Effect of Aqueous Extracts and Alcohol of Turmeric, Thyme and Cardamom in Fungus Growth *Aspergillus flavus* and Production Efficiency of Aflatoxin B1 and B_2

تأثير المستخلصات المائية والكحولية للكركم و الزعتر والهيل في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وكفاءة إنتاجه لسم الافلا B_1 و B_2 *

عقيل عبد نعمة بان طٰه محمد
كلية التربية / جامعة كربلاء

المستخلص

أجريت تجارب مختبريه في مختبر الدراسات العليا بكلية التربية – قسم علوم الحياة / جامعة كربلاء . لدراسة قابلية المستخلصات النباتية المائية والكحولية المجففة لكل من النباتات الكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وانتاجة سم الافلا B_1 وB_2 .

استعملت المستخلصات النباتية للكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* وبنوعيها المائي والكحولي بتراكيز (5 و10 و15) ملغم/مل لدراسة تأثيرها في نمو الفطر *A.flavus* في الوسط الزرعي آكار دكستروز البطاطا Potato Dextrose Agar (PDA) الحاوي على هذه المستخلصات ، فوجد المستخلص الكحولي للكركم والزعتر تثبط نمو الفطر بنسبة 100 % عند جميع التراكيز ، ما عدا التركيز 5 ملغم/مل من المستخلص الكحولي للزعتر ، و أظهر المستخلص الكحولي للنباتات جميعها تفوقا على المستخلص المائي في تثبيط نمو الفطر ، وقد تسببت المستخلصات المثبطة من منع تكوين الابواغ إذ ظهرت بشكل عزلة صغيرة بيضاء . أظهرت معاملة الفطر بتركيز 5 و 10 و 15 ملغم/مل من مستخلص الكركم الكحولي والزعتر المائي في انعدام ظهور سم الافلا B_1 و B_2 . وكذلك بينت النتائج إن معاملة الفطر بتركيز 15 و 10 ملغم/مل من مستخلص الكركم المائي والزعتر الكحولي لم يظهر سم الافلا B_1 و B_2 ، في حين اظهر التركيز 5 ملغم/مل وجود سم الافلا B_1 لكلا المستخلصين . أما المستخلص المائي والكحولي للهيل فقد منع ظهور سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز 15 ملغم/مل ، والتركيز 10ملغم/مل فقد ظهر فيه سم الافلا B_1، في حين ظهر سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز 5 ملغم/مل للمستخلص المائي وظهر النوع B_1 للمستخلص الكحولي عند نفس التركيز . و بينت النتائج باستعمال عدة كواشف كيميائية إذ أن المستخلصات النباتية المؤثرة حاوية على العديد من المركبات الفعالة كمواد حافظة ، فقد احتوى المستخلص الكحولي للزعترعلى جميع المركبات التي ذكرت ما عدا الصابونينات ، أما المستخلص المائي للزعتر فلم يحتوي على الصابونينات والراتنجات و الفلافونيدات ، في حين المستخلص المائي والكحولي للهيل لم يحتويان على والراتنجات والفلافونيدات والفينولات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد وكذلك عدم وجود القلويدات في المستخلص الكحولي للهيل ولا الصابونينات في المستخلص المائي للهيل ، واحتوى المستخلص الكحولي للكركم على الكلايكوسيدات والراتنجات والكربوهيدرات والفينولات ، وانعدم وجود القلويدات والتانينات والراتنجات والفلافونيدات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد في المستخلص المائي للكركم .

Abstract

Laboratory experiments were carried out in the postgraduate laboratories, Biology Department – College of Education / Kerbala University .Studying the viability extracts of plant; aqueous and alcohol of the dried plants turmeric *Curcuma longa* , thyme *Thymus vulgaris* and cardamom *Elettaria cardamomum* ،in fungus grown *Aspergillus flavus* and production – aflatoxin B_1 and B_2 .

Plant extracts had been used at concentrations (5, 10 and 15) mg / ml to study its impact on the growth of fungus *A.flavus* in Potato Dextrose Agar (PDA) containing these extracts, so it was found that, extracted alcohol of turmeric, thyme inhibit mold growth completely at all concentrations, except the concentration 5 mg / ml of alcohol extract of thyme, and alcoholic extracts of plants superior to the aqueous extract in inhibiting the growth of fungus, extracts inhibitory caused preventing the formation of spores as it appeared in a small white isolate.

