مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

عزل وتشخيص الفطريات الفارزة لسموم الافلاتوكسين B1 المرافقة لبذور الذرة الصفراء المخزونة في محافظة ذي قار / العراق

رضا حسن علي كوره
قسم العلوم / كلية التربية الأساسية / الجامعة المستنصرية
07711134015
ridahasan24@uomustansiriyah.edu.iq

أ. آمنة محمد علي
قسم العلوم / كلية التربية الأساسية /الجامعة المستنصرية
07717929690
Aamna.edbs@uomustaniriyah.edu.iq

مستخلص البحث:
أظهرت نتائج العزل والتشخيص مرافقة الاجناس الفطرية *Aspergillus* ، *Fusarium* ، *Penicillium*، *Rhizopus* ، لبذور الذرة الصفراء المخزونة في اقضية محافظة ذي قار. وتصدر الفطر *A.flavus* الأنواع الفطرية المشخصة بنسبة 37.3 ، ويأتي بعده على الترتيب الفطريات الباقية حسب النسب المذكورة وهي 24.27 ، 14.80 ، 15.84 ، 7.79 . كما أوضحت نتائج الكشف عن سم الافلاتوكسين AFB1 بواسطة جهاز الكروماتوغرافيا السائل ذي الأداء العالي High Performance Liquid Chromatography(HPLC) للعزلة الأكثر تألقاً اذ بلغ تركيز السم 165.8 ppb . واظهر التشخيص الجزيئي لعزلة الفطر *A.flavus* الأكثر انتاجاً للسم تطابقاً مع عزلات *A.flavus* ، وتم إيداع التتابع النيوكليوتيدي في بنك الجينات العالمي تحت الرمز البنكي PZ048206 وكانت نسبة التطابق مع العزلة الهندية 99% . وشخص الفطر *A.flavus* مورفولوجياً باستخدام صبغة اللاكتوفينول وبعدها اجريت عملية الفحص تحت المجهر الالكتروني بقوة تكبير X40 ظهرت الهياكل الفطرية (الخيوط الهيفية، الجراثيم) باللون الأزرق الداكن وبشكل واضح براس كروي يحتوي على عدد من الابواغ ، وكذلك أظهر الفحص المجهري للعزلة الفطرية المصبوغة بصبغة اللاكتوفينول قطن بلو مجموعة من الصفات المورفولوجية المميزة لفطر *Aspergillus flavus*. إذ لوحظ وجود حامل كونيدي (Conidiophore) طويل وشفاف ذو جدار أملس ينشأ من الخيوط الفطرية، وينتهي بحويصلة كروية إلى شبه كروية الشكل. وتُعد الحويصلة من أهم الصفات التشخيصية لأجناس *Aspergillus* حيث تعمل كقاعدة لتكوين الخلايا المولدة للكونيديات التي تنتج الأبواغ اللاجنسية.

الكلمات المفتاحية : فطر، افلاتوكسين B1 ، ذرة صفراء، ذي قار .
ملاحظة : هل البحث مستل من رسالة ماجستير او اطروحة دكتوراه ؟ نعم : مستل من رسالة

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

1. المقدمة:

تُعد الذرة الصفراء (Zea mays) من المحاصيل الاستراتيجية الهامة عالمياً، حيث تحتل المرتبة الثالثة في الإنتاج بعد الحنطة والأرز (FAO, 2012). وأظهرت الدراسات أهمية تفاعل الجينات والبيئة في اختيار أصناف الذرة الهائلة (Singamsetti et al., 2021). تتميز الذرة بمحتواها العالي من الزيوت والنشا، بالإضافة إلى البروتينات والكاروتينات (Subhash et al., 2008). يتعرض المحصول للإصابة بالعديد من الفطريات سواء في الحقل أو أثناء الحصاد والتخزين. من أهم المشكلات التي تواجه إنتاج الذرة الصفراء هو تلوث المحصول بأنواع مختلفة من الفطريات المنتجة للسموم (Pacin et al., 2005)، مثل *Penicillium* و*Fusarium* و*Aspergillus*، والتي تُعد من أكثر الملوثات الطبيعية شيوعاً في عمليات الإنتاج. تُمثل الظروف البيئية التي يُزرع فيها المحصول، بالإضافة إلى كون الحبوب وسطاً غذائياً ملائماً، عوامل تسهم في نمو وتطور وانتشار المسببات المرضية، مما يؤدي إلى إنتاج السموم الفطرية في الحبوب أثناء التداول والتخزين، ويُعد هذا من أخطر مراحل الإنتاج (Muthomi et al., 2011). يظهر جنس *Aspergillus* بألوان مختلفة مثل الأخضر، الأزرق، والأبيض (Barkai-Golan, 1998; Paster, 2008). يُنتج هذا الجنس الأفلاتوكسينات، وهي من أخطر أنواع السموم الفطرية، حيث يمكن أن تكون قاتلة أو مسرطنة للكبد. وقد سجل التاريخ العديد من الحوادث التي تسببت بها الأفلاتوكسينات، مما أدى إلى وفاة الآلاف من البشر في مختلف البلدان (Ghazanfar et al., 2024). للسموم الفطرية تأثيرات خطيرة على الصحة العامة، حيث تسبب تسمم الكلى، تثبيط المناعة، تشوهات خلقية، وقد تؤدي إلى الموت أو اضطرابات في الجهاز العصبي المركزي، القلب، الأوعية الدموية، والنظم الرئوية (Bhat and Vasanthi, 2003; Ghazanfar et al., 2024). تُعد الأفلاتوكسينات الناتجة من بعض أنواع جنس *Aspergillus*، مثل *A. flavus* و*A. parasiticus* و*A. nomius*، من أخطر السموم الفطرية، ومنها سموم الأفلاتوكسين B1, B2, G1, G2 التي تسبب الطفرات والسرطانات وتسمم الكبد وتثبط الأنظمة الأيضية (Alpsoy, 2010).

