التأثير التثبيطي للمستخلص الزيتي لنبات القرفة (*Cinnamomum zeylanicum*) في نمو وانتاج الأفلاتوكسين B1 من للفطر *Aspergillus flavus*

عبدالكريم جاسم هاشم, وصال هشام علي, مهدي ضمد القيسي*

قسم التقنية الاحيائية– كلية العلوم– جامعة بغداد. بغداد، العراق.

** وزارة العلوم والتكنلوجيا . بغداد, العراق.*

الخلاصة

أظهرالتحليل الكيمياوي للمجاميع الفعالة للمستخلص الزيتي لنبات القرفة وجود الكلايكوسيدات، القلويدات،الراتنجات، الصابونينات، الكومارينات، الفلافونات، التربينات، والستيرويدات بينما أحتوى المستخلص المائي على الكلايكوسيدات، التانينات، الراتنجات، الصابونينات والفينولات. أظهر المستخلص الزيتي تأثيرا تثبيطيا لنمو العزلة المحلية للفطر *Aspergillus flavus* كما أظهرت نتائج التحليل بطرق الكروماتوغرافيا (TLC, HPLC) تأثيرا لهذا المستخلص في انتاج الافلاتوكسين B1 . أن التأثير التثبيطي الكامل لنمو الفطروانتاج الافلاتوكسين كان في التراكيز الاعلى من 350 جزء بالمليون وباستخدام الوسط السلئل(YES) ، بينما التثبيط الكلي لنمو العزلة نفسها على الوسط الصلب (PDA) كان في المستويات الاعلى من 650 جزء بالمليون.

INHIBITORY EFFECT OF *Cinnamomum zeylanicum* OIL EXTRACT ON *Aspergillus flavus* GROWTH AND AFLATOXIN B1 PRODUCTION

Abstract

The chemical analysis for active groups in oil extract of *Cinnamomum zeylanicum* was indicated the presence of Glycosides, Alkaloids, Resins, Saponins, Coumarins, Flavonoids, Terpens and Steroids. But the water extract contains Glycosides, Tanins, Resins, Saponins,and phenpls.The oil extract appeared high inhibitory effect on growth and aflatoxin B1 production for *Aspergillus flavus* locally isolate. The detection of aflatoxin B1 has been done using TLC and HPLC techniques.

The total inhibitory effect of oil extract on the growth of *A. flavus* and aflatoxin B_1 production was at the concentrations up to 350ppm using YES medium, while inhibited the growth of the same isolate on PDA medium at the levels up to 650ppm.

المقدمة

إن الإصابة الفطرية للمحاصيل الزراعية قبل وبعد الحصاد تبقى المشكلة الأساسية لسلامة الغذاء في أنحاء العالم اجمع. والمشاكل المتعلقة بتلك الإصابات هي فقدان الإنبات و التعفن والتلوث بالافلاتوكسين [2,1] ويمكن التغلب على تلك المشاكل عن طريق العناية بغربلة السلع ومعاملة البذور

وتحسين ظروف الخزن [4,3]. إن الأنواع الفطرية التي تنتج السموم الفطرية Mycotoxins تكون أكثر شيوعاً في المناطق الحارة تحت الاستوائية، والاستوائية من العالم. وأن الاهتمام بصحة الإنسان والحيوان قاد إلى وضع خطط للمواصفة العالمية للسلع التجارية للسيطرة على الأفلاتوكسين [6,5]. وقد تم تنظيم الحدود المسموح بها للسموم الفطرية في الغذاء والأعلاف من منظمة الغذاء والزراعة FAO [7].

والأفلاتوكسينات مواد تأيض ثانوي تنتج من بعض الفطريات ومنهـا: *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus parasiticus* بوجود الرطوبة المناسبة والحرارة العالية [2] ان أكثر المحاصيل الزراعية التي تتأثر (قبل وبعد الحصاد) بنمو الفطريات والسموم الفطرية هي: فستق الحقل ، والذرة، و بذور القطن ، و الرز، و المكسرات ، والحبوب والفواكه , وكذلك المنتجات الحيوانية مثل : اللحوم , والحليب , والبيض التي بالإمكان تلوثها أيضاً بسبب التغذية [8]والافلاتوكسينات تعد من أغلب المواد المطفرة والمسرطنة القوية [1]. لقد أوضحت الدراسات الوبائية للبشر أن التعرض للافلاتوكسين B1 (AfB1) يعد من أهم عوامل الخطورة في الأشخاص الذين يعانون من وجود سرطان في خلايا الكبد، وخصوصاً في الأفراد المصابين بالتهاب الكبد الفايروسي نمط C,B [10,9].

فالستراتيجيات البايولوجية تسعى لتقليل أو إزالة الأفلاتوكسين من الغذاء والأعلاف (Food and Feed)، فقد لجأت العديد من الدول مثل : اليابان , والهند , وروسيا إلى استخدام المركبات الطبيعية من النباتات في حفظ الأغذية [11]. أظهرت دراسات كثيرة أن البناء الحيوي للافلاتوكسين B1 ممكن أن يثبط بوساطة عدد من المركبات الطبيعية، فامتازت عدة زيوت أساسية بفعاليتها التثبيطية لنمو الفطريات وإنتاج الافلاتوكسين [12]. لذلك فقد أزداد الاهتمام بالمواد المضادة للفطريات (Antifungal agents) للسيطرة على نمو العزلات الفارزة للسموم الفطرية، لذلك فقد هدف هذا البحث الى دراسة التأثير التثبيطي للمستخلص الزيتي لنبات القرفة على الكتلة الحيوية الجافة للعزلة الفطرية *A. flavus* وعلى إنتاج الأفلاتوكسينB1 في الوسط الزرعي السائلYES. وكذلك دراسة تأثيره في النمو القطري للعزلة الفطرية *A. flavus* في الوسط الصلب PDA.

طرق العمل

غربلة العزلات الفطرية من جنس *Aspergillus* المنتجة للافلاتوكسين.

