020. “Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and Related Genera (Eurotiales): An Overview of Families, Genera, Subgenera, Sections, Series and Species.” *Studies in Mycology* 95:5–169.
- Hussien, Saja A., and Abdul Ameer S. Saadon. n.d. “Isolation and Identification of Fungi Contaminated with Some Local and Imported Chips and the Possibility of Controlling One of the Toxin-Producing Fungi by Using *Pleurotus Ostreatus* Filtrate and Sodiumbicarbonate Treatments.” *International Journal of Health Sciences (III)*:7791–7802.
- Hyde, Kevin D., Abdullah M. S. Al-Hatmi, Birgitte Andersen, Teun Boekhout, Walter Buzina, Thomas L. Dawson Jr, Dan C. Eastwood, E. B. Gareth Jones,

- Sybren de Hoog, and Yingqian Kang. 2018. "The World's Ten Most Feared Fungi." *Fungal Diversity* 93(1):161–94.
- Iongh, H., R. K. Beerthuis, R. O. Vles, C. B. Barrett, and W. O. Ord. 1962. "Investigation of the Factor in Groundnut Meal Responsible for 'Turkey X Disease.'" *Biochimica et Biophysica Acta* 65(3):549–51.
- Ismail, Abou Elkasem M., Salah M. E. Soliman, and Mahmoud Ashry. 2024. "Therapeutic and Antioxidant Effects of Lactoperoxidase on Aflatoxin B1-Induced Nephrotoxicity in Adult Male Rats." *Egyptian Pharmaceutical Journal* 23(3):437–44.
- Ismail, Amir, Bruna L. Gonçalves, Diane V de Neeff, Bárbara Ponzilacqua, Carolina F. S. C. Coppa, Henning Hintzsche, Muhammad Sajid, Adriano G. Cruz, Carlos H. Corassin, and Carlos A. F. Oliveira. 2018. "Aflatoxin in Foodstuffs: Occurrence and Recent Advances in Decontamination." *Food Research International* 113:74–85.
- Jackson III, Lauren W., and Barry M. Pryor. 2017. "Degradation of Aflatoxin B1 from Naturally Contaminated Maize Using the Edible Fungus *Pleurotus Ostreatus*." *Amb Express* 7(1):110.
- Ji, Junmin, and Wenlei Xie. 2020. "Detoxification of Aflatoxin B1 by Magnetic Graphene Composite Adsorbents from Contaminated Oils." *Journal of Hazardous Materials* 381:120915.
- Jitendrabhai, Chaudhari Vrushankkumar. 2020. "Investigation of *Aspergillus Flavus* link Ex. Frise in Groundnut."
- Jolly, P. E., S. Inusah, B. Lu, W. O. Ellis, A. Nyarko, T. D. Phillips, and J. H. Williams. 2013. "Association between High Aflatoxin B1 Levels and High Viral Load in HIV-Positive People." *World Mycotoxin Journal* 6(3):255.
- Karlovsky, Petr, Michele Suman, Franz Berthiller, Johan De Meester, Gerhard Eisenbrand, Irène Perrin, Isabelle P. Oswald, Gerrit Speijers, Alessandro Chiodini, and Tobias Recker. 2016. "Impact of Food Processing and Detoxification Treatments on Mycotoxin Contamination." *Mycotoxin*

- Research* 32(4):179–205.
- Kassem, Aya Hussein, Mohamed Mostafa Alshaikh, Mohamed Abd-Elmonaim, and Ezz Gad Alabbasy. 2023. “Comparative Efficacy of Chemical Salts and Fungicides for Controlling Date Fruit Rots.” *Aswan University Journal of Sciences and Technology* 3(1):218–34.
- Keller, Nancy P. 2019. “Fungal Secondary Metabolism: Regulation, Function and Drug Discovery.” *Nature Reviews Microbiology* 17(3):167–80.
- Kensler, Thomas W., Bill D. Roebuck, Gerald N. Wogan, and John D. Groopman. 2011. “Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology.” *Toxicological Sciences* 120(suppl_1):S28–48.
- Khan, R., F. Anwar, and F. M. Ghazali. 2024. “A Comprehensive Review of Mycotoxins: Toxicology, Detection, and Effective Mitigation Approaches. *Heliyon*, 10 (8), E28361.”
- Khan, Rahim. 2021. *Non-Aflatoxigenic Aspergillus Flavus Control Aflatoxins*.
- Khan, Rahim, Farinazleen Mohamad Ghazali, Nor Ainy Mahyudin, and Nik Iskandar Putra Samsudin. 2020. “Morphological Characterization and Determination of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic *Aspergillus Flavus* Isolated from Sweet Corn Kernels and Soil in Malaysia.” *Agriculture* 10(10):450.
- Khare, Renu, M. K. Agarwal, Sameer S. Bhagayavant, Poonam Verma, and D. P. Nagar. 2018. “Detection of *Aspergillus Flavus* Using PCR Method from Fungus Infested Food Grains Collected from Local Market.” *Annals of Plant Sci* 7(2):2073–77.
- Kiernan, John. 2015. *Histological and Histochemical Methods*. Scion publishing ltd.
- Klich, Maren A. 2007. “*Aspergillus Flavus*: The Major Producer of Aflatoxin.” *Molecular Plant Pathology* 8(6):713–22.
- Kotinagu, Korrapati, T. Mohanamba, and L. Rathna Kumari. 2015. “Assessment of Aflatoxin B1 in Livestock Feed and Feed Ingredients by High-Performance