3. المواد وطرق العمل

1.3. تحضير الأوساط الزراعية

1.1.3. وسط مستخلص البطاطا والدكستروز الجاهز Potato Dextrose Agar (PDA)

حضر هذا الوسط الوسط الزرعي Potata Dextrose Agar بحسب تعليمات الشركة المجهزة HEMEDIA من خلال اذابة 39 غرام من الوسط الجاهز في لتر واحد من الماء المقطر وبعد الانتهاء من المده التي تم تحديدها للتعقيم ترك ليبرد الى درجة 45 مئويه واضفَ له المضاد الحيوي تتراسايكلين الجاهز Tetracycline بالتركيز 250 ملغم / لتر الى الوسط الزرعي PDA ، وبعد ذلك صُبَ الوسط في اطباق بتري بحجم 9 سم ولقح بالعزلات الفطرية لغرض الاستخدام في التجارب التي نحتاجها. وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 25 ± 2 مئوية لمدة 7 أيام بعدها نقلت الى الثلاجة من اجل حفظها لحين الاستخدام .

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

2.1.3.جمع عينات الدراسة

جمعت العينات من أماكن مختلفة عشوائياً في الفترة 1 – 30 / 9/ 2025 من حبوب الذرة الصفراء المحلية المنشأ ، والمخزونة من العروة الخريفية للموسم 2024 من بعض المناطق في محافظة ذي قار وهي (الرفاعي ، الفجر ، الشطره) بمعدل 5 كغم /عينة وبخمسة مكررات لكل موقع ، بالطريقة العشوائية عند أخذ العينات ، ووضع العينات في أكياس ورقيه وإحكام غلقها وعلمت بالتاريخ واسم العينة بعدها اخذت للمختبر ، والحفظ بدرجة حرارة المختبر ، لكي يتم عزل وتشخيص الفطر الممرض *A.flavus* لاستخدامه لاحقا لأغراض التجارب المختبرية .

3.1.3. عزل وتشخيص الفطر *Aspergillus flavus*

تم أخـذ 500 حبة ذرة صفراء من كل عينة موقع . عقمت سطحياً بالمحلول هايبوكلورات الصوديوم القاصر بالتركيز(2%) لمدة ثلاث دقائق ، وبعدها غُسلت في الماء المقطر والمعقم ثلاث مرات والتجفيف بورق الترشيح ، زُرعت حبوب الذرة الصفراء على الوسط الزرعي Potata Dextrose Agar الصلب في أطباق بتري بحجم 9 سم ، ووضعت (5) حبات في كل طبق من الاطباق وزعت أربع حبات محيطية وواحدة فقط في الوسط ، حضنت الاطباق لمدة سبعة أيام وبالدرجة الحرارية 25 ± 2 مئوية ، شخصت الفطريات تبعاً للصفات المظهرية بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المعتمدة (Pitt and Hocking, 2009) سجلت نسبة تردد الفطريات المرافقة للعينات المختبرة بحسب ما ذكره (Jangala et al., 2014) وفقا للمعادلة التالية:

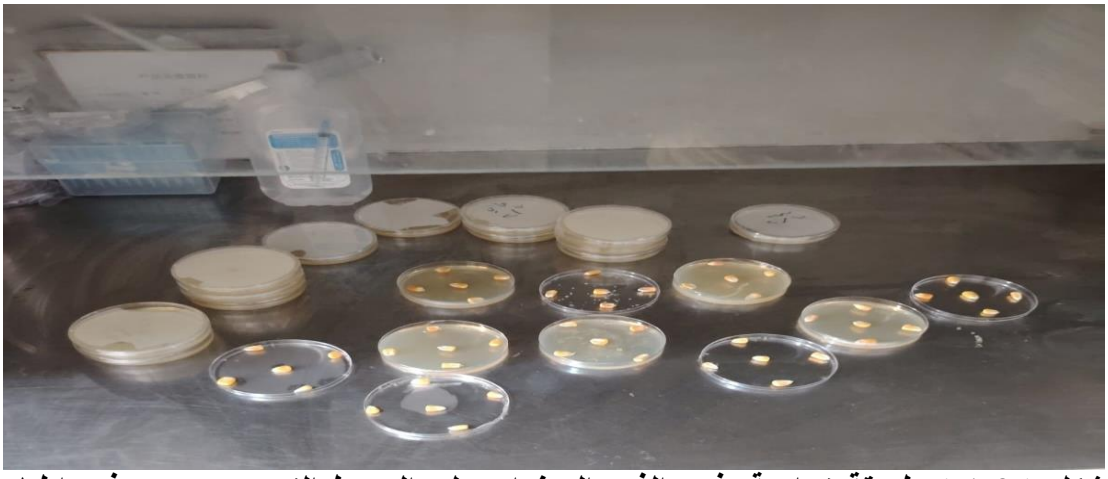
$$\% \text{ التردد} = \frac{\text{عدد العينات الحاوية على جنس الفطر}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

نقل طرف الخيط الفطري من جميع عزلات الفطر *Aspergillus* لغرض التنقية بأبرة العزل وزرع على الوسط الزرعي PDA في اطباق أخرى وبعدها حضنت الاطباق بالدرجة الحرارية 25± 2 مئوية لمدة سبعة أيام بالاعتماد على طرق الزرع المتكرر في الاطباق (Amadi and Adeniyi, 2009) .

جدول (1) موقع وتاريخ جمع العينات لبذور الذرة الصفراء في كل منطقة

ت	موقع العينة	تاريخ جمع العينة
1	ذي قار - الرفاعي	1/9/2025
2	ذي قار – الفجر	14/9/2025
3	ذي قار – الشطرة	20/9/2025

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225



شكل (3-1) طريقة زراعة بذور الذره الصفراء على الوسط الزرعي PDA في اطباق بتري داخل غرفة العزل المعقمة

4.1.3. تحضير معلق اللقاح الفطري :

تم تحضير معلق اللقاح الفطري بإضافة 3 قطع من مستعمرة فطرية نقية ومنماة للفطر *A.flavus* إلى 10 مل من الماء المعقم. وبعد تعقيم الأوساط الزراعية الصلبة، تم صبها في أطباق بتري وتركها لتصلب، ثم أضيف المعلق الفطري بمقدار قطرة واحدة في منتصف الطبق. وتم حساب عدد الأبواغ في كل قطرة باستخدام شريحة Hemocytometer، وكان المعدل (5×10^6) بوغ لكل قطرة. وتم حضن الأوساط الزرعية بدرجة حرارة 25 ±2 سليزي، وسجلت ثلاث قراءات لكل وسط زرعي بعد 7 و 14 يوم من التلقيح.