تم تحديد العزلة الفارزة للافلاتوكسين (والتي تم الحصول عليها من قسم التقنية الاحيائية/ كلية العلوم) وذلك بتنميتها على:

1 -الوسط التفريقي (*Aspergillus flavus* and *Parasiticus* agar) وكما وصفه [13].

والمؤلف من سكروز30غرام ، فوسفات البوتاسيوم أحادية الهيدروجين10 غرام، كبريتات المغنيسيوم المائية 0.5غرام ، كبريتات الحديد المائي0.01 غرام ، كلوريد الزئبقيك 0.0005 ملغرام ، Corn steep liquor 0.5غرام ، ماء مقطر1000مل ، آكار20غرام .

أختبار قابلية عزلة الفطر *A. flavus* على إنتاج الافلاتوكسينB1 في الوسط السائل

تم اختبار قدرة الفطر *A. flavus* على أنتاج الافلاتوكسين (والتي أعطت نتيجة موجبة في الاختبارالسابق) باستخدام الوسط الصناعي السائل وكما يلي:

وضع (50) مليليتراً من الوسط الزرعي السائل لمستخلص الخميرة والسكروز YES في قناني سعة (250) مليليتر وأحكم غلقها، ثم عقمت بالمؤصدة عند (121) م° وضغط (15) باوند/أنج^2 لمدة (15) دقيقة. بُرّد الوسط إلى (45) م° ولقح بـ (1) مليليتر من عالق الأبواغ الحاوي على (10^4) بوغ/مل وحضنت عند درجة (28) م لمدة (21) يوماً بحاضنة منضدية هزازة وبسرعة (115) دورة/دقيقة [14].

استخلاص الافلاتوكسينB1 من الوسط السائل

1. تم ترشيح الوسط الزرعي الملقح بسبورات الفطر *A. flavus* بعد انتهاء مدة الحضن بوساطة ورق ترشيح Whatman No. (1) .
2. أخذ الراشح واستخلص بنفس مقدار حجمه من الكلوروفورم ووضع في قمع فصل وحرك جيداً مع ملاحظة فتح الصنبور بين مدة وأخرى، وترك لحين إنفصال الطبقتين.
3. أنزلت الطبقة السفلى من قمع الفصل خلال ورق ترشيح يحتوي على (10) غرامات من كبريتات الصوديوم اللامائية.
4. أخذ الراشح وبخر وأذيب المتبقي في (50) مايكروليتراً كلوروفورم.

5. تم تحليل النموذج باستخدام تقنية TLC.

أختبار قابلية عزلة الفطر *A. flavus* على إنتاج الافلاتوكسينB1 في الوسط الطبيعي الصلب

تم أختبار قابلية العزلة الفطرية *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين B1 كما ذكر في المصدر (2) وكما يلي:

1. وزن (50) غراماً من فستق الحقل في دورق سعة (500) مليليتر، ثم عقمت بالمؤصدة عند (121) م° وضغط (15) باوند/أنج^2 لمدة (15) دقيقة. بُرّد الوسط إلى (45) م° ولقح الوسط بـ (1) مليليتر من عالق الأبواغ الحاوي على (10^4) بوغ/مل. مل وحضنت عند درجة (28) م لمدة (21) يوماً .
2. تم إضافة (100) مليليتر من مذيب الميثانول: الماء (2: 8) (حجم/حجم) ومزجت جيداً مع التحريك المستمر لمدة لا تقل عن نصف ساعة، ثم رشحت خلال ورق ترشيح Whatman No (2).
3. نقل (40) مليليتراً من الراشح إلى قمع فصل وأضيف إليه (40) مليليتراً من محلول كلوريد الصوديوم (100 غرام/ليتر) و (50) مليليتراً هكسان (أو بتروليوم إيثر). ثم رج قمع الفصل وترك لحين إنفصال الطبقات (تهمل الطبقة العليا) .
4. نقلت الطبقة السفلى إلى قمع فصل آخر وأضيف إليها (100) مليليتر من مذيب الكلوروفورم : ماء (91 : 9)، ثم رج القمع وترك لحين إنفصال الطبقات، (تهمل الطبقة العليا). اذ ان Mi=312 g/mol و m^2/mol للافلاتوكسين B_1.
5. مررت طبقة الكلوروفورم خلال ورق ترشيح حاوية على (10) غرامات من كبريتات الصوديوم اللامائية.
6. أخذ الراشح وتم تبخير المذيب لحد الجفاف ثم حفظت المادة المتبقية في قنينة زجاجية معتمة في الثلاجة لحين إجراء الاختبارات التحليلية اللاحقة عليها.

الفصل بكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقةTLC: أستخدمت الطريقة الموصوفة في [15] وبأستخدام صفائح الكروموتوغرافيا نوع(Silica Gel Gf_{254}) وبوجود السم القياسي الافلاتوكسين B_1 ومحاليل الفصل المكونة من ميثانول:اسيتون بنسبة (3:97)، وكلوروفورم:أسيتون بنسبة 3:97). ولوحظ شدة تألق البقع وقورنت مع سلسلة تخافيف السم القياسي تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 365 نانوميتر وتم حساب تركيز السموم المنتجة من العزلة الفطرية *A. flavus* حسب المعادلة التالية:

$$C = \frac{A_{max} \; x \; Mi \; x \, 100}{E \; x \; D}$$

C= تركيز الافلاتوكسين (µg/ml)

A_{max}= الامتصاص المحدد عند أعلى منحنى امتصاص.

Mi=الكتلة الجزيئية النسبية لكل افلاتوكسين، بالغرام/مول.

E =الامتصاصية المولارية لكل افلاتوكسين في المحلول المستخدم بنزين:اسيتونايترايل (2+98) (V/V) ، بالمتر المربع لكل مول.

