مجلــة الكوفــة للعلــوم الزراعيــة 9 (3) : 138 – 155 2017

تقييم كفاءة المبيد الحيوي Baiarovin في تثبيط نمو عزلة الفطر *Aspergillus flavus* والقدرة على انتاج سم Aflatoxin B_1

صادق محمد علي

قسم وقاية النبات. كلية الزراعة .جامعة الكوفة .جمهورية العراق

المستخلص

هـدفت هـذه الدراسـة الـى عـزل الفطريـات المنتجـة للسـموم الفطريـة مـن الـرز والحـد مـن تواجـد هـذه الفطريـات والتقليـل مـن اثارهـا السـامة. أظهـرت نتـائج عـزل الفطريـات مـن الـرز وجـود 4 أنـواع مـن الفطريـات تابعـة إلـى 3 أجنـاس وهـي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Rhizopus*. واتضـح إن هنـاك سـيادة للفطـر *A. flavus* يليـه الفطـر *A. niger* ثـم الفطـرين *Penicillium* و *Rhizopus* . إذ بلغـت نسـبة ترددهـا 43.18 ،32.95 ،15.9 ، 7.95 % علـى التتـالي فـي حـين بلغـت نسـبة الظهـور 100 ،80 ،33.33 ،20 % علـى التـوالي .وبـين الكشـف الكيميـائي عـن سـموم الافلاتوكسـينات بطريقـة أختبـار الامونيـا لعـزلات الفطـر *A. flavus* والمعزولـة مـن الـرز أن 23 عزلـة مـن مجمـوع 38 عزلـة مـن الفطـر *A. flavus* وبنسـبة 60.52 % قـادرة علـى انتـاج الافلاتوكسـين B_1 مـن خـلال تغيـر لـون قاعـدة وسـط جـوز الهنـد المنمـى عليهـا عـزلات الفطـر . وعنـد أسـتعمال طريقـة كروماتوكرافيـا الطبقـة الرقيقـة Thin Layer Chromatgraphy (TLC) وجـد ان 14 عزلـة قـادرة علـى انتـاج الافلاتوكسـين B_1 مـن اصـل 38 عزلـة مـن الفطـر *A. flavus* وبنسـبة 36.84 % .واظهـرت النتـائج تـاثير المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي تثبـيط نمـو الفطـر *A. flavus* اذ ارتفعـت نسـبة التثبـيط بزيـادة التركيـز وكانـت أعلـى نسـبة تثبـيط عنـد التركيـز 1غـم .100مـل$^{-1}$ والـذي بلـغ 56.86%، وبلغـت نسـبة التثبـيط فـي التركيـز 0.1 و 0.5 (51.76و54.84%) علـى الترتيـب. وكـذلك تبـين النتـائج كفـاءة إضـافة المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي اختـزال سـم الافلاتوكسـين B_1 المنـتج مـن قبـل الفطـر *A. flavus* وقـد تباينـت كفـاءة الاختـزال المقـدرة بجهـاز Spectrophotometer حيـث تفوقـت معاملـة 1 غـم .100مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PD معنويـاً فـي اختـزال السـم بنسـبة 81.72 % مقارنـة بمعاملـة 0.1 ،0.5 غـم .100 مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PD إذ بلغت نسبة الاختزال 70.96 و77.41% على الترتيب .

. الكلمات المفتاحية (الرز ،السموم الفطرية ،المبيد الحيوي بايروفين ، الفطر*A. flavus*)

المقدمة

تعد السموم الفطرية مشكلة مهمة في كافة انحاء العالم كونها تؤثر في الصحة العامة ،و تتسبب في إحداث تأثيرات مزمنة في الغالب فضلاً عن احداثها لتأثيرات حادة في حال التعرض لها بجرعات عالية خاصة الكبد والكلية والجهاز المناعي مسبباً أمراض الفشل الكلوي وسرطانات الكبد وضعف الجهاز المناعي(27). ومن اكثر الفطريات إنتاجا للسموم الفطرية هي بعض انواع الفطريات *Aspergillus* و*Penicillium* و *Alternaria* و*Fusarium*. وهذه تنمو على عدد من المنتجات الغذائية وتنتج السموم الفطرية(13). أستعملت عدة وسائل منها الوسائل الفيزياوية كالحرارة الجافة لغرض خفض المحتوى الرطوبي للحبوب الاقتصادية كالذرة والحنطة والشعير وغيرها كما استعملت بعض المواد الكيمياوية لإزالة الافلاتوكسينات من الأغذية عند تلوثها واهم هذه المواد نترات الامونيا (3). كما استعملت الطرق البايولوجية والمتمثلة بتوظيف بعض الإحياء المتوطنة في التربة لحماية الحبوب والاغذية المصنعة من الإصابات الفطرية في المخازن وحظيت بعض أنواع جنس البكتريا *Pseudomonas* ولا سيما بكتريا *Ps. fluorescens* بأهتمام كبير من قبل الباحثين لما تمتلكه من صفات المايكروب الصناعي الناجح والحال ينطبق على بكتريا *B. subtilis* حيث استخدما هذين النوعين في تصنيع مستحضرات حيوية اثبت كفاءة جيدة في حماية بذور الذرة الصفراء والحنطة من الإصابة بالفطريات المخزنية وخاصة جنس *Aspergillus* . فقد اوضحت أحدى الدراسات أن المستحضر الحيوي الباسلين أستعمل في حماية حبوب الحنطة المخزنة من الإصابة بالفطرين *A. flavus* و *A. niger* ولمدة أربعة أشهر إذ بلغت معدل نسبة الإصابة 0 % عند التركيز 40 غم / كغم مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 90 % (8). وجدت دراسة أخرى أن المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* وفر حماية لحبوب الذرة الصفراء *Zea mays L.* في المخزن من الإصابة بالفطرين *A. flavus* و*A. niger* وبنسبة تراوحت بين 95 % 85 -بعد مرور مدة خزن 6 أشهر من الخزن(7).