- Thin Layer Chromatography.” *Veterinary World* 8(12):1396.
- Kovács, Szilvia, Barbara Brendzsák, Walter P. Pfliegler, Lajos Nagy, Kamirán Áron Hamow, István Pócsi, and Tünde Pusztahelyi. 2026. “Mutations and Metabolic Factors Affecting Interaction of Toxigenic and Atoxigenic *Aspergillus Flavus*.” *Microorganisms* 14(2):473.
- Kozel, Thomas R., and Brian Wickes. 2014. “Fungal Diagnostics.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 4(4):a019299.
- Krishnan, Suganthini, Elias K. Manavathu, and Pranatharthi H. Chandrasekar. 2009. “*Aspergillus Flavus*: An Emerging Non-fumigatus *Aspergillus* Species of Significance.” *Mycoses* 52(3):206–22.
- Kumar, Abhishek, Hardik Pathak, Seema Bhadauria, and Jebi Sudan. 2021. “Aflatoxin Contamination in Food Crops: Causes, Detection, and Management: A Review.” *Food Production, Processing and Nutrition* 3(1):17.
- Kumar, Pradeep, Dipendra K. Mahato, Madhu Kamle, Tapan K. Mohanta, and Sang G. Kang. 2017. “Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management.” *Frontiers in Microbiology* 7:235289.
- Kumar, Sudhir, Glen Stecher, and Koichiro Tamura. 2016. “MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets.” *Molecular Biology and Evolution* 33(7):1870–74.
- Kushwaha, Sonu, Hemant Soni, Smriti Tandon, Gagandeep Singh, Yashika Gandhi, Vijay Kumar, Chandrashekhar Jagtap, Cheemalapati Venkata Narasimhaji, Shiddamallayya Mathapati, and Narayanam Srikanth. 2025. “Fungal Toxin (Mycotoxin): Introduction, Sources and Types, Production, Detection, and Applications.” *Food Nutrition* 1(1):100005.
- Lahouar, Amani, Sonia Marin, Ana Crespo-Sempere, Salem Saïd, and Vicente Sanchis. 2016. “Effects of Temperature, Water Activity and Incubation Time on Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production by Toxinogenic *Aspergillus Flavus* Isolates on Sorghum Seeds.” *Revista Argentina de Microbiologia* 48(1):78–85.

- Li, Huiying, Lei Xing, Muchen Zhang, Jiaqi Wang, and Nan Zheng. 2018. "The Toxic Effects of Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 on Kidney through Regulating L-proline and Downstream Apoptosis." *BioMed Research International* 2018(1):9074861.
- Li, Jing, Qing-Qing Zhi, Jie Zhang, Xiao-Yu Yuan, Li-Hong Jia, Yu-Lin Wan, Qiu-Yun Liu, Jian-Rong Shi, and Zhu-Mei He. 2021. "Synthetic Antimicrobial Agents Inhibit Aflatoxin Production." *Brazilian Journal of Microbiology* 52(2):821–35.
- Lima Schlösser, Luara Medianeira, Cristina Tonial Simões, Janine Alves Sarturi, Cristiane Rosa da Silva, Isadora Fabris Laber, Dison Stracke Pfingsten Franco, and Carlos Augusto Mallmann. 2024. "Adsorption of Aflatoxin B1 by Different Antimycotoxin Additives: Bentonite, Clinoptilolite, and Beta-Glucans Extracted from Yeast Cell Wall." *Mycotoxin Research* 40(1):111–21.
- Liu, Lina, Hongyu Jin, Lei Sun, Shuangcheng Ma, and Ruichao Lin. 2012. "Determination of Aflatoxins in Medicinal Herbs by High-performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry." *Phytochemical Analysis* 23(5):469–76.
- Liu, Mengyu, Xue Zhang, Haoni Luan, Yue Zhang, Wei Xu, Wei Feng, and Peng Song. 2024. "Bioenzymatic Detoxification of Mycotoxins." *Frontiers in Microbiology* 15:1434987.
- Liu, Qianqian, Qingmin Chen, Hu Liu, Yamin Du, Wenxiao Jiao, Fei Sun, and Maorun Fu. 2024. "Rhizopus Stolonifer and Related Control Strategies in Postharvest Fruit: A Review." *Heliyon* 10(8).
- Liu, Qiumei, Xunyang He, and Dejun Li. 2023. "Unearthing the Mechanisms Underlying Calcium Carbonate Therapies for Eliminating Pathogens during Composting." *Chemical Engineering Journal* 451:139087.
- Liu, Yan, and Felicia Wu. 2010. "Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment." *Environmental Health Perspectives* 118(6):818–24.

- Lizárraga-Paulín, Eva Guadalupe, Susana Patricia Miranda-Castro, Ernesto Moreno-Martínez, Irineo Torres-Pacheco, and Alma Virginia Lara-Sagahón. 2013. "Novel Methods for Preventing and Controlling Aflatoxins in Food: A Worldwide Daily Challenge." *Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects; Razzaghi-Abyaneh, M., Ed* 93–128.
- Logrieco, Antonio F., Sofia Chulze, Benedikt Cramer, Sarah De Saeger, Makoto Kimura, Masayo Kushiro, Peiwu Li, Ronald Maul, Antonio Moretti, and Maryam T. Noorabadi. 2026. "Global Activities of Mycotoxin Societies in Safeguarding Food and Health and Future Challenges." *Food Control* 112250.
- MacFaddin, J. F. 1985. "Media for the Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1 Williams & Wilkins." *Baltimore, MD*.
- Magnoli, A. P., M. P. Monge, R. D. Miazzo, L. R. Cavaglieri, C. E. Magnoli, C. I. Merkis, A. L. Cristofolini, A. M. Dalcero, and S. M. Chiacchiera. 2011. "Effect of Low Levels of Aflatoxin B1 on Performance, Biochemical Parameters, and Aflatoxin B1 in Broiler Liver Tissues in the Presence of Monensin and Sodium Bentonite." *Poultry Science* 90(1):48–58.
- Mahata, Pranab Kumar, Regina Sharmila Dass, Archana Pan, and Babylakshmi Muthusamy. 2022. "Substantive Morphological Descriptions, Phylogenetic Analysis and Single Nucleotide Polymorphisms of *Aspergillus* Species from *Foeniculum Vulgare*." *Frontiers in Microbiology* 13:832320.
- Mahfuz, Mustafa, Md Amran Gazi, Muttaquina Hossain, Md Rezaul Islam, Shah Mohammad Fahim, and Tahmeed Ahmed. 2020. "General and Advanced Methods for the Detection and Measurement of Aflatoxins and Aflatoxin Metabolites: A Review." *Toxin Reviews*.
- Mannaa, Mohamed, and Ki Deok Kim. 2017. "Influence of Temperature and Water Activity on Deleterious Fungi and Mycotoxin Production during Grain Storage." *Mycobiology* 45(4):240–54.
- Marasas, Walter F. O., Wentzel C. A. Gelderblom, Gordon S. Shephard, and