D= طول الخلية بالسم

E = 1980

الفصل باستعمال جهاز الكروموتوكراف السائل عالي الأداء (HPLC)

استعملت في هذه الطريقة الظروف التحليلية الواردة في الطريقة المحورة في[16] وهي كما يلي: أستعمل عمود فصل من نوع Partisil 10C8 أبعاده (40 x 250) mm والطور المتحرك (Mobil phase) هو ميثانول: ماء:حامض الخليك (30 : 63 : 7) (V/V) وبمعدل سرعة جريان Flow rate 1.0 مل/دقيقة وبطول موجي 365 نانوميتر بكاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV)، إذ حقن 50 مايكروليتر من النموذج المراد التأكد فيه من وجود الافلاتوكسين B_1 في الجهاز، ثم قورن وقت ظهور المركب Retention time مع وقت ظهور المركب القياسي وكانت سرعة (CS) هي 1 سم/دقيقة، ونسبة الخفض (AT) هي 128 وذروة العتبة (AT) هي 2000.

تحضير المستخلص الزيتي لقلف القرفة (الدارسين).

تم استخدام الطريقة التي ذكرها[17] , للحصول على المستخلص الزيتي مع إجراء بعض التحويرات وكما يلي:

أجري الاستخلاص بوضع (40) غراماً من مسحوق القرفة في كشتبان الاستخلاص (Thumble) الذي وضع في جهاز الاستخلاص المستمر (Soxhlet)، واستخدم (500) مليليتر هكسان عند درجة حرارة (75) م واستمرت عملية الاستخلاص مدة (8) ساعات، بعدها تم تبخير المذيب باستخدام جهاز المبخر الدوار تحت الضغط المخلخل عند درجة حرارة (45)م ، ثم حفظ الزيت في قناني زجاجية معتمة في الثلاجة لحين الاستخدام.

الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص

أتبعت الطريقة الواردة في [18] للكشف عن الكلايكوسيدات، والطريق المذكورة في [19] للكشف عن القلويدات، أما للكشف عن الراتنجات والصابونيات والتانينات فقد اعتمدت الطريقة الموصوفة في [20]. كما تم اعتماد الطرق الواردة في[23,22,21] , للكشف عن الكومارينات والفلافونات والفينولات وعلى التوالي.أما للكشف عن التربين والستيرويد فقد تم اعتماد الطريق الموصوفة في[24] .

التأثير التثبيطي لزيت القرفة (الدارسين) في إنتاج الافلاتوكسين B_1

1. تم تحضير الوسط الزرعي شبه المصنع (YES) لإنتاج الافلاتوكسين وتم استخدام الطريقة الموصوفة في[25] ، إذ تم توزيع (50) مل من الوسط في دوارق حجم (250) مل ثم تم تعقيمها عند درجة حرارة (121) م لمدة (15) دقيقة.
2. أضيفت كميات مناسبة من زيت القرفة إلى الوسط السابق للحصول على التراكيز الآتية (100، و 150، و 200، و 250، و 300، و 400 ، و 500، و 750 و 1000) ppm وبمكررين حسب جدول (1) مع عمل نماذج سيطرة بدون إضافة الزيت.
3. حضر عالق سبورات الفطر *A. flavus* بواقع (10^6) سبور/مل بعد تنمية الفطر على وسط (PDA) المائل لمدة (10) أيام عند درجة حرارة (28) م ، إذ أضيف (10) مل من توين (80) بتركيز (0.05%) المعقم .
4. لقحت الدوارق بـ (0.1) مل/دورق من عالق السبورات ليعطي عدد سبورات (2×10^3) سبور/مل وسط زرعي.
5. حضنت الدوارق في حاضنة هزازة منضدية عند درجة حرارة (28) م ، وأخذت العينات للتحليل بعد (5، 7، 9، 14 و 21) يوم من الحضن.
6. استخلص الافلاتوكسين B_1 بالاستخلاص سائل/سائل .
7. استخدمت تقنية الـ TLC للكشف عن الافلاتوكسين وقورنت مع السم القياسي B1.
8. تم قشط البقع الزرقاء المتألقة تحت الأشعة فوق البنفسجية واستردت بالميثانول، وتم تحديد الطيف الضوئي للعينات باستعمال جهاز الطيف الضوئي (Spectrophotometer), وتم قياس تراكيز الافلاتوكسين[26].

جدول (1): التراكيز النهائية لزيت القرفة مقدرة بـ (PPM) في وسط (YES)

حجم الوسط السائل (ml) YES	حجم الزيت المضاف (µl)	PPM التركيز النهائي
50	0	N
50	5	100
50	7.5	150
50	10	200
50	12.5	250
50	15	300
50	20	400
50	25	500
50	35	750
50	50	1000

تأثير زيت القرفة في الكتلة الحيوية الجافة للفطر *A. flavus*

تم اختبار تأثير زيت القرفة في الكتلة الحيوية الجافة للفطر *A. flavus* وبالتراكيز نفسها المستخدمة في التجربة السابقة وكما ورد في [27] . حسب الوزن الجاف بعد (5، و 7، و 14 و 21) يوم من الحضن بدرجة حرارة (28)م ؛ وذلك بترشيح محتويات الدوارق باستخدام ورق ترشيح Whatman No. (2). غسلت الكتلة الحيوية (Mycelium mat) بالماء

المقطر المعقم ثم جففت في فرن عند درجة حرارة (70) م لمدة (24) ساعة، ثم حسبت الأوزان الجافة على وفق ما ورد في [28].

التأثير المثبط لزيت القرفة في العزلة الفطرية *A. flavus* على وسط PDA :

استخدمت تقنية الغذاء السام (Poisoned food techniques) كما وردت في [29]. إذ أضيفت كميات مناسبة من زيت القرفة إلى وسط PDA المعقم كما في الجدول (2) للحصول على التراكيز الآتية (500، و 550، و600، و650، و700، و750، و800، و900 و 1000) ppm ، واستخدمت نماذج سيطرة بدون إضافة الزيت. صبت الأوساط في الأطباق عند درجة حرارة (45)م مع عمل ثلاث مكررات لكل تركيز. تم تلقيح الأوساط بالعزلة الفطرية *A. flavus* حضنت الاطباق بدرجة (28) م ؛ وتم قياس أقطار المستعمرات الفطرية النامية بعد (3، و5 و 7) أيام من الحضانة. وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط على وفق ما ورد في [30] .