المواد وطرائق العمل Material and Methods

جمع عينات الرز

تم الحصول على (15) عينة من الرز صنف ياسمين من الأسواق المحلية في الكوفة (للمدة 2-6/9/ 2016) من عدة مواقع وبواقع 1 كغم. لغرض الحصول على العزلات الفطريات المنتجة للسموم ثم نقلت الى مختبر المبيدات في كلية الزراعة –جامعة الكوفة لعزل الفطريات المرافقة لتلك العينات وتشخيصها.

تحضير الأوساط الزراعية

وسـط البطاطـا دكسـتروز اكـار Potato Dextrose Agar (P.D.A.)

تـم تحضـير الوسـط بأخـذ 200 غـم مـن درنـات البطاطـا المقشـرة والمقطعـة إلـى قطـع صـغيرة وغليهـا بالمـاء المقطـر بحجـم 500 سـم^3 لمـدة 20-30 دقيقـة فـي دورق زجـاجي وبعـد انتهـاء مـدة الغليـان رشـح المخلـوط بوسـاطة قطعـة مـن الشـاش للحصـول علـى المسـتخلص اذيـب 20 غـم مـن سـكر الدكسـتروز و17 غـم مـن الآكـار فـي 500 مـل اخـرى ثـم اضـيف اليهـا راشـح البطاطـا واكمـل الحجـم الـى 1 لتـر ، وزع فـي دوارق زجاجيـة حسـب الحاجـة واغلقـت باحكـام بسـدادات قطـن وعقمـت بوسـاطة المؤصـدة بدرجـة حـرارة 121 م° وضـغط 15 باونـد .انـج$^{-2}$ لمـدة 20 دقيقـة ، وبعـد انتهـاء مـدة التعقـيم تركـت الـدوارق لتبـرد واضـيف اليـه المضـاد الحيـوي كلورامفينكـول بمقـدار 250 ملغم.لتـر$^{-1}$ قبـل ان يتصـلب الوسـط ثـمُ صـب فـي الاطباق البترية (15).

وسط اكار مستخلص جوز الهند

حُضـر الوسـط بأخـذ 100غـم مـن مبـروش جـوز الهنـد ثـم أضـيف اليـه 300مـل مـن المـاء المقطـر وسُـخن المـزيج مـدة 20دقيقـة ، بعـدها رشـح المـزيج بوسـاطة قطعـة (شـاش) نظيفـة وأضـيف الـى الراشـح 1.5% اكـار واكمـل الحجـم الـى 300 مـل مـن المـاء المقطـر وعقـم الوسط بالاسلوب نفسه في الفقرة السابقة(17).

عزل الفطريات المرافقة للرز وتشخيصها

جلبـت عينـات الـرز مـن الاسـواق المحليـة مـن محافظـة بابـل (الكفـل) وتـم العـزل منهـا بطريقـة الـزرع المباشـر علـى وسـط PDA ، وتـم تعقيمهـا سـطحيا بمحلـول هـايبوكلورات الصـوديوم تركيـز 2% مـدة دقيقتـين بعـدها تـم غسـل تلـك القطـع بالمـاء المقطـر المعقـم ثـم وضـعت علـى اوراق ترشـيح للـتخلص مـن المـاء الحـر ثـم زرعـت فـي أطبـاق بلاسـتيكية (قطـر9 سـم) تحتـوي علـى وسـط PDA وذلـك بوضـع أربـع حبـات علـى بعـد 3سـم عـن حافـة الطبـق و خامسـة فـي وسـط الطبـق، وكـررت العمليـة ثـلاث مـرات (مكـررات)، بعـدها حضـنت الأطبـاق جميعـا تحـت درجـة حـرارة 25مْ مـدة ثـلاث أيـام و بعـد أنتهـاء مـدة الحضـن تـم تنقيـة عـزلات الفطريـات الناميـة ثـم شخصـت اسـتنادا للصـفات التصـنيفيه التـي ذكرهـا كـل مـن Rapper وFennell ،Domsch واخـرون ، Hocking و Pitt (26 ؛ 18 ؛ 20) .

وتـم حسـاب نسـب الظهـوروالتردد للفطريـات على وفق المعادلتين التاليتين :

$$\text{النسبة المئوية للظهور}(\%) = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

$$\text{النسبة المئوية للتردد } (\%) = \frac{\text{عدد عزلات النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي لعزلات جميع الفطريات}} \times 100$$

الكشف عن قدرة عزلات الفطر *A.flavus* على إنتاج سم الأفلاتوكسين B_1

الكشف عن الأفلاتوكسينات بطريقة المعاملة بالأمونيا:

تم اجراء الكشف عن قدرة عزلات الفطر *A.flavus* المعزولة من الرز المختبرة على انتاج الافلاتوكسين B_1 باستخدام طريقة Dianese وLin (17) وذلك باستعمال وسط جوز الهند، إذ تم تحضير الوسط بحسب ماجاء في الفقرة 2-2- ب ثم صب الوسط في أطباق قطر كل منها 9سم ثم لقحت 3 اطباق بأقراص من الفطر لكل عزلة ،وذلك بوضع قرص بقطر 5ملم من وسط PDA المنمى عليه الفطر وبعمر أسبوع واحد في مركز الطبق وهكذا كررت العملية لجميع العزلات المدروسة ثم وضعت جميع الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25 مْ ومدة اسبوع ،بعدها تم الكشف عن قدرة عزلات الفطر على إنتاج الأفلاتوكسينات وذلك باستعمال محلول الأمونيا 20% من خلال وضع اوراق ترشيح مشبعة بمحلول الأمونيا في غطاء الطبق الذي يحتوي على عزلة الفطر النامي بوسط جوز الهند ثم حضنت ألأطباق بصورة مقلوبة ولمدة يومان في درجة حرارة 25م فتغير لون قواعد المستعمرات من اللون الشفاف الى اللون الوردي أو الأحمر يدل على إن هذه العزلة قادرة على إنتاج الأفلاتوكسينات .