- Hester F. Vismer. 2008. "Mycotoxins: A Global Problem." Pp. 29–39 in *Mycotoxins: Detection methods, management, public health and agricultural trade*. CABI Wallingford UK.
- Marc, Romina Alina. 2022. "Implications of Mycotoxins in Food Safety." in *Mycotoxins and food safety-recent advances*. IntechOpen.
- Marchese, Silvia, Andrea Polo, Andrea Ariano, Salvatore Velotto, Susan Costantini, and Lorella Severino. 2018. "Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development." *Toxins* 10(6):214.
- Medina, Angel, Alicia Rodriguez, and Naresh Magan. 2014. "Effect of Climate Change on *Aspergillus Flavus* and Aflatoxin B1 Production." *Frontiers in Microbiology* 5:348.
- Meskini, Maryam, Mina Rezghi Rami, Rezvan Tavakoli, and Masoumeh Salami. 2025. "Molecular Markers in Diagnostics of Fungi and Fungal Mycotoxins: A Narrative Review." *Journal of Infection and Public Health* 103073.
- Miliordos, Dimitrios-Evangelos, Georgia V Baliota, Christos G. Athanassiou, and Pantelis I. Natskoulis. 2025. "Review on the Occurrence of Mycotoxigenic Fungi in Dried Fruits and the Role of Stored-Product Insects." *Toxins* 17(7):313.
- Mishra, Vigya, Ghan Shyam Abrol, and Neeru Dubey. 2018. "Sodium and Calcium Hypochlorite as Postharvest Disinfectants for Fruits and Vegetables." Pp. 253–72 in *Postharvest disinfection of fruits and vegetables*. Elsevier.
- Miura, Ryoji, Kenichi Furuhashi, Fumio Hasegawa, Yutaka Kaizu, and Kenji Imou. 2022. "Calcium Carbonate Prevents *Botryococcus Braunii* Growth Inhibition Caused by Medium Acidification." *Journal of Applied Phycology* 34(1):177–83.
- Moloi, Tsholofelo P., Khanyisani Ziqubu, Sithandiwe E. Mazibuko-Mbeje, Nonduduzo H. Mabaso, and Zibele Ndlovu. 2024. "Aflatoxin B1-Induced Hepatotoxicity through Mitochondrial Dysfunction, Oxidative Stress, and Inflammation as Central Pathological Mechanisms: A Review of Experimental

- Evidence.” *Toxicology* 509:153983.
- Moore, Geromy G., Jacalyn L. Elliott, Rakhi Singh, Bruce W. Horn, Joe W. Dorner, Eric A. Stone, Sofia N. Chulze, German G. Barros, Manjunath K. Naik, and Graeme C. Wright. 2013. “Sexuality Generates Diversity in the Aflatoxin Gene Cluster: Evidence on a Global Scale.” *PLoS Pathogens* 9(8):e1003574.
- Mughal, Muhammad Jameel, Xi Peng, Yi Zhou, and Jing Fang. 2016. “Aflatoxin B1 Invokes Apoptosis via Death Receptor Pathway in Hepatocytes.” *Oncotarget* 8(5):8239.
- Naguib, Yahya M., Rania M. Azmy, Rehab M. Samaka, and Mohamed F. Salem. 2014. “Pleurotus Ostreatus Opposes Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Acetaminophen-Induced Hepato-Renal Injury.” *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14(1):494.
- Naji Kermasha, Hussein Sami. 2020. “Evaluation of the Efficiency of Pleurotus Ostreatus in the Percentage of Inhibition of Fungi Aspergillus Niger, Aspergillus Flavus, Aspergillus Terreus and Penicillium Sp.” *EurAsian Journal of Biosciences* 14(2).
- Nan, Mina, Huali Xue, and Yang Bi. 2022. “Contamination, Detection and Control of Mycotoxins in Fruits and Vegetables.” *Toxins* 14(5):309.
- Navale, Vishwambar, Koteswara Rao Vamkudoth, Shanthipriya Ajmera, and Vaibhavi Dhuri. 2021. “Aspergillus Derived Mycotoxins in Food and the Environment: Prevalence, Detection, and Toxicity.” *Toxicology Reports* 8:1008–30.
- Ochieng, Peter Juma, Daniel Okun, Isac Mugenya, N. J. Njagi, and Mugai John. 2016. “In Vivo Toxicological and Histopathological Effects of Aflatoxin B1 Exposure and Related Risk.” Pp. 214–21 in *International Conference on Health and Well Being*.
- Ofori-Attah, Ebenezer, Mai Hashimoto, Mayu Oki, and Daisuke Kadowaki. 2024. “Therapeutic Effect of Natural Products and Dietary Supplements on