وحسب المعادلة الآتية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{قطر عينة السيطرة – عينة المعاملة}}{\text{قطر عينة السيطرة}} \times 100$$

جدول (2): التراكيز النهائية لزيت القرفة في وسط PDA والمقدرة بـ PPM

حجم وسط PDA (ml)	حجم الزيت المضاف (µl)	التركيز PPM النهائي
50	25	500
50	27.5	550
50	30	600
50	32.5	650
50	35	700
50	37.5	750
50	40	800
50	45	900
50	50	1000

التحليل الإحصائي

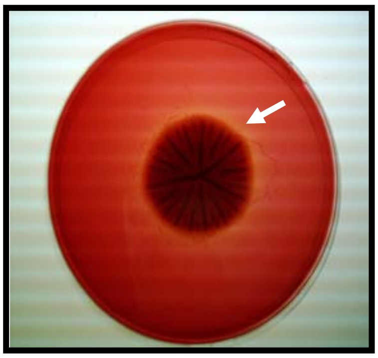
أجري التحليل الإحصائي لنتائج تأثير المستخلص الزيتي لقلف القرفة في الوزن الجاف للفطر *A. flavus* وتأثيره في إنتاج الافلاتوكسين B1 في الوسط الزرعي السائل YES وتأثيره في النمو القطري للفطر *A. flavus* المنمى على الوسط الصلب PDA على وفق البرنامج الإحصائي للبحوث العلمية SPSS (Version-10) ؛ وذلك لمعرفة الفروقات وتأثير المعاملات المختلفة لتراكيز الزيت المستخدمة وقورنت الفروقات باستخدام اختبار T لقبول أو رفض الفرضية أو الإحصائية [31] .

النتائج والمناقشة:

الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على انتاج الافلاتوكسين

لقد تم تحديد عزلة الـ *Aspergillus* الفارزة للافلاتوكسين في أثناء تنميتها على الوسط الزرعي AfPA ، إذ أظهرت *A. flavus* لوناً برتقالياً مصفراً وبراقاً في خلفية المستعمرة شكل(1).

تشير الدراسات إلى أن نمو العزلات المنتجة للافلاتوكسين على هذا الوسط تعطي المواصفات نفسها أعلاه [13]، كما تتفق النتائج مع ما ورد في [32] من قابلية عزلات *A. flavus* ، *A. parasiticus* و *A. nomius* الفارزة للافلاتوكسين من النمو على هذا الوسط تاركة لون أصفر – برتقالي في خلفية المستعمرة، كما أن الفطر *A. niger* يستطيع النمو على هذا الوسط مع إنتاج لون أصفر في خلفية المستعمرة.



شكل (1) نمو العزلة *A. flavus* على وسط AfPA، مع ملاحظة اللون البرتقالي (السهم)

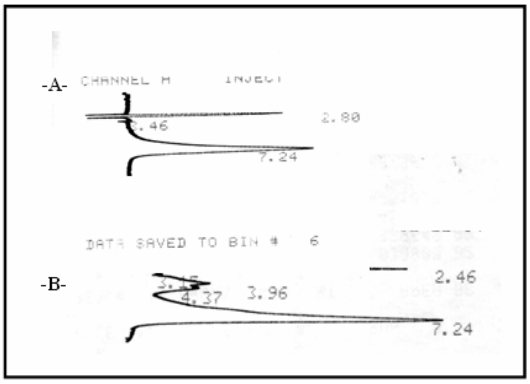
الكشف الكمي والنوعي للافلاتوكسين B_1 المنتج من عزلة الفطر *A. flavus* في الوسطين الطبيعي الصلب و الصناعي السائل

أظهرت نتائج الكشف والتقدير الكمي للافلاتوكسين B_1 المنتج من عزلة فطرية *A. flavus* باستخدام تقنية كروماتوكرافية الطبقة الرقيقة (TLC) والمقارنة بالمحاليل القياسية تحت الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 365 نانوميتر، بحساب قيمة نسبة الانحدار (R_f) لـ AfB_1 في كل من مستخلصات عينة الوسط الصلب والسائل والمحلول القياسي B_1 والذي بلغ مقداره (0.25) شكل (2)، وكذلك الكشف النوعي باستخدام تقنية كروماتوكرافي السائل عالي الأداء (HPLC) ذي كاشف الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي nm365 وأستخدام ميثانول:ماء: حامض الخليك بنسبة (7:63:30) حجم/حجم، فقد بينت النتائج قابلية عزلة الفطر *A. flavus* على إنتاج AfB_1 ، إذ حصلنا على قيمة زمن الاحتجاز (RT) لكل من مستخلص العينة الملقحة وعينة المحلول القياسي B_1 مقدارها (7.24) دقيقة كما موضح في الشكل (3). وكان إنتاج العزلة الفطرية لـ AfB_1 باستخدام الوسط الزرعي الطبيعي لفستق الحقل بمقدار (88) ppb ، أما على الوسط الزرعي السائل (YES) فقد بلغت كمية AfB_1 (30.8)ppb. مما يشير إلى أفضلية استخدام الوسط الطبيعي في إنتاج الافلاتوكسين.

1 2 3

الشكل (2) قابلية العزلة *A. flavus* على إنتاج الافلاتوكسين في الوسطين الصلب لفستق الحقل والسائل 1:YES - مستخلص الوسط الصلب: 2 – سم الافلاتوكسين B_1 القياسي 3- مستخلص الوسط

M: مستخلص عينة الوسط السائل



شكل (3): الكشف عن B_1 بتقنية كروماتوكرافي السائل الافلاتوكسين عالي الأداء (HPLC)
-A– الافلاتوكسين B_1 القياسي، -B-الإنموذج

تشير النتائج أعلاه إلى تأثير نوع الوسط على نمو الفطر *A. flavus* ، وكذلك على إنتاج الافلاتوكسين، وقد يعود ذلك إلى وجود الحوامض الدهنية Fatty acids في البذور الزيتية مثل حامض اللينوليك (Linoleic) ومشتقات حامض الهايدروبيروكسي لينوليك (Hydroperoxy linoleic) التي تؤثر في إنتاج الافلاتوكسين بسبب وجود المجاميع الوظيفية (Functional groups) الفعالة على Carbon backbone لمشتقات هذه الحوامض ، كما تزيد من إنتاج السبورات غير الجنسية (Asexual spores) في كلا من *A. flavus* ، و *A. parasiticus* ، و *A. nidulans* [33].