5.1.3. التشخيص الجزيئي للفطر *Aspergillus flavus* بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل:

تم اختيار العزلة الأكثر إنتاجية للسم وتشخيصها مورفولوجياً، وتم تنميتها على الوسط الزرعي PDA وحضنت بدرجة 25 ± 2 لمدة 7 أيام لتكوين الأجسام الحجرية. بعد ذلك، تم أخذ أحد الأجسام الحجرية ووضعها في ماء مقطر نورمل سلاين، واستخدم Loop المعقم لنقل الأجسام الحجرية وزراعتها في منتصف الأطباق الحاوية على الوسط الزرعي PDA. تم حضن الأطباق بدرجة 25 ± 2 لفترة سبعة أيام، وبعدها أجريت عملية الاستخلاص عليها.

1.5.1.3. استخلاص الحامض النووي المنقوص الاوكسجين *DNA* للفطر *Aspergillus flavus* :

استخدمت عدة الاستخلاص من شركه *Bioner* الكورية المنشأ وحسب الخطوات التالية :

1- يُسحق الغزل الفطري بواسطة *Micropestel* داخل انبوبة ايبندروف .
2- يُضاف له 200 مايكرو لتر متن داريء *GB1* للتعينة
3- يُضاف له 200 مايكرو لتر من *GBX1* لكل عينة مستخدمة .
4- يُضاف له 200 مايكرو لتر من *Proteinase* لكل عينة .
5-تُمزج جميع المواد من خلال *Vortix* لمدة ثلاثون ثانية .
6- تُوضع العينة بعد انتهاء عملية المزج في الحمام المائي بدرجة 60 سليزي لمدة 90 دقيقة.

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

7- تُضاف 100 مايكرولتر من *GB2* للعينة ومزجت في جهاز *Vortix* لمدة ثواني .
8- تترك العينة في التبريد 3 دقائق .
9- توضع العينة في *Filter column* ثم في الطرد المركزي بالسرعة 14000 دوره / دقيقة .
10- تقاس كمية العينة لاضافة *GB3* بنسبة لمرة ونصف بمقدار العينة المقاسة ثم المزج بجهاز *Vortix* لمدة ثواني .
11- تضاف *GB Column* الخاص لاستخلاص الـ *DNA*
12- توضع العينه في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثا وعلى سرعة 14000 د/ ق
13- يهمل الراشح المتجمع في الأسفل وياخذ الفلتر
14- تضاف 400 مايكرو لتر ويتم وضع العينة في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثا بسرعة 14000 دوره / الدقيقة
15- يهمل الراشح ويضاف 600 مايكرو لتر من *W 2* بعدها توضع العينة في جهاز الطرد المركزي لمدة ثلاث دقائق
16- يهمل الراشح ويضاف 30 مايكرو لتر من *Elution buffer*
17- توضع العينة في جهاز الطرد المركزي لمدة 30 ثا وعلى السرعة 14000 دوره / دقيقة
18- اهمل الفلتر وياخذ الراشح وهو *DNA*

2.5.1.3. خطوات تفاعل البلمرة المتسلسل *(PCR)* Polymerase chain reaction:

اجري العمل في المختبر المركزي في شركة جسر المسيب (بغداد) ، والأجهزة التي كانت مستخدمة من تجهيز شركة Bioner ذات المنشأ الكوري وكالاتي :

1- تم اجراء تفاعل الـPCR عبر تضخيم Internal Transcribed Spacer (ITS1- ITS4) بإضافة (1) مايكرولتر من البادئ المتخصص (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) والذي يمثل Forward وكذلك اضيف (1) مايكرولتر من البادئ المتخصص (TCCTCCGCTTATTGATATGC) والذي يمثل Reverse .
2- يُضاف (5) مايكرولتر من الـDNA .
3- يُضاف (13) مايكرولتر ماء منزوع الايونات وخالي من النيوكليز *Deionized Free* (*Nuclease* Water) الى انابيب *PCR* التي تحتوي على *mastermix* ليصبح مجموعها الكلي للانبوبة (20) مايكرو لتر .
4- تُمزج العينة من خلال جهاز *exispin* وتوضع في المدور الحراري .
5- يحتوي برنامج المدور الحراري على الدورة الأولى وهي التهيئة وفك الارتباط للأشرطة *Initiation* على درجة حرارة (95) لمدة خمس دقائق ثم (35) دوره تحوي على (30) من *Denaturation* على درجة (95) سليزي . ثم (30) ثانية التصاق البوادىء على درجة (55) سليزي ثم دقيقة واحدة *Extension* على درجة (72) سليزي ثم دورة واحدة *Final extension* على درجة (72) سليزي لمدة خمس دقائق .

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

3.5.1.3. تحضير هلام الترحيل الكهربائي :

تم تحضير هلام الأكاروز Agarose Gel 1% بإذابة 1 غم من مادة الأكاروز في 90 مل من الماء المقطر و 10 مل من محلول 10X TBE buffer، وسخن المزيج حتى الغليان باستخدام المايكرويف لمدة دقيقتين على أعلى درجة، ثم ترك المزيج ليبرد إلى 65 م. أضيف له 5 مايكروليتر من مادة الأيثيديوم بروميد Ethidium bromide ومزج الخليط بالرج الخفيف. صب المزيج في قالب الصب بعد وضع مشط مناسب، وترك لمدة 30-40 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة حتى يتصلب. رفع المشط، وأضيف 5 مايكروليتر من محلول الحزم القياسية Ladder إلى الحفرة الأولى، وأضيفت الكمية نفسها من منتج ال PCR إلى الحفر الأخرى. بعد ذلك، أجري الترحيل الكهربائي عند 70 فولت لمدة 60 دقيقة؛ بعد التأكد من تضخيم المنطقة المستهدفة، أرسلت العينة إلى شركة Biogene الكورية للحصول على تتابع القواعد النتروجينية Sequence.

6.1.3. صبغة اللاكتوفينول Lactophenol cotton blue :

صبغة اللاكتوفينول القطني الأزرق (*Lactophenol Cotton Blue - LPCB*) تعتبر كاشفا مجهريا أساسيا في علم الفطريات، تُستخدم لتشخيص وتثبيت الفطريات مورفولوجياً، لحفظ ، وتلوين الهياكل الفطرية (الخيوط ، الأبواغ) باللون الأزرق الداكن، وتتكون من الفينول (يقتل الفطريات)، حمض لاكتيك (يحافظ على الهياكل)، جلسرين (لمنع الجفاف)، وأزرق قطني (لصبغ الكيتين) (*Emmons et al., 1977; Murray et al., 1999*).