الكشف عن الافلاتوكسينات باستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC)

تم تنمية عزلات الفطر *A. flavus* على وسط (PDA) وذلك بوضع أقراص من الفطر وبقطر 5 ملم بعمر أسبوع في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث مرات (مكررات) لكل عزلة فطرية بعدها حضنت عند درجة حرارة 30م° ± 2 م° لمدة أسبوع بعدها اختير طبق من كل عزلة وتم تقطيع الوسط الزراعي المنمى عليه عزلة الفطر بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بواسطة إبرة معقمة إلى خلاط كهربائي حاوي على 20مل من الكلوروفورم ثم مزج الخليط لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ثم أخذ الراشح ووضع في دورق نظيف ومعقم ووضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40م^{o} حتى تجف ، بعدها أذيب في 1 مل من الكلوروفورم ،تم الكشف عن وجود الافلاتوكسين B_1 , باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة(TLC) ذات إبعاد 20×20 سم

حيـث نشـطت الصـفائح فـي الفـرن الكهربـائي بدرجـة (105) م° لمـدة سـاعة قبـل الاسـتعمال (1) .

تـم عمـل خـط مسـتقيم خفيـف علـى صـفيحة TLC يبعـد بمسـافة 1.5 سـم مـن قاعـدة الصـفيحة ، وأخـذ15 مـايكروليتر بواسـطة أنبوبـة شـعرية مـن السـم القياسـي AFB_1 ووضـع علـى الخـط بمسـافة 2 سـم مـن الحافـة اليسـرى للصـفيحة وعلـى مسـافة 2 سـم مـن البقعـة الخاصـة بالسـم القياسـي ، وضـعت عينـات مسـتخلص عـزلات الفطـر *A.flavus* علـى نفـس المسـافة وبكميـة مسـاوية لكميـة السـم القياسـي، بعـدها تركـت البقـع لتجـف ثـم وضـعت فـي حـوض الفصـل الحـاوي علـى نظـام الفصـل المكـون مـن مـزيج الكلوروفـورم والميثـانول وبنسـبة 2:98 حجم.حجـم$^{-1}$ وتمـت مراقبتهـا لحـين وصـول المحلـول إلـى مسـافة تقـارب 2 سـم مـن النهايـة العليـا للصـفيحة ، أخرجـت الصـفائح وجففـت تحـت ظـروف المختبـر ولمـدة 5دقـائق ثـم فحصـت تحـت الأشـعة فـوق البنفسـجية وبطـول مـوجي 365نـانوميتر وتـم الكشـف عـن وجـود الافلاتوكسـين B_1 بمطابقـة معامـل الترحيـل Rf ولـون التـألق للسـم القياسـي مـع لـون ومعامـل ترحيـل عينـات مسـتخلص عزلات الفطر *A.flavus* (28)

المبيد الحيوي بايروفين

تـم الحصـول علـى المبيـد الحيـوي بـايروفين مـن مختبـر المقاومـة الحيويـة فـي كليـة العلـوم الطبيـة التطبيقيـة جامعـة كـربلاء .حيـث يتكـون مـن البكتريـا *Pseudomonas fluorescens* والبكتريـا *Bacillus subtilis* والتـي كـات كثافتها 10 ^{6} خلية .غم$^{-1}$

تقيـيم كفـاءة المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي تثبـيط نمو عزلة الفطر *Aspergillus flavus*

بعـد التاكـد مـن الحصـول علـى عزلـة الفطـر *A.flavus* منتجـة لسـم الافلاتوكسـين B_1 تـم معاملـة تلـك العزلـة بالمبيـد الحيـوي البـايروفين كـالأتي :تـم تحضـير وسـط زرعـي مـن PDA فـي دوارق وبمعـدل 100مـل . دورق$^{-1}$ وبعـد التعقـيم والتبريـد اضـيف للـدورق الاول 0.1 غـم مـن المبيـد الحيـوي (بـايروفين) وللـدورق الثـاني 0.5 غـم والـدورق الثالـث 1غـم مـن المبيـد الحيـوي. بعـدها صـب الوسـط فـي كـل دورق فـي ثـلاث اطبـاق وبعـد التصـلب زرعـت عزلـة الفطـر *A.flavus* .وحضـنت الاطبـاق بدرجـة حـرارة 25م° لمـدة اسـبوع .وتـم قيـاس قطـر المسـتعمرات . وبعـد تصـلب الاطبـاق تـم تلقيحهـا بـاقراص مـن PDA منمـى عليهـا الفطـر بقطـر 5 ملـم .وتـم تلقيح ثلاثـة اطبـاق حاويـة علـى وسـط PDA (معاملـة السـيطرة) بـاقراص مـن PDA منمـى عليهـا الفطـر *A.flavus* بعـدها حضـنت الاطبـاق بدرجـة حـرارة 25 ± 2 م° لمـدة أسـبوع .بعـدها تـم حسـاب اقطـار مسـتعمرات الفطـر *A.flavus* وبحسـب المعـاملات المنفـذة اسـتخرجت نسـبة التثبـيط وفقـا لمعادلـة Abbott التـي اوردهـا شـعبان والمـلاح (5) اذ ان :

$$\text{Inhibition}\% = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1= اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر (معاملة السيطرة).