The fungus grown with concentrations of 5, 10 and 15 mg / ml of alcoholic extract of turmeric and aqueous of thyme showed the disappearance of aflatoxin B_1 and B_2. as well as , results showed that the treatment of fungus concentration of 15 and 10 mg / ml of aqueous

extract of turmeric and alcohol of thyme did not show aflatoxin B_1 and B_2 , while the concentration 5 mg / ml showed the presence of aflatoxin B_1 for both extracts. The aqueous extract and alcohol of the cardamom prevented the appearance of aflatoxin B_1 and B_2 at a concentration of 15 mg / ml, and concentration 10 mg / ml showed aflatoxin B_1 , while the aflatoxin B_1 and B_2 appeared at a concentration of 5 mg / ml of the aqueous extract and the type B_1 of alcohol extract appeared with the same concentration.

Results showed that using several chemicals reagents as effective plant extracts contained many of the active compounds as preservatives, thyme alcohol extract contained all compounds that were previously mentioned except saponins , while the aqueous extract of thyme did not contain saponins , resins and flavonoids , while aqueous and alcohol extraction of the cardamom did not contain resins , flavonoids , phenols , fuocoumarins and triterpenoids , as well as the absence of alkaloids in the alcohol extract to the cardamom and saponins in the aqueous extract of the cardamom , and contained extract alcohol of turmeric on glycosides , resins, carbohydrates, phenols, and the disappearance of the alkaloids and tannins, resins and flavonoids and fuocoumarins and triterpenoids in the aqueous extract of turmeric .

المقدمة Introduction

تملك الأعشاب والتوابل تأريخ طويل في الاستخدامات العلاجية للإنسان ، إذ وجدت العديد من النصوص القديمة التي تشير إلى استخدامها في الحضارات البابلية والسومرية والمصرية **[1]** . وقد قدرت بحوالي (25000 – 500000) نوع نباتي موجود على سطح الأرض ، وتستخدم نسبة قليلة من تلك النباتات بقدر (1 – 10) % كغذاء للإنسان والحيوان ، والتي قد تمتلك بعض الخصائص العلاجية التي تعزى إلى احتوائها العديد من المكونات الفعالة حيوياً مثل الكاربوهيدرات Carbohydrates والبروتينات Proteins والأنزيمات Enzymes والدهون Fats والزيوت Oils والمعادن Minerals والفيتامينات Vitamins والقلويات Alkaloids والتيربينويدات Terpenoids والفلايفونويدات Flavonoids والكوينونات Quinines والكاروتينات Carotenoids والستيرولات Sterols والكلاكوسيدات الحوامض الفينولية البسيطة Simple phenolic glycosides والتانينات Tannins والصابونيات Saponins والفينولات المتعددة Polyphenols **[2]** .

يعد سم الافلا Aflatoxin المنتج بشكل نواتج ايضية ثانوية بواسطة بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* مثل *A. flavus* و*A. parasiticus* و*A. nomius* واحد من أهم السموم الفطرية والذي يظهر في المواد الغذائية ومن أهم أنواعه سم الافلا :B_1 وB_2 وG_1 وG_2 **[3]**.