- Aflatoxin-Induced Nephropathy.” *International Journal of Molecular Sciences* 25(5):2849.
- Okayo, Robert O., Darius O. Andika, Mathews M. Dida, George O. K’otuto, and Bernard M. Gichimu. 2020. “Morphological and Molecular Characterization of Toxigenic *Aspergillus Flavus* from Groundnut Kernels in Kenya.” *International Journal of Microbiology* 2020(1):8854718.
- Okoth, Sheila, Marthe De Boevre, Arnau Vidal, José Diana Di Mavungu, Sofie Landschoot, Martina Kyallo, Joyce Njuguna, Jagger Harvey, and Sarah De Saeger. 2018. “Genetic and Toxigenic Variability within *Aspergillus Flavus* Population Isolated from Maize in Two Diverse Environments in Kenya.” *Frontiers in Microbiology* 9:57.
- Ortega-Beltran, Alejandro, and Ranajit Bandyopadhyay. 2023. “Aflatoxin Biocontrol in Practice Requires a Multidisciplinary, Long-Term Approach.” *Frontiers in Sustainable Food Systems* 7:1110964.
- Ostry, Vladimir, Frantisek Malir, Jakub Toman, and Yann Grosse. 2017. “Mycotoxins as Human Carcinogens—the IARC Monographs Classification.” *Mycotoxin Research* 33(1):65–73.
- Ozer, Hayrettin, Hatice Imge OKTAY BASEGMEZ, and Guner Ozay. 2012. “Mycotoxin Risks and Toxigenic Fungi in Date, Prune and Dried Apricot among Mediterranean Crops.” *Phytopathologia Mediterranea* 148–57.
- Pankaj, S. K., Hu Shi, and Kevin M. Keener. 2018. “A Review of Novel Physical and Chemical Decontamination Technologies for Aflatoxin in Food.” *Trends in Food Science & Technology* 71:73–83.
- Paulussen, Caroline, John E. Hallsworth, Sergio Álvarez-Pérez, William C. Nierman, Philip G. Hamill, David Blain, Hans Rediers, and Bart Lievens. 2017. “Ecology of Aspergillosis: Insights into the Pathogenic Potency of *Aspergillus Fumigatus* and Some Other *Aspergillus* Species.” *Microbial Biotechnology* 10(2):296–322.
- Pawlina, Wojciech, and Michael H. Ross. 2018. *Histology: A Text and Atlas: With*

- Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Peng, W. X., J. L. M. Marchal, and A. F. B. Van der Poel. 2018. "Strategies to Prevent and Reduce Mycotoxins for Compound Feed Manufacturing." *Animal Feed Science and Technology* 237:129–53.
- Perrone, Giancarlo, and Antonia Gallo. 2016. "Aspergillus Species and Their Associated Mycotoxins." *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols* 33–49.
- Pfliegler, Walter P., István Pócsi, Zoltán Győri, and Tünde Pusztahelyi. 2020. "The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions with Plants and the Soil Biota." *Frontiers in Microbiology* 10:2921.
- Pickova, Darina, Vladimir Ostry, Jakub Toman, and Frantisek Malir. 2021. "Aflatoxins: History, Significant Milestones, Recent Data on Their Toxicity and Ways to Mitigation." *Toxins* 13(6):399.
- Pinheiro, Ângela, Daryna Piontkivska, Patrícia Sequeira, Tiago M. Martins, and Cristina Silva Pereira. 2023. "Aspergillus Nidulans." *Trends in Microbiology* 31(2):212–13.
- Pinotti, Luciano, Matteo Ottoboni, Carlotta Giromini, Vittorio Dell'Orto, and Federica Cheli. 2016. "Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts." *Toxins* 8(2):45.
- Pinto, M., E. Gencale, and M. Rossi. 2001. "Study of Some Plant Oils Effect on Aspergillus Flavus Growth on Corn." *Brazilian Journal of Microbiology*. 7(1):32–127.
- Pitt, John I., and Ailsa D. Hocking. 2022. "Ecology of Fungal Food Spoilage." Pp. 3–12 in *Fungi and food spoilage*. Springer.
- Pitt, John I., and Ailsa Diane Hocking. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Vol. 519. Springer.
- Pitt, John I., and J. David Miller. 2017. "A Concise History of Mycotoxin Research." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(33):7021–33.
- Pleadin, Jelka, Jurislav Babić, Ana Vulić, Nina Kudumija, Krunoslav Aladić, Maja

- Kiš, Vesna Jaki Tkalec, Mario Škrivanko, Marica Lolić, and Drago Šubarić. 2019. "The Effect of Thermal Processing on the Reduction of Deoxynivalenol and Zearalenone Cereal Content." *Croatian Journal of Food Science and Technology* 11(1):44–51.
- Plewa-Tutaj, Kinga, Magdalena Twarużek, Robert Kosicki, and Ewelina Soszczyńska. 2024. "Analysis of Mycotoxins and Cytotoxicity of Airborne Molds Isolated from the Zoological Garden—Screening Research." *Pathogens* 13(4):294.
- Prakash, Bhanu, Akash Kedia, Prashant Kumar Mishra, and N. K. Dubey. 2015. "Plant Essential Oils as Food Preservatives to Control Moulds, Mycotoxin Contamination and Oxidative Deterioration of Agri-Food Commodities—Potentials and Challenges." *Food Control* 47:381–91.
- Qiu, Mei, Yaling Wang, Lijun Sun, Qi Deng, and Jian Zhao. 2021. "Fatty Acids and Oxylipins as Antifungal and Anti-Mycotoxin Agents in Food: A Review." *Toxins* 13(12):852.
- Rafai, Sarra, Alessandra Cimbalo, and Lara Manyes. 2025. "Evaluation of Dietary Bioactive Agents Against Aflatoxin B1 and Ochratoxin A-Induced Duodenal Toxicity in Rats." *Foods* 14(10):1793.
- Rahmani, A., S. Jinap, and F. Soleimany. 2009. "Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(3):202–51.
- Rai, Mahendra, and Ajit Varma. 2010. *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer.
- Ramadan, Nadeem A., and Hadeel A. Al-Ameri. 2022. "Aflatoxins." in *Aflatoxins-occurrence, detoxification, determination and health risks*. IntechOpen.
- Rawal, Sumit, Ji Eun Kim, and Roger Coulombe Jr. 2010. "Aflatoxin B1 in Poultry: Toxicology, Metabolism and Prevention." *Research in Veterinary Science* 89(3):325–31.
- Reddy, K. R. N., Baharuddin Salleh, Bahruddin Saad, H. K. Abbas, C. A. Abel,