وقد ذكر[34]أن أفضل محفز للبناء الحيوي للافلاتوكسين عندما يكون المصدر الكربوني قابل للتمثيل عن طريق عملية Glycolysis والمسار الحيوي للسكر الخماسي أحادي الفوسفات ، ويبدو أن إنزيم الألفا أميليز α-amylase المنتج من الفطر *A. flavus* يلعب دوراً مهماً في تحفيز البناء الحيوي للافلاتوكسين في بذور الذرة المصابة.

كما أشار[35]إلى أن الظروف البيئية وظروف الزرع تكون ذات تأثير قوي على البناء الحيوي للسموم الفطرية، إذ إن جينات

البناء الحيوي للسموم الفطرية ممكن أن تكون فعالة أو غير فعالة بالاعتماد على الظروف البيئية.

الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المركبات الفعالة لنبات القرفة (الدارسين)

أظهرت نتائج الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي الخام لقلف القرفة (*Cinnamomum zeylanicum* bark) إحتوائه على الكلايكوسيدات، والتانينات، والراتنجات، والصابونيات والفينولات والموضحة في جدول (3).

أما المستخلص الزيتي فتميز باحتوائه على الكلايكوسيدات، والقلويدات، والراتنجات، والصابونيات، والكومارينات، والفلافونات، والتربينات والستيرويدات ما عدا التانينات والفينولات وبلغ الأس الهيدروجيني للمستخلص الزيتي (7.2). وقد قام David Oller كما ورد في[36]بإجراء الفحوصات الكيميائية لنبات القرفة وصنف المركبات الفعالة فيها إلى الكومارين (Coumarin) ، التربينات التي تشمل (α-terpineol ، Gamma – terpinene، Gamma-terpineol) ، الصابونيات (Saponine) وغيرها من المركبات. وقد ذكر الزبيدي[37]احتواء المستخلص المائي البارد والساخن للدارسين على كلاً من المركبات الفعالة الكلايكوسيدات، والتانينات، والراتنجات، والصابونيات والفينولات. ولم يلاحظ وجود للقلويدات، والكومارينات، والفلافونات، والتربينات والستيرويدات. أما المستخلص الكحولي فتميز باحتوائه على المركبات الفعالة كافة ما عدا الفلافونات والستيرويدات. أما المستخلص الزيتي فتميز بوجود المركبات الفعالة كافة ما عدا التانينات والفينولات.

جدول (3): الكشف الكيميائي النوعي عن بعض المركبات الفعالة والأس الهيدروجيني في مستخلصات قلف القرفة (الدارسين).

المركبات الفعالة	المستخلص المائي	المستخلص الزيتي
الكلايكوسيدات	+	+
القلويدات	–	+
التانينات	+++	–
الراتنجات	+	+
الصابونيات	+++	+
الكومارينات	–	+
الفلافونات	–	+++
الفينولات	++	–
التربينات	–	+++
الستروويدات	–	+++
الأس الهيدروجيني	6.5	7.2

* **تمثل النتائج معدل ثلاثة مكررات لكل كاشف.**

+ **نتيجة موجبة ضعيفة، ++ متوسطة، +++ قوية – نتيجة سالبة**

التأثير المثبط لزيت القرفة (الدارسين) في الكتلة الحيوية الجافة للفطر *A. flavus* المنمى في الوسط السائل YES:

أظهرت النتائج جدول (4) أن التراكيز الأعلى من ppm350 لزيت القرفة أعطت أعلى نسب مئوية لتثبيط نمو الخيوط الفطرية (100%) وبفارق معنوي عالٍ ($P < 0.01$) بعد مدة حضانة (5 ، و 7 ، و 14 و 21) يوماً مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغ فيها أعلى وزن جاف (1.67) غرام بعد (21) يوماً.

أما عند استخدام التراكيز (300-350) ppm للمستخلص فكانت النسب المئوية للتثبيط مرتفعة في أثناء مدة الحضن وبلغ أقصاها (84.6%) بعد 14 يوماً و (86.6%) بعد 7 أيام من الحضانة على التوالي ، وبفارق معنوي عالٍ ($P<0.01$)، ثم انخفضت نسبة التثبيط بمرور مدة الحضن. أما عند استخدام التركيز (200-250) ppm فكانت النسب المئوية للتثبيط منخفضة نسبياً في أثناء مدة الحضانة ؛ إذ بلغ أقصاها (48.7%) و (66.6%) على التوالي بعد خمسة أيام من مدة الحضانة. ثم أنخفضت نسبة التثبيط بمرور مدة الحضن ، أما التركيز الواطئ من المستخلص الزيتي للقرفة (100)ppm فلم يظهر عنده أي تثبيط للنمو في أثناء مدة الحضانة.