وقد أجريت العديد من الدراسات لبيان فعالية المستخلصات النباتية والمركبات الفعالة اتجاه فطر *A.flavus* وسم الافلا ، ومنها دراسة**[4]** فقد وجد أن مستخلص الحبة السوداء *Nigella sativa* لهُ القابلية على تثبيط سم الافلا من نوع B_1 وB_2 و G_1عند تركيز 5 % لفطر *A.flavus* في الوسط ألزرعي السائل نقيع النخالة الصلب ، أما زيوت الحبة السوداء فثبطت كل من B_1 وB_2 وG_1 وG_2 عند تركيز 3 % ،في حين مسحوق حبوب القهوة يثبط B_1 وG_1 وG_2 عند تركيز 6 % ، وللكافائين القدرة على تثبيط G_1 وG_2 عند تركيز 2 % . وللمركب الفعال Methyleugenol القدرة على تثبيط الفطر *A.flavus* بنسبة 100 % على الوسط PDA عند تراكيز مختلفة (5 ,1 ,0.5 ,0.1)% **[5]** . في حين وجد **[6]** إن المستخلص المائي لأوراق البصل *Allium cepa* عند تركيز 300ملغرام /مل من الوسط يثبط من الوزن الجاف للفطر *A. flavus* بنسبة 2.3 ملغرام /مل من وسط الزابك Czepek's medium ، إما سم الافلا فقد ثبط بنسبة 51.38 مايكرو غرام /مل من الوسط نفسه ، لكن وجد **[7]** إن لنبات النانخة *Trachyspermum ammi* القدرة على اختزال سم الافلا B_1 وB_2 وG_1 وG_2 بنسبة 80 % . بالإضافة إلى بعض أنواع التوابل والتي تستخدم كمواد حافظة للأطعمة ضد نمو الفطريات المنتجة لسم الأفلا مثل الدار صيني *Cinnamomum cassia* والقرنفل *Syzygium aromaticum* والفلفل *Piper*، بينما الخردل *Brassica* والزنجبيل *Zingiber officinale* فأنها تشجع من نمو الفطريات المنتج لسم الافلا **[5]** و **[8]** .

منذ زمن قديم استعملت مستخلصات الكركم في علاج أمراض الجلد والكبد والقرحة وكذلك استعمل لعلاج الطفيليات المعوية وسموم الأفاعي آنذاك **[9]** ومن خلال الدراسات والبحوث العلمية فقد أشار**[10]** أن نبات الكركم يعد كمضاد للالتهابات والأكسدة والسرطان والطفرة والتخثر والخصوبة ومرض السكري والبكتريا والفطريات والفيروسات والابتدائيات والسم والقرحة . فقد وجد **[11]** أن للمركب الفعال Curcumin الموجد في نبات الكركم له القدرة على تثبيط الفطر Candida albicans . كما استخدم Curcumin في علاج أمراض الأمعاء مثل سرطان القولون **[12]** .

يعد نبات الزعتر من النباتات التي شاعَ استخدامها في وقت مبكر من القرون الوسطى في العديد من الدول بسبب امتلاكه الخصائص المنكهة للغذاء وكذلك في الأغراض الطبية **[13]** . فقد ذكر **[14]** بأن نبات الزعتر يمتلك الفعالية البيولوجية ضد البكتريا والفطريات ومانع للتأكسد ويعمل كمقشع ومسكن للألأم والتشنجات . ولزيوت الزعتر القابلية على تثبيط كل من الفطريات *Rhizoctonia solani* و *Macrofomina phaseolina* و *Fusarium oxysporum* و *Helminthosporium* Spp و *Alternaria alternate* و *Diplodia* Spp **[15]** .

وان نبات الهيل من التوابل التي شاعَ استخدامها منذ القدم في جميع أنحاء العالم **[16]** . وقد ذكر**[17]** أن لنبات الهيل العديد من الأغراض ومنها كمنكهات للغذاء وفي العلاجات الطبية مثل علاج أمراض القناة الهضمية والقلب والكلى والربو والضعف وسوء التغذية وفي تلطيف رائحة الفم . وأن للزيوت الطيارة في نبات الهيل لها القابلية على تثبيط كل من نمو الفطريين *A. fumigatus* و *A.niger* **[18]** والمستخلص الايثانولي لأوراق الهيل لها القابلية على تثبيط الفطر *Colletotrichum gloeosporioides* ا كثر مما علية من المستخلص المائي **[19]**.