1.6.1.3. استخدامات صبغة اللاكتوفينول :

1- التشخيص الفطري : لتلوين الفطريات العفن (Molds) للتعرف عليها مجهريًا.
2- تثبيت العينات: تستخدم كوسط رطب لتحضير شرائح الفحص المجهري.

2.6.1.3. طرق التحضير والاستخدام:

1- مزج المكونات (الفينول، حمض اللاكتيك، الجلسرين، الماء، والصبغة) وبعدها التصفية.
2- يتم وضع قطرة من الصبغة على الشريحة الزجاجية.
3- يؤخذ جزء من المزرعة الفطرية وتخلط جيداً مع الصبغة.
4- نقوم بتغطية الشريحة بغطء (Coverslip) والفحص تحت المجهر.

7.1.3. استخلاص سم الافلاتوكسين AFB1 من وسط PDA :

بعد مرور (14 يوم) من عملية تحضين الاطباق تمت عملية الاستخلاص لسم الافلاتوكسين بحسب طريقة (Moosavi-Nasab et al., 2018) وكالاتي :

1- فرغت اطباق بتري بكافة محتوياتها الوسط والفطر في أسطوانات زجاجية معقمة.
2- اضيف لها (75 مل) من الماء المقطر المعقم .
3- خلطت المحتويات كافة بواسطة خلاط كهربائي معقم الى حين امتزاج الخليط بشكل كامل.
4- بعدها يصب (30 مل) من الخليط المحضر الى اسطوانة زجاجية ثانية ويضاف الية 30 مل من الكلوروفورم .
5- تعاد عملية الخلط لعدة دقائق لربط كل الجزيئات للسم مع المذيب .

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

6- بعدها يفرغ المزيج الى قمع الفصل مع عملية التحريك المستمرة بين فترة وأخرى لإخراج الغازات المتكونة ثم يترك لعدة دقائق لحين انفصال طبقتين سفلى تحتوي على المذيب الحاوي على السم وعليا وهي الخليط .

7- تفرغ الطبقة السفلى الى قمع زجاجي حاوي على ورق ترشيح ذات قطر مسامات 15 الى 20 مايكرومتر.

8- تجفف القناني في جهاز التجفيف بدرجة 40 سليزي وبوجود المراوح لغرض تدوير الهواء داخل الفراغ وتسريع عملية التجفيف (AOAC ، 2005) .

9- بعد إتمام عملية التجفيف تمت عملية اغلاق القناني الزجاجية الحاوية على بلورات السم باحكام والحفظ بدرجة حراره (-5) سليزي والانتظار الى حين اجراء الكشوفات عن سم الافلاتوكسين.

1.7.1.3. تقدير تركيز سم الافلاتوكسين المنتج من الفطر *Aspergillus flavus* بتقنية HPLC :

اجري الفحص في مختبرات هيئة البحث العلمي – دائرة البيئة والمياه وحسب الطريقة المقدمة من قبل العالم (Liu et al., 2012) وذلك باستخدام الجهاز الكروموتوغرافيا السائل ذات الاداء العالي موديل (سيكام - *SYKAMN*) الالماني المنشأ ، حيث يستخدم الطور الناقل : اسيتونترايل : الماء المقطر : (*70 : 30*) وكان عمود الفصل : (*C18 – ODS (25cm * 4.6 mm*) لفصل سم الافلاتوكسين واستخدام كاشف الفلورة (*ex=365nm , em= 445nm*) للكشف عن السموم الفطرية ، حيث كان سرعة جريان الطور الناقل هي : *0.7 ml / min*.

4. النتائج والمناقشة

1.4. جمع العينات

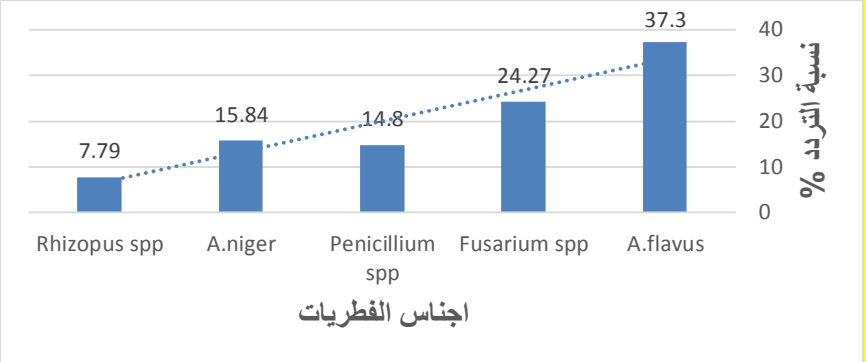
1.1.4.عزل وتشخيص الفطر *Aspergillus flavus* :

أظهرت نتائج العزل للفطريات المرافقة لبذور الذرة الصفراء المعزولة من بعض المناطق في محافظة ذي قار وهي(الرفاعي، الفجر ، الشطره) تفوق الفطر *A.flavus* بنسبة تردد عالية بالمقارنة مع بقية الفطريات ضمن المناطق المذكورة بنسبة 37.3 % وبعده *Fusarium spp* ، *Rhizopus spp* , *A.niger* , *penicillium spp* وبنسب تردد 24.27 ، 14.80 ، 15.84 ، 7.79 % على التوالي ، كما في الجدول رقم (2).