إن الفعالية القاتلة للفطريات (Fungicidal effect) عند التراكيز العالية للمستخلص الزيتي قد تعود إلى احتوائه على مواد أساسية كيميائية مثل : التربينات والفلافونات ففي أثناء دراسة الكشف النوعي عن بعض المركبات الفعالة الموجودة في نبات الدارسين تبين وجود أكثر من مادة واحدة ربما تعمل على تثبيط النمو الفطري وإنتاج الافلاتوكسين، وهذا يتفق مع ماذكره [39,38] ان المستخلص الزيتي لنبات القرفة ممكن أن يحوي

مواداً فعالة مختلفة القطبية تمتاز بتأثيرها في النمو الفطري وإنتاج الافلاتوكسين فالمواد غير القطبية مثل الزيوت الأساسية تحوي على التربينات الفعالة ضد *A. parasiticus* و *A. flavus* ، والمواد القطبية مثل الفلافونويد، والباي فلافونويد، وأزو فلافونويد، والستلبينات والتانينات لها القدرة على تثبيط النمو الفطري وإنتاج الافلاتوكسين B_1 و B_2 [40] أن التراكيز الواطئة التي تتراوح بين (0.005-0.5%) لكلا من حامض Paminobenzoic وبنزوات المثيل وحامض Cinnamic تحفز نمو الخيوط الفطرية وتحرير الافلاتوكسين بينما التراكيز العالية (0.1-2%) للمركبات نفسها ، تخفض نمو الخيوط الفطرية وتكوين الافلاتوكسين بنسبة كبيرة في الوسط الزرعي السائل عند (28)م.

التأثير المثبط لزيت القرفة (الدارسين) في إنتاج الافلاتوكسين B_1 من الفطر *A. flavus* على وسط YES

أظهرت دراسة التأثير المثبط لزيت القرفة في إنتاج الافلاتوكسين B_1 من الفطر *A. flavus* المنمى على الوسط الزرعي السائل YES أن التراكيز الأعلى من ppm400 من الزيت، ثبطت قدرة الفطر كلياً على إنتاج الافلاتوكسين في أثناء مدد الحضن (5 ، و7 ، و9 ، و14 و 21) يوماً مقارنة بمعاملات السيطرة التي وصل فيها أعلى إنتاج (7.4) مايكروغرام/مل وبفارق معنوي (P<0.01) بعد 14 يوماً من الحضن جدول (5).إذ تم تقدير كمية السم باستخدام تقنية TLC والمقارنة بالمحاليل القياسية ثم باستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي Spectrophotometer عند الطول الموجي 365 نانوميتر.

أما عند تركيز (300-350) ppm فقد كانت النسب المئوية لتثبيط إنتاج الافلاتوكسين B_1 (100%) بعد (14) يوماً من الحضانة مقارنة بمعاملة السيطرة، وعند تركيز ppm(250) كانت نسبة تثبيط إنتاج الافلاتوكسين B_1 (100%) بعد (5) أيام من الحضانة بعدها انخفضت نسب التثبيط . أما عند التراكيز الواطئة للمستخلص الزيتي ppm(100,200) فكانت النسب المئوية لتثبيط إنتاج الافلاتوكسين B_1 منخفضة بلغ أقصاها (7.2%) و (60.2%) بعد مدة (9) و (5) أيام على التوالي.

إن قدرة المستخلص على منع إنتاج الفطر *A. flavus* للافلاتوكسين B_1 قد تعود إلى قدرتها على تثبيط نمو الفطر في أثناء التأثير في مسارات الأيض الثانوي التي تحصل للفطر والمسؤولة عن إنتاج الافلاتوكسين إذ وجد أن للـ Terpenoid تأثيرات مضرة على قابلية الغشاء البايولوجية للكائن الحي. وإن التركيز المثبط الأدنى للزيوت الاساسية Monoterpenes لنبات *Aframomum danielli* ضد الفطريات الفارزة للافلاتوكسين *A. parasiticus* بلغ (78) ppm (2) أما التأثير المثبط المثير للاهتمام هو الذي يرتبط مع منع التلوث بالسموم الفطرية في أي من المنتجات الغذائية والذي يمكن استخدامه بدلاً من المركبات المصنعة الكيميائية المضادة للفطريات [41] .

تأثير زيت القرفة(الدارسين) في نمو العزلة الفطرية *A. flavus* على الوسط PDA

إن التراكيز المثلى لزيت القرفة تعطي أعلى تثبيط للنمو الفطري وأن هذا التأثير حسب نوع العزلة الفطرية والوسط الزرعي وباستخدام تقنية الوسط المسمم (Poisoned food techniques) باستخدام وسط PDA . أعطت التراكيز (700 ، 750 و 1000) ppm تثبيطاً كلياً (100%) لنمو الفطر *A. flavus* بعد (3 ، 5 و 7) أيام من الحضانة عند درجة (28) م وبفارق معنوي ($P < 0.01$). أما التركيز المثبط الأدنى (MIC) للعزلة الفطرية فهو ppm (650) إذ كانت النسب المئوية للتثبيط (43.57, 67.35, و12.12)% بعد 3، 5 و 7 أيام على التوالي، كما مبين في جدول (6) .

وهذه النتائج تتفق مع ما وجده [42] من أن زيت القرفة قد ثبط نمو الفطريات المعزولة من الخبز *Rhizopus* ، *Penicillium* ، و *Eurotium* ، و *A. niger* بصورة كاملة باستخدام التراكيز (500، و 1000، و 1500 و 2000) ppm، كما وتتفق هذه النتائج على الأغلب ما وجده [43] من أن زيت القرفة بتركيز (500)ppm قد ثبط نمو الفطريات *A. flavus* و *A. parasitcus* و *A. ochraceus* و *F. moniliform* إذ أظهر تثبيطاً كاملاً للنمو الفطري وإنتاج السموم الفطرية في بذور الحنطة.

إذ ورد في[44]أنه بالإمكان السيطرة على الفطريات الفارزة للسموم في الأوساط السائلة باستعمال زيت القرفة وزيوت التوابل الأخرى التي تستطيع تثبيط نمو فطريات

جدول (5): تأثير زيت القرفة في أنتاج الافلاتوكسين B_1 من الفطر *A. flavus* في الوسط السائل YES.