- and W. T. Shier. 2010. "An Overview of Mycotoxin Contamination in Foods and Its Implications for Human Health." *Toxin Reviews* 29(1):3–26.
- Rudramurthy, Shivaprakash M., Raees A. Paul, Arunaloche Chakrabarti, Johan W. Mouton, and Jacques F. Meis. 2019. "Invasive Aspergillosis by *Aspergillus Flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management." *Journal of Fungi* 5(3):55.
- Rushing, Blake R., and Mustafa I. Selim. 2019. "Aflatoxin B1: A Review on Metabolism, Toxicity, Occurrence in Food, Occupational Exposure, and Detoxification Methods." *Food and Chemical Toxicology* 124:81–100.
- Saber, Hadjer, Yahia Chebloune, and Abdallah Moussaoui. 2022. "Molecular Characterization of *Aspergillus Flavus* Strains Isolated from Animal Feeds." *Polish Journal of Microbiology* 71(4):589.
- Sadowska, Anna, Daria Włosek-Pawelas, and Halina Car. 2026. "Medicinal Mushrooms and Their Bioactive Compounds: From Traditional Use to Therapeutic Potential." *Molecules* 31(10):1749.
- Samson, Robert A. 2011. "Ecology and General Characteristics of Indoor Fungi." Pp. 101–16 in *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*. Wageningen Academic.
- Samson, Robert A., Jos Houbraeken, Ulf Thrane, Jens C. Frisvad, and Birgitte Andersen. 2019. *Food and Indoor Fungi*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
- Samson, Robert A., Cobus M. Visagie, Jos Houbraeken, S. B. Hong, Vit Hubka, Corné H. W. Klaassen, Giancarlo Perrone, Keith A. Seifert, Antonella Susca, and Joey B. Tanney. 2014. "Phylogeny, Identification and Nomenclature of the Genus *Aspergillus*." *Studies in Mycology* 78(1):141–73.
- Sanchis, V., and N. Magan. 2004. "Environmental Conditions Affecting Mycotoxins." *Mycotoxins in Food: Detection and Control* 174–89.
- Santos Alexandre, Allana Patricia, Rafael Segundo Vela-Paredes, Amanda Silva Santos, Naiara Silva Costa, Solange Guidolin Canniatti-Brazaca, Maria

- Antonia Calori-Domingues, and Pedro Esteves Duarte Augusto. 2018. "Ozone Treatment to Reduce Deoxynivalenol (DON) and Zearalenone (ZEN) Contamination in Wheat Bran and Its Impact on Nutritional Quality." *Food Additives & Contaminants: Part A* 35(6):1189–99.
- Shabeer, Saba, Shahzad Asad, Atif Jamal, and Akhtar Ali. 2022. "Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review." *Toxins* 14(5):307.
- Shaltout, F. A., G. I. Heikal, and A. M. Ghanem. 2022. "Molecular Detection of Aflatoxin Producing Aspergillus Species Isolates in Some Chicken Meat Cuts in Gharbiya Governorate, Egypt." *Nutrition and Food Processing* 5(1):1–6.
- Shekhar, Ravikant, Vinay B. Raghvendra, and P. Rachitha. 2025. "A Comprehensive Review of Mycotoxins, Their Toxicity, and Innovative Detoxification Methods." *Toxicology Reports* 101952.
- Singh, Amanpreet, Jeewanjot Singh, and Sandeep Kumar. 2025. "Aspergillosis: A Comprehensive Review of Pathogenesis, Drug Resistance, and Emerging Therapeutics." *Journal of Food and Drug Analysis* 33(2):75.
- Smith, Laura E., Andrew J. Prendergast, Paul C. Turner, Jean H. Humphrey, and Rebecca J. Stoltzfus. 2017. "Aflatoxin Exposure during Pregnancy, Maternal Anemia, and Adverse Birth Outcomes." *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96(4):770.
- Smith, Marie-Caroline, Stéphanie Madec, Emmanuel Coton, and Nolwenn Hymery. 2016. "Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in Vitro Combined Toxicological Effects." *Toxins* 8(4):94.
- Sohrabi, Nooshin, and Morteza Taghizadeh. 2018. "Molecular Identification of Aflatoxigenic Aspergillus Species in Feedstuff Samples." *Current Medical Mycology* 4(2):1.
- St-Germain, Guy, and Richard Summerbell. 2003. "Identifying Filamentous Fungi: A Clinical Laboratory Handbook."
- Sugui, Janyce A., Kyung J. Kwon-Chung, Praveen R. Juvvadi, Jean-Paul Latgé,