ونظراً للأهمية الاقتصادية للمواد الغذائية ، وتماسها المباشر بحياة الإنسان كونها تشكل الغذاء الرئيسي له ، وإمكانية إحداثها تأثيرات ضارة بالصحة ناتجة عن تلوثها بالفطر *Aspergillus flavus* وإفرازه لسم الافلا ، لذا هدفت الدراسة إلى معرفة تأثير المستخلصات النباتية المائية والكحولية المجففة لكل من النباتات الكركم *Curcuma longa* والزعتر *Thymus vulgaris* و الهيل *Elettaria cardamomum* على معدل نمو الفطر *A. flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2 .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

تم الحصول على عزلة الفطرAFZ_3 Aspergillus flavus المنتجة لسم الافلا B_1 و B_2 من مختبر الدراسات العليا – قسم علوم الحياة – كلية التربية / جامعة كربلاء . نتيجة لتجارب سابقة لنفس الباحثين وتم التأكد من ذلك باستخلاص سم الافلا B_1 و B_2 بإتباع طريقة **[20]** وكشف عنه بإتباع طريقة **[21] .**

جمع العينات النباتية وتشخيصها

تم جمع العينات النباتية المستعملة في هذه الدراسة لغرض اختبار فاعلية مستخلصاتها المائية و الكحولية ضد الفطر *A.flavus* وسم الافلاB_1 وB_2، وذلك بشرائها من الأسواق المحلية ومن ثم جُلبت إلى المختبر وتم تنظيف النباتات من الأتربة والشوائب وحفظت جميعها في أكياس ورقية لحين الاستخلاص .

شخصت العينات النباتية في معشب كلية العلوم - بنات / قسم علوم الحياة / جامعة بابل من قبل الأستاذ الدكتور عبد الكريم البيرماني ومثل ما هو مبين في الجدول (1).

الجدول (1) الأنواع النباتية والأجزاء المستعملة في الدراسة .

ت	الاسم العربي	الاسم العلمي	العائلة	الجزء المستعمل
1	الكركم	*Curcuma longa*	Zingiberaceae	الجذور
2	الزعتر	*Thymus vulgaris*	Lamiaceae	الأوراق
3	الهيل	*Elettaria cardamomum*	Zingiberaceae	الثمار

عملية الاستخلاص باستخدام جهاز السوكسوليت Soxhlet

اتبعت طريقة **[22]** في عملية الاستخلاص ، إذ طحنت الأجزاء النباتية باستعمال طاحونة Blender ، وبعدها غربلت الأجزاء المطحونة من خلال غربيل مساحة ثقوبه 2 ملم^2 جمع المسحوق وتركَ عند درجة حرارة 55°م لمدة 72ساعة ، وزن 20 غم من المسحوق الجاف ووضع في جهاز السوكسوليت Soxhlet لبدء عملية الاستخلاص باستعمال 300 مل من الميثانول المطلق 99.9 % كمذيب (للحصول على المستخلص الكحولي) ، أو 300 مل من الماء المقطر كمذيب (للحصول على المستخلص المائي) ، وبذلك تصبح نسبة المسحوق الجاف إلى المذيب (1غم : 15مل) ، واستمرت عملية الاستخلاص لمدة ثلاث ساعات .

بعدها وضع المستخلص الناتج في أطباق بتري زجاجية نظيفة و معقمة ومغلفة من الداخل بأكياس نايلون نظيفة و وضعت في الحاضنة عند درجة حرارة 37 °م وتركت لتجف ، تم اخذ المستخلص الجاف بسهولة بواسطة نزع الكيس من الطبق ومن ثم حفظ بعد إن وزن في أوعية بلاستيكية نظيفة و محكمة الغلق لحين الاستعمال و أطلق على هذا المستحضر المستخلص المائي الجاف أو المستخلص الكحولي الجاف .

الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية

تم قياس الأس الهيدروجيني pH للمستخلصات المائية و الكحولية السائلة بعد إن استخلصت مباشرةً ، بوساطة جهاز قياس الأس الهيدروجيني .

أما النسبة المئوية للمستخلص فتم حسابه بقسمة الوزن الصافي للمستخلص على الوزن الأصلي للمسحوق النباتي الجاف المستعمل 20غم مضروباً في 100 .