R2= اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر المدروس في اطباق المعاملة.

تاثير المبيد الحيوي البايروفين على نسبة سم الافلاتوكسين B_1

تم تنمية عزلة الفطر *A.flavus* المنتجة لسم الافلاتوكسين B_1 في اربعة دوراق (100مل وسط P.D. السائل . دورق$^{-1}$) لمدة 14 يوم بعدها تم ترشيح االمزيج عبر قطعة شاش ثم لقح الدورق الاول 0.1 غم من المبيد الحيوي . والثاني 0.5 غم والثالث 1غم وترك الرابع (معاملة المقارنة) بعدها حضنت الدوارق في الحاضنة بدرجة حرارة 25 ± 2 م^{o} لمدة اسبوع . تم استخلاص سم الافلاتوكسين B_1 بأخذ 100 مل من كل معاملة ثم نقله إلى خلاط كهربائي حاوي على 100مل من الكلوروفورم ثم مزج الخليط لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ثم وضع الراشح في قمع فصل Separatory Funnel سعة 250 مل بعدها رج القمع برفق لمدة 30 ثانية مع طرد الغازات المتجمعة كلما دعت الحاجة إلى ذلك (مرتين على الأقل) وبعدها ترك على الحامل لمدة دقيقة واحدة لكي تنفصل الطبقتان ، أهملت الطبقة العليا واخذت الطبقة السفلى .ثم أخذ الراشح ووضع في دورق نظيف ومعقم ووضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م ^{o} وحتى الجفاف ، بعدها أذيب في 5 مل من الكلوروفورم(12). ثم تقدير تركيز السم بجهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer) .اعتمدت هذه الطريقة على التقدير الطيفي (Spectrophotometric) والتي تعتمد بطبيعتها على خاصية المركب لامتصاص الضوء في مجال الموجات فوق البنفسجية او تحت الحمراء حيث هنالك تناسب طردي بين مدة الامتصاص(Absorption) وتركيز السم ويمكن من خلال رسم منحنى قياسي بين امتصاصية الضوء وتركيز السم واستخراج قيمة التركيز المقابلة للقراءة التي تعطيها العينة المجهولة بعدها قورنت القراءات مع تراكيز السم القياسي حيث كان الطول الموجي365 نانوميتر وتم حساب نسب الاختزال عن طريق المعادلة التالية :

$$\text{نسبة الاختزال} = \frac{\text{تركيز معاملة السيطرة} - \text{تركيز الأنموذج}}{\text{تركيز معاملة السيطرة}} \times 100$$

التحليــل الإحصــائي Statistical analysis :نفـذت التجـارب وفـق التصـميم كامـل العشـوائية Complete Random) C.R.D Desgin)كتجـارب أحاديـة العامـل وتـم مقارنـة المتوسـطات بحسـب طريقـة اقـل فـرق معنـوي Less significant) L.S.D Differences) وتحـت مسـتوى احتمـال 0.05 . (4)

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة للرز

أظهـرت نتـائج عـزل الفطريـات مـن الـرز وجـود 4 أنـواع مـن الفطريـات تابعـة إلـى 3 أجنـاس وهـي *Aspergillus* و *Penicillium* و *Rhizopus*. واتضـح إن هنـاك سـيادة للفطـر *A. flavus* يليـه الفطـر *A. niger* ثـم الفطـرين *Penicillium* و *Rhizopus* . إذ بلغـت نسـبة ترددهـا 43.18 ،32.95 ،15.9 ، 7.95 % علـى التتـالي فـي حـين بلغـت نسـبة الظهـور 100 ،80 ،33.33 ،20 % علـى التـوالي .جـدول (1) . .وقـد يعـود سـبب سـيادة الجـنس *Aspergillus* فـي الـرز لانتشـاره الواسـع فـي البيئـة والـذي يـأتي مـن قدرتـه علـى تكويـن اعـداد ضـخمة مـن الوحـدات التكاثريـة المقاومـة للظـروف البيئيـة غيـر الملائمـة والتـي تشـكل عوالـق فـي الهـواء كـون قطرهـا أقـل مـن 15 نـانوميتر ومـن ثـم الوصـول الـى امـاكن عديـدة إذ يمكـن ان تـدخل للمخـازن عبـر الشـبابيك والفتحـات الاخـرى ،فضـلاً عـن نمـوه فـي مـديات واسـعة مـن الحـرارة والرطوبـة ، إذ تتصـف بعـض الأنـواع التابعـة لجـنس *Aspergillus* بأنهـا تـنمو فـي مـديات مـن درجـات حـرارة تتـراوح مابيـن 5 - 45 م° أو أعـلى مـن ذلك .(24و 20) .