- and William J. Steinbach. 2015. "Aspergillus Fumigatus and Related Species." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(2):a019786.
- Sullivan, Valerie K., Muzi Na, David N. Proctor, Penny M. Kris-Etherton, and Kristina S. Petersen. 2021. "Consumption of Dried Fruits Is Associated with Greater Intakes of Underconsumed Nutrients, Higher Total Energy Intakes, and Better Diet Quality in US Adults: A Cross-Sectional Analysis of the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007-2016." *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics* 121(7):1258–72.
- Sun, Shih Hui, Su Jin Kim, Soo Jin Kwak, and Ki Sun Yoon. 2012. "Efficacy of Sodium Hypochlorite and Acidified Sodium Chlorite in Preventing Browning and Microbial Growth on Fresh-Cut Produce." *Preventive Nutrition and Food Science* 17(3):210.
- Syraji, Yonas, P. R. Jeyaramraja, Tanje Mada, and K. Gobikanila. 2025. "Comprehensive Review of Aflatoxin Contamination, Its Occurrence, Effects, Management, and Future Perspectives." *Discover Food* 5(1):1–29.
- Tahir, Nasir Ishaque, Shabbir Hussain, Mohsin Javed, Hajira Rehman, Tanzeela Gulab Shahzady, Bushra Parveen, and Kalsoom Ghulam Ali. 2018. "Nature of Aflatoxins: Their Extraction, Analysis, and Control." *Journal of Food Safety* 38(6):e12561.
- Taniwaki, M. H., A. D. Hocking, J. I. Pitt, and G. H. Fleet. 2009. "Growth and Mycotoxin Production by Food Spoilage Fungi under High Carbon Dioxide and Low Oxygen Atmospheres." *International Journal of Food Microbiology* 132(2–3):100–108.
- Tian, Fei, Sang Yoo Lee, So Young Woo, Hwa Young Choi, Seongeun Heo, Gyoungju Nah, and Hyang Sook Chun. 2021. "Transcriptomic Responses of Aspergillus Flavus to Temperature and Oxidative Stresses during Aflatoxin Production." *Scientific Reports* 11(1):2803.
- Vamanu, Emanuel. 2012. "In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Ethanolic Extract of Lyophilized Mycelium of Pleurotus Ostreatus

- PQMZ91109.” *Molecules* 17(4):3653–71.
- Velazhahan, Rethinasamy, Abdullah Mohammed Al-Sadi, Mostafa I. Waly, Sathish Babu Soundra Pandian, Jamal Al-Sabahi, and Khalid Al-Farsi. 2024. “Aflatoxin B1 Detoxification and Antioxidant Effect of Selected Omani Medicinal Plants against Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress Pathogenesis in the Mouse Liver.” *Applied Sciences* 14(13):5378.
- Venmathi Maran, Balu Alagar, Mohammad Iqbal, Prakash Gangadaran, Byeong-Cheol Ahn, Pasupuleti Visweswara Rao, and Muhammad Dawood Shah. 2022. “Hepatoprotective Potential of Malaysian Medicinal Plants: A Review on Phytochemicals, Oxidative Stress, and Antioxidant Mechanisms.” *Molecules* 27(5):1533.
- Voth-Gaeddert, Lee E., Matthew Stoker, Olga Torres, and Daniel B. Oerther. 2018. “Association of Aflatoxin Exposure and Height-for-Age among Young Children in Guatemala.” *International Journal of Environmental Health Research* 28(3):280–92.
- Wagacha, J. M., and J. W. Muthomi. 2008. “Mycotoxin Problem in Africa: Current Status, Implications to Food Safety and Health and Possible Management Strategies.” *International Journal of Food Microbiology* 124(1):1–12.
- Wilfinger, William W., Karol Mackey, and Piotr Chomczynski. 1997. “Effect of PH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity.” *Biotechniques* 22(3):474–81.
- Williams, Jonathan H., Timothy D. Phillips, Pauline E. Jolly, Jonathan K. Stiles, Curtis M. Jolly, and Deepak Aggarwal. 2004. “Human Aflatoxicosis in Developing Countries: A Review of Toxicology, Exposure, Potential Health Consequences, and Interventions.” *The American Journal of Clinical Nutrition* 80(5):1106–22.
- Wu, Felicia. 2021. “Foodborne Mycotoxins.” Pp. 439–54 in *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier.
- Wu, Jun, Ruohong Chen, Caihui Zhang, Kangbai Li, Weiying Xu, Lijuan Wang,

- Qingmei Chen, Peiqiang Mu, Jun Jiang, and Jikai Wen. 2016. "Bioactivation and Regioselectivity of Pig Cytochrome P450 3A29 towards Aflatoxin B1." *Toxins* 8(9):267.
- Xue, Mengyao, Zheng Qu, Antonio Moretti, Antonio F. Logrieco, Haiyan Chu, Qi Zhang, Changpo Sun, Xianfeng Ren, Li Cui, and Qinglin Chen. 2025. "Aspergillus Mycotoxins: The Major Food Contaminants." *Advanced Science* 12(9):2412757.
- Yang, Jinyi, Jing Li, Yueming Jiang, Xuewu Duan, Hongxia Qu, Bao Yang, Feng Chen, and Dharini Sivakumar. 2014. "Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and Their Processed Products." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(1):64–83.
- Yao, Jiayi, Binbin Ouyang, Wei Xu, Yanli Xie, and Wanmeng Mu. 2025. "An Overview of the Physical, Chemical and Biological Strategies for the Removal of Emerging Mycotoxins: Recent Advances and Future Perspectives." *Food Control* 111700.
- Yassein, Sh N., and Z. R. Zghair. 2012. "Study of Toxicity and Pathogenicity of Aflatoxin B1 and G1 in Mice." *Al-Anbar J. Vet. Sci* 5(1):23.
- Yazdanpanah, Hassan, Tayyebbeh Mohammadi, Giti Abouhossain, and A. Majid Cheraghali. 2005. "Effect of Roasting on Degradation of Aflatoxins in Contaminated Pistachio Nuts." *Food and Chemical Toxicology* 43(7):1135–39.
- Yemisi Adefunke, Jeff-Agboola, Sipasi Kate Oluwakanyinsola, Oke Emmanuel Kehinde, Jeff-Agboola Excel Oluwajomiloju, and Oladebeye Abraham Olasupo. 2023. "Occurrence of Aflatoxins in Nigerian Foods: A Review." *Hrvatski Časopis Za Prehrambenu Tehnologiju, Biotehnologiju i Nutricionizam* 18(1–2):29–36.
- Yu, Jiujiang. 2012. "Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination." *Toxins* 4(11):1024–57.
- Yu, Jiujiang, and Kenneth C. Ehrlich. 2011. *Aflatoxin Biosynthetic Pathway and Pathway Genes*. INTECH Open Access Publisher London, UK.