جدول (2) نسب تردد الفطريات المرافقة لبذور الذرة الصفراء المخزونة

اجناس الفطريات	نسبة التردد %
A.flavus	37.3
Fusarium spp	24.27
Penicillium spp	14.80
A.niger	15.84
Rhizopus spp	7.79

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225



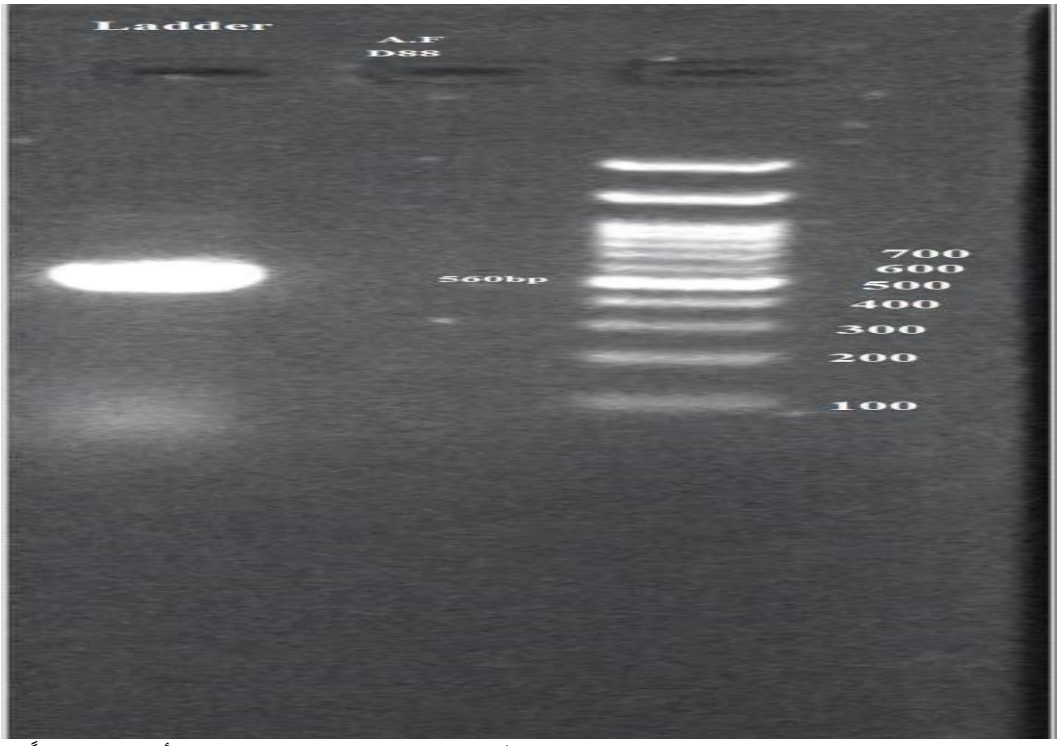
شكل (1) نسب تردد الفطريات على بذور الذرة الصفراء المخزونة

وأشارت الكثير من الدراسات الى تواجد هكذا اجناس مختلفة من الفطريات في المخازن لحبوب الذرة الصفراء بسبب كون هذا المحصول ذي افضلية غذائية عالية للفطريات التي تم ذكرها (الجبوري، 2016؛ الرماحي، 2021؛ *Haider and Hussein, 2022*) . اما المسببات التي أدت الى تواجد وانتشار الفطر *A.flavus* وخاصتاً على مخازن الذرة الصفراء الى التفضيل الغذائي العالي للفطر مع هكذا محصول بسبب محتواة العالي من السكريات و الكاربوهيدرات ولهكذا فطر القدرة على التحمل الكبير للدرجات الحرارية ، ويمكنه التعايش والنمو بِمدى يتراوح بين (11- 45) سليزي ، وكذلك توجد دراسات أخرى على مقدرة هذا الفطر العيش في الدرجات الحرارية العالية ، وفضلا عن تميزه بتحمل مستويات التطرف في نسبة الرطوبة الجوية ونسب الرطوبة في داخل البذور ، وإمكانيته العالية للعيش في ظروف الجفاف والقدرة على تحمل الانخفاض في تركيز الاوكسجين ، وكذلك قدرته التنافسية من اجل البقاء مع تواجد اكثر من فطر والقدرة العالية للهيمنة والسيطرة على المحتوى الغذائي للبذور ، وكذلك انتاجه للابواغ بكثرة والانتشار في البيئة ،كل هذه الامكانيات ساهمت على الانتشار عالمياً في مخازن المواد الغذائية (***Reid et al., 2016***؛ الرماحي، 2021؛ ***Rehman et al., 2021; Weaver et al., 2022***).

2.1.4. تشخيص الفطر *Aspergillus flavus* جزيئياً بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction(PCR) :

بينت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لبيان عملية تضخيم ITS1- ITS4 عن نجاح عملية التضخيم من خلال ظهور حزمة واحدة بحجم (560 زوجا قاعدياً) حسب البواديء المستخدمة شكل رقم (2) . كما بينت النتائج إيداع التتابعات النيوكليوتيدية للفطر في (NCBI) عن تطابق هذه العزلة والتأكد منها من خلال الموقع المذكور بانها عزلة تنتمي للفطر *A.flavus* ، وتم الإيداع لها ضمن رقم الانضمام (*Accession numbers : Order No :* PZ048206) واعتمدت العزلة في جميع التجارب لهذه الدراسة (*Fujita et al., 2001*؛ الراوي، 2017) .

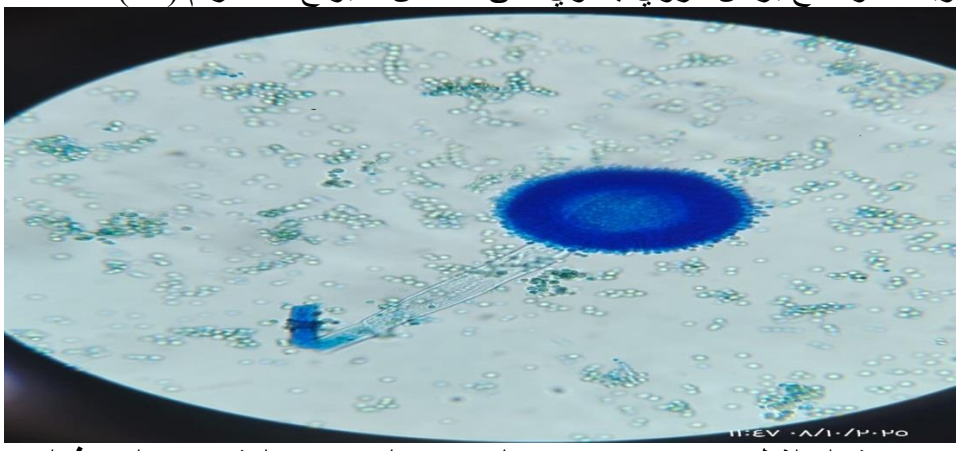
مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225



شكل (2) نتائج الترحيل الكهربائي لعزله الفطر *Aspergillus flavus* الأعلى انتاجاً للسم

3.1.4. صبغة اللاكتوفينول Lactophenol cotton blue :

بعد اجراء عملية الفحص تحت المجهر الالكتروني بقوة تكبير 40 لتشخيص فطر *A.flavus* مورفولوجياً تبين لنا بأنه تظهر لنا الهياكل الفطرية (الخيوط الهيفية، الجراثيم) باللون الأزرق الداكن وبشكل واضح برأس كروي يحتوي على عدد من الابواغ شكل رقم (3) .