جدول (1) النسب المئوية لتردد وظهور الفطريات المعزولة من حبوب الرز

نوع الفطر	التردد (%)	الظهور (%)
A. flavus	43.18	100
A. niger	32.95	80
Penicillium	15.9	33.33
Rhizopus stolonifer	7.95	20

اختبار قدرة بعض عزلات الفطر *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسينات B_1

اختبار الامونيا

اظهــرت نتــائج هــذا الاختبــار قــدرة 23 عزلـة من مجموع 38 عزلـة من الفطر *A. flavus* علـى انتـاج الافلاتوكسـين B_1 مـن خـلال تغيـر لـون قاعـدة وسـط جـوز الهنـد المنمـى عليهـا عــزلات الفطــر وبنســبة 60.52% فــي حــين اعطــت 15 عزلــة نتيجــة ســالبة للاختبــار واختلفـت العـزلات فـي كميـة الافلاتوكسـين B_1 وذلـك تبعـا لشـدة تغيـر لـون قاعـدة المسـتعمرات إذ كانــت اكثــر العــزلات انتاجــا للافلاتوكســين عزلـة AF8 و AF9 و AF12و AF38. فـي حــين اظهــرت العــزلات AF3 و AF7 و AF15 قــدرة متوســطة علــى انتــاج الافلاتوكسـينات وبقيـة العـزلات كانـت ضـعيفة فـي انتاجهـا للافلاتوكسـين (جـدول 2) . وهـذه النتيجـة مقاربـة لمـا وجـده الـوائلي (9) مـن أن 10 عـزلات مـن أصـل 19 عزلـة للفطـر *A. flavus* لهـا قـدرة علـى إنتـاج الافلاتوكسـين B_1 وبنسـبة 52.63 % . وتتماشـى هـذه النتيجـة أيضـا مـع مـا توصـل إليـه الجنـابي (2) مـن ان نســبة عــزلات *A. flavus* المنتجــة للافلاتوكسـينات والمعزولـة مـن بـذور فسـتق الحقـل بلغـت 30.8 % فـي حـين ذكـر Davis وDiener (16) ان 86 % مــن عــزلات الفطـر *A. flavus* قـادرة علـى ان تصـيب فسـتق الحقـل وتلوثـه بالافلاتوكسـينات .وقـد اشـار Al-Adil وآخـرون (11) ان 59 % مـن عـزلات الفطـر *A. flavus* والمعزولـة مـن بعض الاغذيـة فـي مدينـة بغداد قـادرة علـى انتـاج الافلاتوكسـينات . ذكـر علـي (6) أن 17 عزلـة مـن مجمـوع 22 عزلـة مـن الفطـر *A. flavus* وبنسـبة 77.27 % والمعزولـة مـن التمـر قـادرة علــى انتــاج الافلاتوكســين B_1 . وقــد يرجــع الاخــتلاف فــي قابليــة العــزلات علــى انتــاج الافلاتوكســين كمــاً و نوعــاً الــى اخــتلاف المحتــوى الــوراثي للســلالات وهــذا يفســر التـدرج الحاصـل فـي اللـون الاحمـر فالعزلـة ذات اللـون الاحمـر الغـامق تـدل علـى قـدرتها علـى انتاج كميات كبيرة من الافلاتوكسينات .

2. 2 .3 الكشــف باســتخدام طريقــة صــفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC)

اظهـرت نتـائج هـذا الاختبـار قابليـة بعـض عــزلات الفطــر *A. flavus* علــى انتــاج الافلاتوكســين B_1 ، اذ وجــد ان 14 عزلــة قـادرة علـى انتـاج الافلاتوكسـين B_1 مـن اصـل 38 عزلــة مــن الفطــر *A. flavus* وبنســبة 36.84 % . (جــدول 3) . وتباينــت عــزلات الفطـر فـي إنتاجهـا للسـم وكانـت العزلـة AF12, AF38 ,AF9أكثرهـا إنتاجـا للسـم اسـتناداً إلـى شـدة تألقهـا. وهـذة النتـائج مقاربـة لمـا ذكـره Gherbawy وآخـرون (19) . والـذي اشـار الــى ان 38.88 % مــن عــزلات *A. flavus* قـادرة علـى انتـاج الافلاتوكسـينB_1 .وجـد علـي (6) ان 10 عــزلات قــادرة علــى انتــاج الافلاتوكســين B_1 مــن اصــل 22 عزلــة مــن الفطــر *A. flavus* وبنســبة 45.45 % . والمعزولـة مـن التمـر . وقـد يعـزى الاخـتلاف في قدرة عزلات على انتاج الافلاتوكسينات

جدول رقم (2) اختبار قدرة بعض عزلات الفطر *A. flavus* المعزولة من حبوب الرز على انتاج الافلاتوكسين B_1 في وسط جوز الهند (CEA)

العزلة الفطرية	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B_1	العزلة الفطرية	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B_1
AF1	+	AF20	+
AF2	-	AF21	+
AF3	++	AF22	-
AF4	-	AF23	+
AF5	+	AF24	+
AF6	-	AF25	-
AF7	++	AF26	-
AF8	+++	AF27	+
AF9	+++	AF28	-
AF10	+	AF29	+
AF11	-	AF30	-
AF12	+++	AF32	+
AF13	-	AF32	+
AF14	+	AF33	-
AF15	++	AF34	+
AF16	-	AF35	+
AF17	+	AF36	-
AF18	-	AF37	-
AF19	+	AF38	+++

(+) : تغير لون قاعدة الوسط الى اللون الوردي ، (–) : لم يتغير لون قاعدة الوسط .

B_1 الـى وجـود أختلافـات وراثيـة بـين العـزلات الفطريـة (21) . ويلاحـظ ان نسـبة العـزلات المنتجـة للافلاتوكسـين B_1 والتـي تـم الكشـف عنهـا بواسـطة هـذه التقنيـة هـو اقـل مـن عـدد العـزلات المنتجـة للافلاتوكسـين B_1 بتقنيـة تفاعـل الامونيـا وعليـه فـإن طريقـة صـفائح الكروماتوغرافيـا الرقيقـة هـي الأدق فـي تحديـد العـزلات المنتجـة للسـموم الفطريـة بصـورة عامة ومنها الافلاتوكسين B_1 .