- Zapaśnik, Agnieszka, Marcin Bryła, Barbara Sokołowska, and Agnieszka Waśkiewicz. 2025. "Pleurotus Spp.—an Effective Way in Degradation Mycotoxins? A Comprehensive Review." *Mycotoxin Research* 41(1):1–13.
- Zapaśnik, Agnieszka, Marcin Bryła, Adrian Wojtczak, and Barbara Sokołowska. 2025. "In Vivo Effectiveness of Pleurotus Ostreatus in Degradation of Toxic Metabolites of Filamentous Fungi Such as Aflatoxin B1 and Zearalenone." *Metabolites* 15(1):20.
- Zar, Jerrold H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Pearson Education India.
- Zhang, Zhi-Hong, Lang-Hong Wang, Xin-An Zeng, Zhong Han, and Charles S. Brennan. 2019. "Non-Thermal Technologies and Its Current and Future Application in the Food Industry: A Review." *International Journal of Food Science and Technology* 54(1):1–13.
- Zhao, Qingchun, Xiaopeng Liu, Lili Cui, and Changyang Ma. 2024. "Extraction and Bioactivities of the Chemical Composition from Pleurotus Ostreatus: A Review." *Journal of Future Foods* 4(2):111–18.
- Zhu, Bo, Yongzhe Li, Tao Hu, and Yan Zhang. 2019. "The Hepatoprotective Effect of Polysaccharides from Pleurotus Ostreatus on Carbon Tetrachloride-Induced Acute Liver Injury Rats." *International Journal of Biological Macromolecules* 131:1–9.
- Zulfiqar, Sana, Fatima Tariq, Kausar Perveen, Nosheen Ayub, Saira Mansab, Syeda Qamar Batool, M. Abbasi, Shazia Iram, and Noshaba Tabassum. 2015. "Mycotoxins Analysis in Fresh and Dry Fruits from Pakistan—A Review." *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci* 15:2538–45.

Summary:-

Aflatoxins, particularly aflatoxin B1 (AFB1), are among the most dangerous mycotoxins produced by certain species of the genus *Aspergillus*, especially *Aspergillus flavus*. These toxins can contaminate fresh and dried fruits under unsuitable storage conditions. Their danger lies in their toxic effects, particularly on the liver and kidneys, which can lead to disruptions in vital signs and histological changes in affected tissues.

Therefore, the current study focused on isolating and identifying the fungi associated with local and imported fresh and dried fruits, detecting aflatoxin B1-producing fungi and quantifying its levels, investigating its in vitro, biological, and histological effects, and evaluating the potential for mitigating its effects using *Pleurotus ostreatus* filtrate and calcium carbonate. Fig, grape, and apricot samples were collected from various locations in the city center of Diwaniyah and the districts of Al-Shamiya and Afak between February and July 2025. The fungi associated with the samples were isolated and identified morphologically and microscopically. The isolated fungal species were: *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium expansum*, *A. parasiticus*, *Rhizopus stolonifer*, *P. italicum*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, and *Alternaria alternata*. The calculation of the relative frequency of these species revealed significant differences. *A. niger* recorded the highest frequency (17.72%) and (20.29%), while *A. flavus* had a frequency of (15.8%) and (17.99%) in non-sterile and sterile samples, respectively. The most frequently occurring isolates capable of producing aflatoxin B1 were then selected for further testing. Molecular identification of *A. flavus* isolates was performed using polymerase chain reaction (PCR), followed by nucleotide sequence analysis and phylogenetic tree analysis to compare the studied isolates with global isolates registered in the NCBI database. PCR also detected the genes associated with aflatoxin biosynthesis, namely *aflR*, *aflP*, and *aflD*. The nucleotide sequence analysis showed a high degree of match. The correlation ranged from 98.37% to 100% between *A. flavus* isolates and the aflatoxin synthesis genes under

Summary

study and the reference sequences recorded in the genetic database. To investigate the ability of the fungal isolates to produce aflatoxin B1 (AFB1) and to determine its concentration, high-performance liquid chromatography (HPLC) was used. The results showed that the highest AFB1 concentration (215.9 ppb) was recorded in an *A. flavus* isolate isolated from unsterilized dried grape samples.

The *P. ostreatus* was used as a biological control and calcium carbonate (CaCO_3) as a chemical control to inhibit the growth of the contaminated fungus in the solid and liquid culture media used for culturing the toxic *A. flavus* fungus and to reduce the toxic effect of AFB1 on laboratory white mice. When *P. ostreatus* filtrate was used as a biological control, it was found to have antagonistic activity. Against the fungus *A. flavus*, the study showed that *P. ostreatus* filtrate significantly reduced radial growth and dry weight when tested on the poisonous fungus *A. flavus* in solid (PDA) and liquid (PDB) media. The effect of the *P. ostreatus* filtrate increased with increasing concentration.