الوسط الحسابي لكمية الافلاتوكسين B_1 (µg/ml) بعد مدة حضن 21 أيام	الوسط الحسابي لكمية الافلاتوكسين B_1 (µg/ml) بعد مدة حضن 14 أيام	الوسط الحسابي لكمية الافلاتوكسين B_1 (µg/ml) بعد مدة حضن 9 أيام	الوسط الحسابي لكمية الافلاتوكسين B_1 (µg/ml) بعد مدة حضن 7 أيام	الوسط الحسابي لكمية الافلاتوكسين B_1 (µg/ml) بعد مدة حضن 5 أيام	مجاميع التراكيز لزيت القرفة (ppm)
6.93	7.40	6.90	5.60	3.95	السيطره
6.63*	6.93*	6.40***	5.87*	3.80*	100
6.70*	6.63**	6.20***	4.20**	1.57***	200
5.10***	4.30***	2.53***	.46***	.00***	250
.33***	.00***	.00***	.00***	.00***	300
.27***	.00***	.00***	.00***	.00***	350
.00***	.00***	.00***	.00***	.00***	400

* Non significant ($P > 0.05$)
** Significant ($P < 0.05$)
*** Highly significant ($P < 0.01$)

A. parasiticus و *F. moniliform* ، وتمنع تكوين السموم الفطرية في البذور الملوثة أيضاً، إذ إن زيت القرنفل (Eugenol) يمتلك فعالية تثبيطية يتبعه زيت القرفة (Cinnamicaldehyde) ثم الزعتر (Thymol & Carvacol). كما ذكر [45] أن الفعالية المضادة للفطريات لعدة نباتات بضمنها القرفة *C. zeylanicum* الذي أظهر زيته أقوى فعالية لأحتوائه على المكون الأساسي Trans-cinnamaldehyde.

...وزن الجاف (غرام) للفطر *A. flavus* المنمى في الوسط السائل YES.

الوسط الحسابي للوزن الجاف بعد مدة حضن 21 أيام	الوسط الحسابي للوزن الجاف بعد مدة حضن 14 أيام	الوسط الحسابي للوزن الجاف بعد مدة حضن 7 أيام	...زن ...من
1.67	.39	.30	[illegible]
1.53*	.41***	.32**	[illegible]
[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

.00***	.00***	.00***	700
.00***	.00***	.00***	750
.00***	.00***	.00***	1000

* Non significant (P > 0.05)

** Significant (P < 0.05)

*** Highly significant (P < 0.01)

References المصادر

1. McAlpin, C.E.; Wicklow, T.D. & Horn, B.W. **2002,** *DNA finger printing analysis of vegetative compatibility groups in Aspergillus flavus from a peanut field in Georgin*. Plant Dis. 86: 254-8.
2. Bankole, S.A. **1994,** *Changes in moisture content, fungal infection and kernel germinability of maize in storage.* Int. J. Trop. Plant Dis. 12: 213-218.
3. Ito, Y.; Peterson, S.W. and Wicklow, T.D. **2001,** Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing species in Aspergillus section flavi. Mycol. Res., 105: 233-9.
4. Wilson, D.M.; Mubatanhema, W. and Jurjevic, Z. **2002,** *Biology and ecology of mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns*. Adv. Exp. Med. Biol. 504: 3-17.
5. Coker, R.D. **1989,** *Control of aflatoxin in groundnut products with emphasis on sampling analysis and detoxification.* In: Aflatoxin contamination of groundnuts, pp. 123-32. Proc. Int. Workshop, India.
6. Cunnif, P. **1995,** *Official Methods of Analysis*, 16th Ed. AOAC Int. Ch. 49: 20-21 Arlington, VA.
7. Van Egmond, H.P. **2002,** *Worldwide regulations for mycotoxins.* In: Devries, W.J.; M.W. Trucksess and L.S. Jackson (eds), Mycotoxins and food safety, PP. 257-69. Proc. Amer. Chem. Soc. Symp., held on 21-23 August, 2000 in Washington, D.C.

   Kluwer Acad./Plenium Pub. The Netherlands.
8. Rachaputi, N.R.; Wrigth, G.C. & Kroschi, S. **2002,** *Management practices minimize preharvest aflatoxin contamination in Australian ground nuts.* Aust. J. Exp. Agric. 42: 595-605.
9. Elegede, J.A. and Gould, N.M. **2002,** *Monoterpenes reduced adducts formation in rats exposed to aflatoxin B_1*. African J. Biotechnol., 1: 46-9.
10. Montalto, G.; Cervello, M.; Giannitrapani, L.; Dantona, F.; Terranova, A. & Castagnetta, L.A. **2002,** *Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma*. Ann. NY Acad. Sci., 963: 13-20.
11. Wilson, C.L. and Wisniewski, M.E. **1992,** *Further alternatives to synthetic fungicides for control of postharvest diseases, in biological control of plant Dis.* (E.T. Tjamos: New York).
12. Mahamoud, A.L. **1994,** *Antifungal action and antiaflatoxigenic properties of some essential oil constituents.* Lett. Appl. Microbiol. 19(2): 110-3.
13. Agarwal, V.K. and Sinclair, J.B. **1996,** *Principles of seed pathology* 2nd ed. Lewis Publishers. CRC Press. New York Ins. PP. 539.
14. Okazaki, H. and Saito, M. **1992,** *Population levels of Aspergillus flavus and A. parasiticus in fields oils in two areas of Kyushu district.* Ann. Phytopath. Soc. Japan. 58: 208-213.
15. Stroka, J.; Anklam, E.; Joerissen, U. and Gilbert, J. **2000,** *Immunoaffinity column clean – up with liquid chromatography using post-column bromination for the determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig past and paprika powder: collaborative study,* J. AOAC, Int. 83(2): 320-40.
16. Seitz, L.M. and Mohr, H.E. **1977,** *A new method for quantitation of Aflatoxin in corn,* cereal chem.. 54: 179-183.
17. Desmukh, S.D. and Borle, M.N. **1975,** *Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products*. Indian. J. Enth. Pharm. 37(1): 11-18.

18. الشيخلي، محمد عبد الستار؛ عبد الجليل، فريال حسن والعزاوي، حسن فياض، **1993**. *الكيمياء الحياتية العملي*. كلية العلوم / الجامعة المستنصرية.