تقيـيم كفـاءة المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي تثبـيط نمـو عزلـة الفطـر *Aspergillus flavus* فـي الوسـط الزرعـي PDA : أحـدث المبيـد الحيـوي بـايروفين ثبيطـاً لنمـو الفطـر*A. flavus* اذ ارتفعـت نسـبة التثبـيط بزيـادة التركيـز وكانـت أعلـى نسـبة تثبـيط عنـد التركيـز 1غـم .100مـل$^{-1}$ والـذي بلـغ 56.86%، وبلغـت نسـبة التثبـيط فـي التركيـــــز 0.1 و 0.5 (51.76و54.84%) علـى الترتيـب (جـدول 4).(صـورة رقـم 1) وربمـا يعـود السـبب الـى المعـدل النسـبي السـريع لنمـو وتكـاثر البكتريـا *P. fluorescens* مقارنـة بـانواع البكتريـا الاخـرى ، فقـد اشـار Bower و Park (14) الـــى ان المـــدة التـــي تحتاجهـــا للانشـطار علـى جـذور نبـات الصـنوبر كانـت 2-5 سـاعة . ان البكتريـا *P. fluorescens* قـادرة علـى التنـافس مـع مسـببات امـراض الجـذور علـى الكـــاربون لانهـــا تســـتعمل معظـــم مصـــادر الكـاربون الناتجـة عـن افـرازات الجـذور لغـرض نموهـــا (25). وانتـــاج مرتبطـــات الحديـــد Production of Siderophores. وتسـتطيع البكتريـا *P. fluorescens* انتـاج عـدة انـواع مـن المضـادات الحيويـة التـي تعـد الاليـة الرئيسـة المسـتعملة فـي تثبـيط مسـببات الامـراض . مثـل Oomycine ، Pyoluteorin ، Phenazinel carboxylic acid ، Salicylic acid ، Pyoverdine ، 2,4- Diacetyl pholuoro glucinol ، Monoacetyl pholuoro glucinol(22). وجـد ان البكتريـا *B. subtilis* تفـرز عـددا مـن المضـادات الحيويـة الفعالـة ضـد الفطريـات الممرضـــة للنبـــات كالمضـــاد Subtiline و Subtenolin و Bacillomycin وBacilin و Bacitracin وهـــذه المضـــادات لهـا دور فعـال ضـد الفطـر *R.solani* المسـبب لمـرض سـقوط البـادرات فـي الطماطـة وان هـذه المضـــادات تعمـــل علـــى تحلـــل ســـايتوبلازم الخيـوط الفطريـة وتشـوه قمـم الخيـوط الفطريـة للفطـــر *R.solani* فـــي الاوســـاط الزرعيـــة الصلبة PDA. (23)

تـأثير المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي اختـزال سـمية الافلاتوكسـين B_1 المنـتج مـن قبـل الفطـر *A. flavus* :

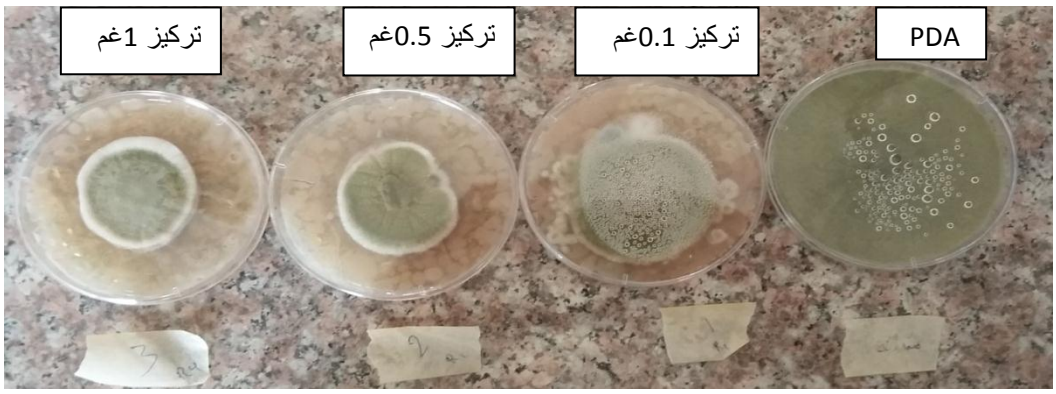
تبـين النتـائج فـي جـدول (5) كفـاءة إضـافة المبيـد الحيـوي بـايروفين فـي اختـزال سـم الافلاتوكسـين B_1 المنـتج مـن قبـل الفطـر *A. flavus*وقـد تباينـت كفـاءة الاختـزال المقـدرة بجهـاز Spectrophotometer حيـث تفوقـت معاملـة 1 غـم .100مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PD معنوياً في اختزال السم بنسبة 81.72 %

جدول (3) اختبار قابلية عدد من عزلات الفطر *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين B_1 والمعزولة من حبوب الزر بطريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC)

العزلة الفطرية	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B_1	العزلة الفطرية	القدرة على انتاج الافلاتوكسين B_1
AF1	+	AF20	-
AF2	-	AF21	+
AF3	-	AF22	-
AF4	-	AF23	-
AF5	+	AF24	+
AF6	-	AF25	-
AF7	++	AF26	-
AF8	++	AF27	-
AF9	++	AF28	-
AF10	+	AF29	+
AF11	-	AF30	-
AF12	+++	AF32	-
AF13	-	AF32	-
AF14	+	AF33	-
AF15	-	AF34	-
AF16	-	AF35	+
AF17	+	AF36	-
AF18	-	AF37	-
AF19	-	AF38	+++