الشكل (3) شكل الفطر *A.flavus* تحت المجهر الالكتروني بالتشخيص المورفولوجي

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

أظهر الفحص المجهري للعزلة الفطرية المصبوغة بصبغة اللاكتوفينول قطن بلو مجموعة من الصفات المورفولوجية المميزة لفطر *Aspergillus flavus*. إذ لوحظ وجود حامل كونيدي (Conidiophore) طويل وشفاف ذو جدار أملس ينشأ من الخيوط الفطرية، وينتهي بحويصلة كروية إلى شبه كروية الشكل. وتُعد الحويصلة من أهم الصفات التشخيصية لأجناس *Aspergillus* حيث تعمل كقاعدة لتكوين الخلايا المولدة للكونيديات التي تنتج الأبواغ اللاجنسية (Klich, 2002).

كما لوحظ ترتيب الخلايا المولدة للكونيدات حول الحويصلة بشكل شعاعي، مشكلةً رأساً كونيدياً كروياً مميزاً، حيث تتكون سلاسل متعاقبة من الكونيدات الكروية أو شبه الكروية ذات الجدران الخشنة نسبياً. ويعطي هذا الترتيب المظهري للرأس الكونيدي الشكل الكثيف والمميز الذي يعد من الصفات المهمة في تشخيص فطر *Aspergillus flavus* وتمييزه عن الأنواع الأخرى التابعة للجنس نفسه (Pitt and Hocking, 2009).

تُظهر صبغة اللاكتوفينول قطن بلو تفاصيل التراكيب الفطرية بوضوح، حيث يرتبط القطن الأزرق بالمكونات الكيتينية في الجدار الخلوي للفطر، مما يسهم في إظهار الحوامل الكونيدية والحويصلات والكونيدات بشكل واضح تحت المجهر الضوئي عند قوة تكبير 40. كما يعمل اللاكتوفينول على حفظ التراكيب الفطرية ومنع تحللها أثناء الفحص المجهري (Samson et al., 2014). إن الصفات المورفولوجية الملاحظة في هذه العزلة، مثل وجود حامل كونيدي طويل، وحويصلة كروية، وترتيب شعاعي للخلايا المولدة للكونيدات التي تنتج سلاسل من الكونيدات الكروية، تتطابق مع الصفات التصنيفية المميزة لفطر *Aspergillus flavus* كما وردت في المفاتيح التصنيفية للفطريات. وبناءً على ذلك يمكن تأكيد التشخيص المظهري للعزلة الفطرية المعزولة من بذور الذرة الصفراء على أنها تعود إلى هذا النوع الفطري المعروف بقدرته على إنتاج السموم الفطرية مثل الأفلاتوكسين (Klich, 2002; Pitt and Hocking, 2009) .

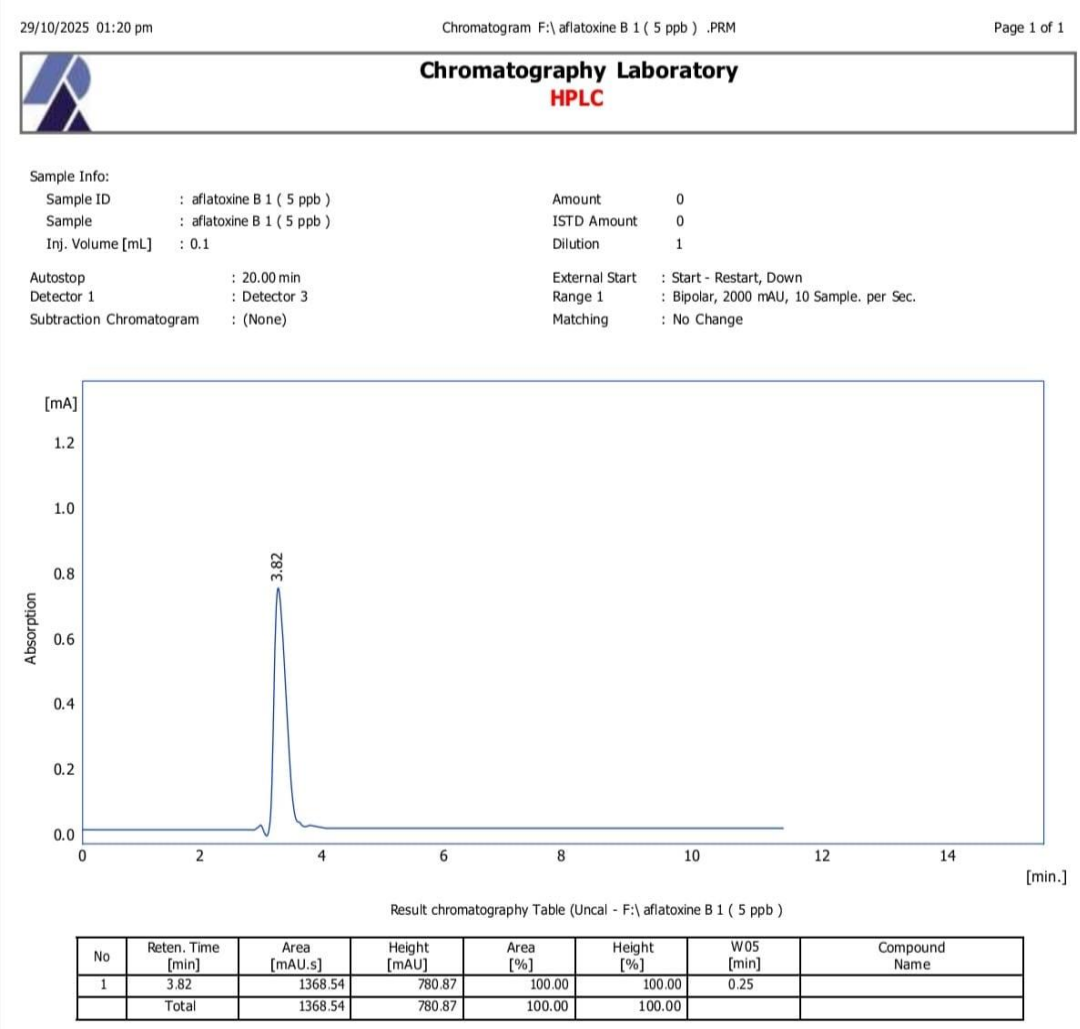
4.1.4. الكشف عن تركيز سم الافلاتوكسين المنتج من الفطر *Aspergillus flavus* بتقنية HPLC :