19. Fahmy, I.R. **1933,** *Constituents of plant crude drugs*. 1st ed. Poul Barbey, Cairo.

20. Shihata, I.M. **1951,** *A pharmacological study of Anagallis arvensis.* M.Sc. Thesis, faculty of Vet. Med. Cairo Univ. Egypt.

21. Harborne, J.B. **1973,** *Phytochemical methods, guide to modern techniques of plant analysis*. Champman & Hall, London, New York.

22. Jaffer, H.J.; Mahmoud, M.J.; Jawad, A.M.; Naji, A. & Al-Naib, A. **1983,** *Phytochemical and biological screening of some Iraqi plant.* Fitoterapia, LIX: 299.

23. Geisman, T.A. **1962,** *Chemistry of flavonoid compounds.* MaCmillan Co., New York.

24. Albid, M.R. **1985,** *Zurrzusamme mseturungder Absehle B membrane in Phoenix dactylifera.* Wuzzburg Univ. Wazzburg F.R. of Germany.

25. Pinto, M.M.; Goncalez, E.; Rossi, M.H.; Felicio, J.D.; Medina, C.S.; Fernandes, M.J.B. and Simoni, I.C. **2001,** *Activity of the aqueous extract from Polymnia sonchifolia leaves on growth and production of aflatoxin B_1 by A. flavus* . Braz. J. Microbiol. 32: 127-129.

26. Scott, P.M.; Lowerence, J.W. and Van Walbeek, W.L. **1970,** *Detection of mycotoxins by thin layer chromatography application to screening fungal extracts.* Appl. Microbiol. 22: 839-842.

27. Suberu, H. **2004,** *Preliminary studies of inhibition in Aspergillus flavus with extracts of two Lichens and Bentex – T fungicide*. Afr. J. Biotechnol. 3(9): 468-472. http://www.academicjournals.org/AJB

28. Singh, U.P.; Singh, H.B. & Sing, R.B. **1980,** *The fungicidal of neem Azadirachta indica extracts on some soil borne pathogens of gram*. J. Mycology, 72: 1077-1093.

29. Monger, D. and Grover, R.K. **1991,** *Chemical control root rot of cowpea in relation to altered pathogeneicity of F. solani*. Indian phytopathol. 44(4): 462-469.

30. Abdulasalam, K.S.; Rezk, M.A.; Abdel-Majeed, M.I. and Musa, A.E. **1990,** *Non target activity of certain pesticides against soil borne fungi.* Annals Agric: Saifac Agric. Ainsbams Univ., Cairo 35(1): 459-467.

31. Sorlie, D.E. **1995,** *Medical biostatistics and Epidemiology: Examination and board review* first Ed. Nor walk, Conn. Ecticut., Applepon and Lande: 47-11-88.

32. Website : (1) Mould and Yeasts. Source: http://www.ourfood.com/moulds-yeasts.html 17/7/2005.

33. Calvo, A.M.; Wilson, R.A.; Bok, J.W. and Keller, N.P. **2002,** *Relationship between secondary metabolism and fungal development*. Microbiol. & Mol. Biol. Rev. 66(3): 447-459.

34. Woloshuk, C.P.; Cavaletto, J.R. and Cleveland, T.E. **1997,** *Inducers of aflatoxin Biosynthesis from colonized maize kernels are generated by an amylase activity from Aseprgillus flavus* . The Am. Phytopathol. Soc. 87 (2): 164-169.

35. Mayer, Z.; Färber, P. and Geisen, R. **2003,** *Monitoring the production of Aflatoxin B_1 in wheat by measuring the concentration of nor-1 mRNA.* Appl. Environ. Microbiol. 69(2): 1154-1158.

36. Website (2) Restor AGE men^{TM} professional key 1 Details Cinnamon Twig Extract. Source:http://www.advice-hgh.com/restoragemen-ing.htm.25/7/2004.

37. الزبيدي، لبيب أحمد كاظم **2005**، *الفعالية التثبيطية لمستخلصات قلف نبات القرفة (الدارسين) ضد بعض الاحياء ا لدقيقة لأستخدامها في حفظ اللحم المفروم*. رسالة ماجستير/ معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات لعليا– جامعة بغداد.

38. Ansari, A.A and Shrivastava A.K. **1991,** *The effect Eucalyptus oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus.* Lett. Appl. Microbiol. 13:75-77.

39. Goncalez, E; Felicio, J. D; Pinto, M. M; Rossi, M.H; Medina, C; Fernandes,M.J.B. and Simoni, I. C. **2003,** *Inhibition of Aflatoxin production by Polvmnia sonchifolia and its growth in vitro cytotoxicity.* Arq.Inst.Biol. Saopaulo, Brazil 70(2): 139-143.

40. Website (7): Spices-Bottled spices department review. Sources: http://itsmysupplement.com/store/25/05.php. 24-5-2004.

41. Basilico, M.Z. and Basilico, J.C. **1999,** *Inhibitory effect of some spice essential oils on Aspergillus ochraceus NRRL 3174 growth and ochratoxin production.* Lett. Appl. Microbiol. 29(4): 238-41.

42. Boyd, M.L. and Cotty, P.J. **2001,** *Aspergillus flavus and aflatoxin contamination of leguminous trees of the*

Sonoran Desert in Arizona, Am. Phytopathol. 91: 913-919.

43. Soliman, K.M. and Badeaa, R.I. **2002,** *Effect of oil extracted from somemedicinal plants on different mycotoxigenic fungi.* Food Chem. Toxicol. 40(1): 1669-75.

44. Juglal, S.; Govinden, R. and Odhav, B. **2002,** *Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin – producing fungi*. J. Food Prot., 65(4): 683-7.

45. Simi, A.; Sokovi, M.D.; Risti, M.; Gruji - Jovanovi, S. et al. **2004,** *The chemical composition of some lauraceae essential oils and their antifungal activities.* Institute of Botany, Faculty of Biology, Univ. Belgrad Serbia & Montenegro. Phytotherapy Research 9(18): 713-717.