جدول(4) تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الحيوي بايروفين في النمو للفطر *A. flavus* على الوسط PDA

المعاملات	معدل قطر المستعمرات (سم)	نسبة التثبيط %
المقارنة (PDA) فقط	8.5	00.00
0.1 غم .100مل$^{-1}$ من الوسط PDA	4.1	51.76
0.5 غم .100مل$^{-1}$ من الوسط PDA	3.86	54.84
1 غم .100مل$^{-1}$ من الوسط PDA	3.66	56.85
L.S.D.	0.538	6.247



صورة (1) تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الحيوي بايروفين في النمو للفطر *A. flavus* على الوسط PDA

مقارنــة بمعاملــة 0.1 0.5 غــم .100 مــل$^{-1}$ مــن الوسـط PD إذ بلغـت نسـبة الاختـزال 70.96 و77.41% علــى الترتيــب . جــدول (5) وربمــا يعــود الســبب الــى المضــادات الحياتيــة التــي تفرزهـا البكتريـا *B. subtilis* والبكتريـا *P. fluorescens* التـــي تعمـــل علـــى تحليـــل

ســايتوبلازم الخليــة الفطريــة .و التنــافس مــع مســببات الامــراض علــى المغــذيات . وانتــاج مرتبطــات الحديــد Production of Siderophores .التــي تعمــل علــى اختــزال السمية .

جدول (5) تأثير المبيد الحيوي بايروفين في اختزال سمية الافلاتوكسين B_1 المنتج من قبل الفطر *A. flavus*

المعاملات	مقدار سم الافلاتوكسن B_1 مايكرو غرام /مل	نسبة الاختزال %
المقارنة (PD) فقط	18.6	00.00
0.1 غـم .100مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PDA	5.4	70.96
0.5 غـم .100مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PDA	4.2	77.41
1 غـم .100مـل$^{-1}$ مـن الوسـط PDA	3.4	81.72
L.S.D.	0.2977	0.0133

المصادر

1-الجميلــي ،ســامي عبــد الرضــا .1996 .المقاومــة المتكاملــة ضــد الإصــابة بــالفطر *Aspergillus flavus* والتلــوث بســم أفلاتوكسـين B1 فـي حاصـل فسـتق الحقـل .أطروحــة دكتــوراه . كليــة الزراعــة . جامعة بغداد .العراق.

2-الجنــابي، بيــداء عبــود حســن. 2009. دراســة التــأثيرات الســمية للفطــر *Aspergillus flavus* فــي بعــض المعــايير الفســيولوجية والكيموحيويــة والنســيجية لــدى انــاث الجــرذ الابـيض وامكانيـة السـيطرة علـى الاضـرار الناجمـــة عنهـــا. رســـالة ماجســـتير.كلية العلوم. جامعة الكوفة. جمهورية العراق.

3- حســين ، حليمــة زغيــر . 2000 . اســتعمال اليوريـا فـي مقاومـة فطريـات مـا بعـد الجنـي وسـمومها علـى الـذرة الصـفراء المخزونـة . اطروحـة دكتـوراه . كليـة الزراعـة . جامعـة بغداد .جمهورية العراق.

4- الـراوي ، خاشـع محمـود وعبـد العزيـز خلـف الله. 2000. تصـــميم وتحليـــل التجـــارب الزراعيـة. كليـة الزراعـة والغابـات. جامعـة

الموصــل. وزارة التعلــيم العــالي والبحــث العلمي . العراق.

5- شــعبان ، عــواد ونــزار مصــطفى المــلاح . 1993. المبيــدات . دار الكتــب للطباعــة والنشــر . جامعــة الموصــل . وزارة التعلــيم العالي والبحث العلمي . العراق.

6- علـــي ،صـــادق محمـــد.2015. عـــزل وتشــخيص أهــم الفطريــات الملوثــة لثمــار صــنفي التمــر زهــدي و خســتاوي والكشــف عـــــن الافلاتوكســـــين (B_1)و الاوكراتوكسين (A) والسيطرة عليهما باســتخدام مستخلصــي بــذور الحبــة الحلــوة والسمســم .اطروحــة دكتــوراه .كليــة الزراعــة .جامعــة الكوفــة . جمهوريــة العراق.

7- العميــدي ، رملــة أحمــد محمــد حســن . 2009 . تقيــيم كفــاءة بكتريــا *Bacillus subtilis* فــي حمايــة بــذور الــذرة الصــفراء مــن الاصــابة بــالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* تحــت ظــروف الخــزن الطبيعــي وفــي التربــة . رســالة ماجســتير . كليــة العلــوم . جامعــة الكوفة . جمهورية العراق.

8- محســن ،عــذراء حرجــان . 2006.دراســة التــأثيرات الســمية لبــذور الحنطــة الملوثــة بــالفطرين *A. flavus* و *A.niger* فــي الجهــاز التناســلي لانــاث الجــرذ الابــيض و امكانيــة الســيطرة عليهــا فــي المخــزن . رســالة ماجســتير . كليــة التربيــة . جمهوريــة العراق.

9- الــوائلي ، هــديل وائــل . 2002 .تــأثير الزيــت الطيــار للقشــور الصــفراء لثمــار الكريــب فـــروت *Citrus paradisi* وأوراق حشيشـــة الليمـــون *Cymbopogon citratus* فـــــي نمـــــو الفطـــــر *Aspergillus flavus* وانتاجــه للافلاتوكســين B_1 . رســالة ماجســتير . كلية التربية . جامعة .بغداد . العراق.