The effect of calcium carbonate (CaCO_3) on radial growth in solid (PDA) media and dry weight in liquid (PDB) media was also studied. The results showed that calcium carbonate effectively inhibited the radial growth and dry weight of the poisonous fungus *A. flavus*. The results indicated that the rate of inhibition of the poisonous fungus *A. flavus* increased with increasing calcium carbonate concentration.

A synergistic effect test was also conducted between *P. ostreatus* filtrate and calcium carbonate (CaCO_3) on the radial growth and dry weight of the poisonous fungus *A. flavus*. The results indicated that the average diameter of *A. flavus* colonies decreased significantly at a concentration of 30. The concentration of the *P. ostreatus* filtrate was 30 mg/ml, with an inhibition rate of 74.8% in solid media. The dry weight inhibition rate at 30 mg/ml in liquid media was 70.8%. The inhibition rate increased with increasing concentrations of calcium carbonate and *P. ostreatus* filtrate due to a synergistic effect. The results showed that administering the filtrate of the toxic mushroom *A. flavus* to male white laboratory

Summary

mise led to significant differences in the animals' weights ten days post-administration, and these differences were also observed before sacrifice. The filtrate also affected the levels of the liver enzymes Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartate Aminotransferase (AST), and Alkaline phosphatase (ALP), which reached 281.3, 194.4, and 152.7 U/L, respectively, while the levels of the same enzymes in the control group were 120.8, 85.6, and 34.9 U/L. Consecutive.

The results indicated that the *A. flavus* fungal filtrate caused histological changes, including the loss of the normal hepatocyte structure. The cells were no longer arranged in cords separated by hepatic sinuses and did not radiate from the central vein. Hematogenesis and necrosis of hepatocytes were observed in some areas, along with slight lymphocytic infiltration in the portal vein. In contrast, the control group showed no pathological changes in liver cells or tissues, exhibiting the normal histological structure of hepatocytes arranged in cords separated by hepatic sinuses and radiating from the central vein.

Kidney function tests (creatinine and urea) and serum tests for total protein and bilirubin levels in laboratory mice revealed significant differences in levels in mice injected with *A. flavus* filtrate. Creatinine, urea, total protein, and bilirubin levels were 0.88 mg/dL, 72.1 mg/dL, 4.9 g/dL, and 1.24 mg/dL, respectively, compared to the control group, whose levels were 0.41 mg/dL, 38.8 mg/dL, 6.8 g/dL, and 0.30 mg/dL, respectively.

This indicates widespread degeneration of the renal tubular lining cells and enlargement of Bowman's capsule space surrounding the glomerulus, along with severe hemorrhage. These changes are attributed to the effect of aflatoxin B1 on kidney cells and tissues. In contrast, the control group showed no pathological changes in kidney cells and tissues. The normal kidney structure consisted of a normal round glomerulus surrounded by Bowman's capsule and proximal and distal convoluted tubules lined with cuboidal cells.

The group treated with *A. flavus* and *P. ostreatus* filtrate exhibited normal renal

Summary

tubules and epithelial cells, with slight phagocytic cell infiltration and hypertrophy, as well as slight shedding of some tubular lining cells. In the group treated with *A. flavus* filtrate and calcium carbonate, changes included marked dilation of the convoluted tubules, increased hypertrophy of tubular lining cells, and congestion in multiple areas. The results for the laboratory group treated with *A. flavus* filtrate, *P. ostreatus* filtrate, and calcium carbonate showed very slight epithelial necrosis and minimal hypertrophy compared to the aforementioned groups. The glomerulus appeared normal, and no hemorrhage or congestion was observed. This result indicates the ability of *P. ostreatus* filtrate, when used with calcium carbonate, to inhibit the toxic effects of *A. flavus*, *P. ostreatus* filtrate. The interaction of these two substances is highly effective in reducing the effects of mycotoxins on liver and kidney tissues in laboratory animals.

infiltration and hypertrophy, as well as slight shedding of some tubular lining cells. In the group treated with *A. flavus* filtrate and calcium carbonate, changes included marked dilation of the convoluted tubules, increased tubular lining cell hypertrophy, and congestion in multiple areas. The results for the laboratory group treated with *A. flavus* filtrate, *P. ostreatus* filtrate, and calcium carbonate showed very slight epithelial necrosis and minimal hypertrophy compared to the previously mentioned groups. The glomeruli appeared normal, and no hemorrhage or congestion was observed.

This result suggests that *P. ostreatus* filtrate, when used in combination with calcium carbonate, can inhibit the effects of *A. flavus* filtrate on the liver and kidney tissues of laboratory animals. Based on the above, it is clear that *P. ostreatus* filtrate and calcium carbonate can reduce the toxic effects of *A. flavus*. The interaction between *P. ostratus* filtrate and calcium carbonate also has an effect on the toxic *A. flavus* fungus, and the reaction of these two substances is highly effective in reducing mycotoxins that cause liver and kidney damage in laboratory animals.

Summary

**The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
AL-Qadisiya University
College of Science
Biology Department**



**Toxigenic Potential and Morphological and Molecular
Characterization of Aflatoxin-Producing *Aspergillus flavus* Isolates
Isolated from Some Fresh and Dried Fruits and the Possibility of
Controlling Them**

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science, Al-Qadisiyah as
partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctorate of
Philosophy in Biology/Microbiology

By

Adnan Mohammed Malhan

M.Sc of Biology/ University of AL-Qadisiya /2021

Supervised by

Prof.Dr. Abdul- ameer S. Saadon

2026 A.D.

1448 A.H.