أظهرت نتائج الدراسة قدرة عزلات الفطر *Aspergillus flavus* على إنتاج سم الافلاتوكسين B1، التي تم تنميتها على الوسط الزرعي PDA بعمر 14 يوما المعزولة من بذور الذرة الصفراء ، واجري الفحص لها في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا . شكل رقم (4) حيث تم الكشف عن هذا السم باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) التي أظهرت زمن احتجاز للمركب القياسي للسم بلغ 3.82 دقيقة، مما يؤكد توافق نتائج التحليل مع القيم القياسية. سجلت أعلى تركيز للسم في راشح عزلة الرفاعي اذ بلغ (165.8 ppb) شكل رقم (5) . تتفق هذه النتائج مع دراسات سابقة (Mikusova et al., 2020) التي أشارت إلى قدرة أنواع الفطريات، خاصة *Aspergillus flavus*، على إنتاج سم الافلاتوكسين B1 وB2 في الأغذية. وتشير منظمة الصحة العالمية إلى أن الحد الأقصى المسموح به يوميًا من هذه

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

السموم يتراوح بين 0.5 إلى 15 ميكروغرام/كغم من وزن الجسم، مما يعكس خطورتها على الصحة العامة وضرورة مراقبة مستوياتها في الأغذية.

إن تسجيل تركيز السم بـ (165.8 ppb) يدل على أن العزلة المدروسة تمتلك قابلية ملحوظة لإنتاج السموم الفطرية، وقد تعزى هذه الزيادة في إنتاج السم إلى عدة عوامل منها طبيعة العزلة الفطرية والظروف البيئية المحيطة مثل درجة الحرارة والرطوبة ونوع الوسط الغذائي المستخدم في النمو. كما أن ظروف الخزن غير المناسبة للحبوب قد تسهم بشكل كبير في زيادة نمو الفطريات وإنتاج السموم الفطرية.



No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.82	1368.54	780.87	100.00	100.00	0.25	
	Total	1368.54	780.87	100.00	100.00		

الشكل (4) نتائج تحليل تقنية HPLC لعينة سم الافلاتوكسين AFB1 القياسي

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

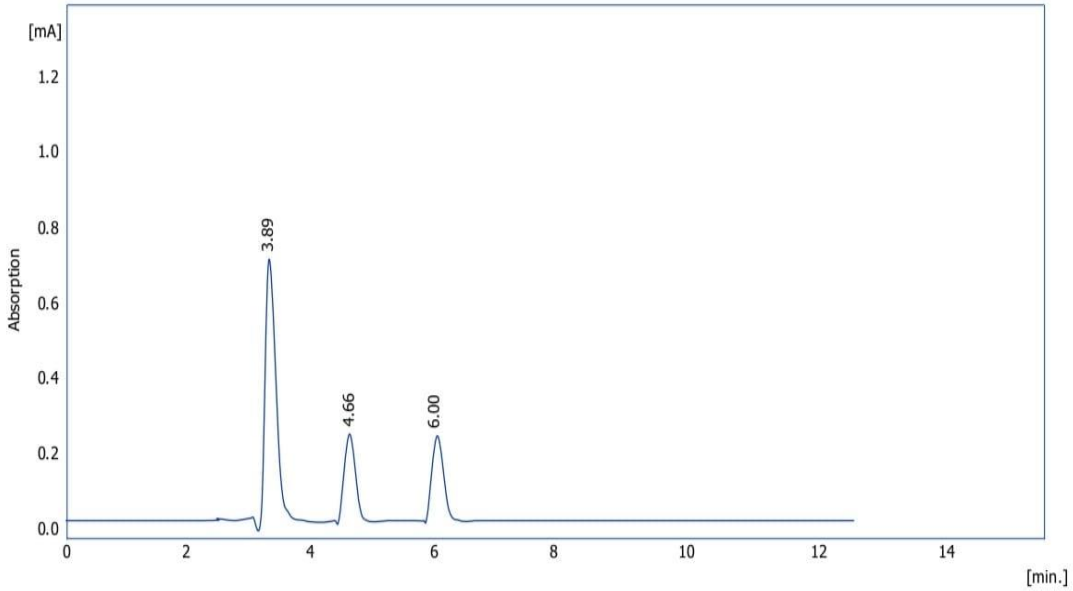
29/10/2025 01:20 pm Chromatogram F:\ sample .PRM Page 1 of 1

Chromatography Laboratory
HPLC

Sample Info:

Sample ID	: sample	Amount	0
Sample	: sample	ISTD Amount	0
Inj. Volume [mL]	: 0.1	Dilution	1

Autostop	: 20.00 min	External Start	: Start - Restart, Down
Detector 1	: Detector 3	Range 1	: Bipolar, 2000 mAU, 10 Sample. per Sec.
Subtraction Chromatogram	: (None)	Matching	: No Change



Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample)

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.89	120652.59	774.01	60.00	60.00	0.20	
2	4.66	9852.65	211.23	20.00	20.00	0.05	
3	6.00	8922.14	210.98	20.00	20.00	0.05	
	Total	139427.59	1192.65	100.00	100.00		

الشكل (5) نتائج تحليل تقنية HPLC لعينة سم الافلاتوكسين AFB1 في عزلة الرفاعي

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

المصادر :

1- الراوي ، منى عبد الرحمن مرعي (2017) . تشخيص الجين المسؤول عن انتاج سم الافلاتوكسين B1 في الفطر *Aspergillus flavus* واختبار الفضة النانوية في اختزاله . رسالة ماجستير- كلية الزراعة – جامعة بغداد .

2- الرماحي . عالية هيكل حسين (2021). حماية محصول الذرة الصفراء باستعمال بعض المواد النانوية من الإصابة بالفطر *A.flavus* وتاثيرها في اختزال انتاج سم الافلاتوكسين B1 . أطروحة دكتوراه . كلية علوم الهندسة الزراعية . جامعة بغداد ص 166 .