10- Ahmed, I. A and R. K. Robinson .1988. Selection of a suitable method for analysis of Aflatoxin in date Fruits . J. Agric. Food Chem., 46, 580-4.

11- AL- Adil,K. M. ; A. A.N. Basima ; A.Y, Sawsan and Kassim A.D. 1977 . Contamination by *Aspergillus flavus* group of some food stuffs in Baghdad . Bull. Biol. Res. Center., 9: 107- 115 .

12- Balzer , I . ; C , Boddanic ; and Pepljujak, S . 1978. Rapid thin layer Chrmatographic method for determining Aflatoxin B1,Ochratoxin A, and Zearalenon in Corn . J . Assoc

. off . Anal . chem., 61: 584 – 585 .

13-Barkai-Golan, R. 2008. *Aspergillus* mycotoxins. In: Mycotoxins in Fruits and Vegetables (R. Barkai-Golan, N. Paster, ed.),Elsevier, CA, USA, pp118–138.

14- Bower, J.H; and J.L, Park. 1993. Epidemiology of *Pythium* damping-off and *Aphnomyces* rot of peasafter seed treatment with bacterial agents for biological control. Phytopathology., 83: 1466-1473.

15- Collee, J.G.; A.G, Fraser and Marmion, B.P.1996. Medical Microbiology. 14th edition. Churchill Livingston. USA., 937.

16- Davis, N. D. and U. L, Diener.1970. Limitting temperatures and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acid by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. J. Amer. Oli Chem. Int., 78:693-698.

17- Dianese, J. C and M.T. Lin.1976. A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp., Phytopathology , 66: 1416-1418.

18- Domsch ,K.H ; Goms and Anderson T.H.1980. Compendium of soil fungi . Academic press.,USA pp : 941.

19- Gherbawy , A. Y. ;H. M, Elhariry and Bahobial A. S. 2012. Mycobiota and Mycotoxins (Aflatoxins and Ochratoxins) Associated with some Saudi Date Palm Fruits . Food borne pathogens and Disease , 9 (6) :561-567.

20- Hocking ,A.D and J.I, Pitt. 1997. Fungi and food spoilage (Second ed.) Shampan and Hill .U.K., pp:989.

21- Lee, Y.J. and W. M. J, Hagler . 1991. Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid produced by *Aspergillus flavus* isolated

from contaminated . J. Food Sci., 56 :871-872 .

22- Maurhofer, M.; C, Hase; P, Meawly; J.P, Metraux and Defago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to necrosis virus by the root colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO influence of gac Agene and of pyoverdine production. Phytopatholgy. 84: 139-146.

23 - Montealegre, J. R.,R , Rodrigo , P . M , Luz , H , Rodrigo , S, Polyana , and Ximena B. 2003 . Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctoniasolani* in tomato. J. Biotec, 6 : 115-127.

24- Moubasher , A . H ; S . I . I , Abdel-Hafez; H . M , Abdel-Fattah and Mohrram.1982. Fungi of wheat and broad – bean staw composts . Mycopathology, 78:161-168.

25- Park, I.J. 1991. Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: Keisler, D.L. and P.B. Gregau (Eds.), The Rhizosphere and plant growth Kluwer Academic Publishers. Dordercht. USA. pp. 33-42.

26- Rapper, K.B and D.I, Fennell.1965 . The genus *Aspergillus* . Williams and Wilkins Company, Baltimore. USA. pp 686.

27- Richard J.L. .2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. International Journal of Food Microbiology, 119: 3–10.

28- Sobolev ,V.S and J.W, Dorner .2002. Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography . Journal of Association of Official Analytical Chemists International ,85: 642- 45 .

Evaluation the efficiency of biocide Baiarovin in the growth inhibition of the isolation of fungus *Aspergillus flavus* growth and the ability to produce poison Aflatoxin B_1 poison

Sadeq Mohammed Ali

Department of Plant Protection Faculty of Agriculture .University of Kufa .Republic of Iraq

Abstract

The aim of present study was to isolate and diagnose the mycotoxic fungi from rice in order to decreases them and their toxic effect. The results of isolation and identification from rice showed the dominant of four fungal species that belong to three genus, *Aspergillus, Penicillium* and *Rhizopus*. *A. flavus* was the most dominant follwoed by *Aspergillus niger, Penicillium* sp and *R. stolonifer*, the frequency percentages were 43.18, 32.95, 15.9and 7.95% % respectively , while the occurrence percentage were 100 ,80,33.33and 20 % respectively. The chemical tests for Aflatoxins B_1 using ammonia test showed that 23 isolates out of 38 isolates from the fungus *A. flavus* were able to produce about 60.52% of the Aflatoxins B_1. The thin layer chromatography (TLC) result found that only 14 isolates of *A. flavus* out of 38 isolates. were able to produce 36.84% of Aflatoxins B_1.The results showed the effect of biocide Baiarovin in the inhibition of the growth of fungus *A. flavus*, the inhibition percentage was increased by increasing the concentration and the highest percentage of inhibition was occurred at concentration 1 g / 100 ml (56.86%) , white it reached at concentrations 0.1 and 0.5 respectively the inhibition percentage at the to 51.76 and 54.84%. As well as the results showed the efficiency of adding biocide Baiarovin in reduction aflatoxin B_1 poison produced by the *A. flavus* . the efficiency reduction was varied which determined using shorthand estimated

Spectrophotometer device. The treatment of 1 g / 100 ml of PD Media. showed the superiority in the reduction of the poison by 81.72% compared to treatment of 0.1 0.5 g / 100 ml of PD Media which reached to 70.96 and 77.41% respectively .

Keywords : rice, mycotoxins, biocide Baiarovin, *A. flavu*s fungus