3- Alpsoy, L (2010) Inhibitory effect of essential on aflatoxin activities. Afr. J. Biotch. 9: 2474-2481.

4- Amadi, J. E. and Adeniyi, D. O. (2009). Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. Afr. J. Biotechnol. 8: 1219-1221.

5-AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2005). Official methods of analysis (17th ed.). Chapter 49, Natural toxins. Gaithersburg, MD: AOAC Internationa.

6- Bhat, R.V. and Vasanthi, S (2003) Mycotoxin food safety risks developing countries. Food Safety in Food Security and FoodTrade, Vision 2020 for Food, Agriculture and Environment, Focus 10, brief 3 of 17, pp 1-2.

7- FAO (Food and Agriculture Organization) (2012) Croppros pecta and Food Situation. High lights.

8- Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S., and Hashimoto, T. (2001). Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. Journal of Clinical Microbiology, 39(10), 3617-3622.

9- Ghazanfar, S., Abid, R., Ajmal, W., Haider, Z., Khan, B., Rani, S., Basuli, D., Seal, S., Das, T., Sinha, D. and Jyoti, S.U., (2024). 1 An Introduction to Food Safety and its Impact on Human Health. Food Safety, CRC Press. United States, 1st Edition. pp: 1-22.

10- Haider, A.A. and H.Z. Hussein. (2022). Efficiency of biologically and locally manufactured silver nanoparticles from *Aspergillus niger* in preventing *Aspergillus flavus* to produce aflatoxin b1 on the stored maize grains. Caspian Journal of Environmental Sciences, 20(4):765-773.

11- Jangala, S., Sowjanya, K. M., Kumara, N., Reddi, K. V. N. R., Sravanthi, M. J., Chitta, P., and Satya, A. K. (2014). Identification and

assess ment of frequency distribution in fungi isolated from coastal Andhra Pradesh. Malaysian Journal of Microbiology, 10(3), 215-218.
12- Klich, M. A. (2002). Identification of Common Aspergillus Species. Utrecht, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
13- Liu, L., Jin, H., Sun, L., Ma, S., and Lin, R. (2012). Determination of aflatoxins in medicinal herbs by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Phytochemical Analysis, 23(5), 469-476.
14- Mikusova, P., Cabon, M., Melicharkova, A., Urík, M., Ritieni, A., and Slovak, M. (2020). Genetic diversity, Ochratoxin A and fumonisin profiles of strains of Aspergillus Section Nigri isolated from dried vine fruits. Toxins, 12(9), 592.
15- Moosavi-Nasab, M., Jamalian, J., Heshmati, H., and Haghighi-Manesh, S. (2018). The inhibitory potential of Zataria multiflora and Syzygium aromaticum essential oil on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus in culture media and Iranian white cheese. Food Science and Nutrition, 6(2), 318-324.
16- Ortega-Beltran, A., Agbetiameh, D., Atehnkeng, J., Falade, T.D. and Bandyopadhyay, R., (2021). Does Use of Atoxigenic Biocontrol Products to Mitigate Aflatoxin in Maize Increase Fumonisin Content in Grains?. Plant Disease, pp.PDIS-07.
17- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage.3rd Edition . Springer US.New York: 520 pp.
18- Reid, C.X., Sparks, D.L., Williams, W.P. and Brown, A.E., (2016). Single corn kernel aflatoxin b1 extraction and analysis method. Natural resources, 7(7), pp.405-410.
19- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Studies in Mycology, 78, 141–173.
20- Singamsetti, A., Shahi, J.P., Zaidi, P.H., Seetharam, K., Vinayan, M.T., Kumar, M., Singla, S., Shikha, K. and Madankar, K., (2021). Genotype× environment interaction and selection of maize (Zea mays L.) hybrids across moisture regimes. Field Crops Research, 270:108224.

مجلة كلية التربية الاساسية
كلية التربية الاساسية – الجامعة المستنصرية
P- ISSN: 3007-3650 E- ISSN: 2706-8536
Journal of the College of Basic Education Vol.32 (No.137) 2026,pp.211-225

21- Weaver, M.A., Callicott, K.A., Mehl, H.L., Opoku, J., Park, L.C., Fields, K.S. and Mandel, J.R.,(2022). Characterization of the *Aspergillus flavus* Population from Highly Aflatoxin-Contaminated Corn in the United States. Toxins, 14(11), p.755.

Isolation and identification of aflatoxin B1-secreting fungi associated with stored yellow corn(zea mays) seeds in Dhi Qar Governorate,Iraq

Ridha Hasan Ali
Department of Science /
College of Basic Education/
Al-Mustansiriya University
ridahasan24@uomustansiriyah.edu.iq

Prof.Assist.Amna M.Ali
Department of Science /
College of Basic Education/
Al-Mustansiriya University
Aamna.edbs@uomustaniriyah.edu.iq

Abstract:
The results of isolation and identification showed the association of the fungal genera Aspergillus, Fusarium, Penicillium, and Rhizopus with stored yellow corn seeds in the districts of Dhi Qar Governorate. The fungus *A. flavus* topped the list of identified fungal species at 37.3%, followed by the remaining fungi at the following percentages: 24.27%, 14.80%, 15.84%, and 7.79%, respectively. Furthermore, the results of the detection of aflatoxin AFB1 using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed that the most fluorescent isolate had a toxin concentration of 165.8 ppb. Molecular characterization of the most toxin-producing A. flavus isolate showed a match with other A. flavus isolates, and its nucleotide sequence was deposited in GenBank under the code PZ048206. The match with the Indian isolate was 99%. Morphologically, A. flavus was characterized using lactophenol staining, followed by electron microscopy at 40X magnification. The fungal structures (hyphae and spores) appeared dark blue and clearly displayed a spherical head containing numerous spores. Microscopic examination of the lactophenol-stained isolate also revealed several morphological features characteristic of Aspergillus flavus. A long, transparent, smooth-walled conidiophore originating from the hyphae was observed, terminating in a spherical to semi-spherical vesicle. The vesicle is one of the most important diagnostic characteristics of Aspergillus species, as it serves as a base for the formation of conidia, which produce asexual spores.

Keyword:- fungi , Aflatoxin B1 , yellow corn(Zea mays) , Dhi Qar**.**