الكشوفات النوعية للمستخلصات المائية والكحولية الفعّالة

أجريت مجموعة من الكشوفات النوعية وذلك من أجل التعرف على المكونات الكيميائية الأساسية أو المركبات الفعالة الموجودة في هذه المستخلصات وكالآتي :

1– ألكشف عن القلويدات Alkaloids

تم الكشف عن القلويدات باستعمال الكواشف التالية وحسب **[23]** :

أ - كاشف واكنر Wagner reagent

حُضّر هذا الكاشف بإذابة 1.3 غم من اليود مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر ، ثم يضاف إلية المستخلص النباتي فعند ظهور الراسب البني دل ذلك على وجود القلويدات .

ب - كاشف ماير Mayer reagent

حُضّر هذا ألكاشف على النحو الآتي :

1. بإضافة 1.36 غم من كلوريد ألزئبقوز Hg_2Cl_2 في 60 مل من ألماء ألمقطر .
2. بإذابة 5 غم من يوديد ألبوتاسيوم في 10 مل من الماء ألمقطر .

تم مزج المحلول (1) و (2) وأكمل الحجم إلى 100 مل بإضافة الماء المقطر ، ثم أضيفت قطرات من هذا الكاشف إلى المستخلصات النباتية فعند ظهور راسب ابيض أو عكورة دل ذلك على وجود القلويدات .

2- ألكشف عن ألتانينات (ألعفصيات) Tannins

أ - كشف خلات ألرصاص Lead acetate test

حُضّر المحلول بإذابة 1 غم من خلات ألرصاص في 100 مل من الماء ألمقطر ثم أضيفت عدة قطرات منه إلى أنبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من ألمستخلص . فإذا تكوّن راسب أبيض هلامي ألقوام دل على وجود التانينات **[24]** .

ب - كشف كلوريد ألحديديك Ferric chloride test

أضيفت عدة قطرات من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ بتركيز 1 % إلى أنبوبة اختبار تحوي 0.5 مل من المستخلص . فكان ظهور لون أخضر مزرق دليلاً على وجود التانينات **[25]**.

3- ألكشف عن ألصابونينات Saponins

أ- أضيف 3 مل من المستخلص إلى 2 مل من كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ بتركيز 1 % . فكان ظهور الراسب الأبيض دليلاً على وجود الصابونينات **[26]** .

ب - تم تحضير محلول مائي لمسحوق النباتات الجافة ووضعت في أنبوبة اختبار ورُجّت بشدة ، فكان ظهور رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة دليلاً على وجود الصابونينات **[23]**

4- ألكشف عن ألكَلايكو سيدات Glycosides

أ- كاشف فهلنك Fehling reagent

حضر هذا الكاشف كما يأتي :

1. اذابة 70 غم من كبريتات النحاس المائية $Cu\ SO_4.7H_2O$ في لتر من الماء المقطر .
2. اذابة 240 غم من NaOH و246 غم من ملح روشيل Sodium Potasium tartarate في لتر من الماء المقطر .

مزج حجمان متساويان من محلول (1) و (2) للحصول على كاشف فهلنك ، و عند الكشف مزج 1 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 10 مل من الماء المقطر ، بعدها رشح المحلول ثم اضيف إليه كاشف فهلنك ، فإذا ظهر اللون الأحمر الغامق دل على وجود الكلايكوسيدات**[25]**.

ب- كاشف موليش Molish reagent

أن طريقة عمل هذا الكاشف حسب ما ذكره **[27]** حيث تتم بأخذ 2 مل من المستخلص المراد اختباره و يضاف إليه قطرتان من محلول α-naphthol و يرج المحلول جيدا ، ثم تمسك الأنبوبة بشكل مائل و يضاف 2 مل من حامض الكبريتيك المركز بشكل قطرات على جدار الأنبوبة لحين ظهور طبقتين طبقة الحامض هي السفلى و يفصل بين الطبقتين حلقة بنفسجية اللون عند وجود المواد الكلايكوسيدية .

5- ألكشف عن ألراتنجات Resins

مُزج 1 غم من المسحوق النباتي الجاف مع 10 مل من الكحول الأثيلي 95 % وتُرك المحلول لمدة دقيقة واحدة في حمام مائي بدرجة حرارة 100 مْ ، ثم رُشّح المحلول وأضيف إليه 10 مل من محلول مائي لحامض الهيدروكلوريك 4 % واستدل على وجود المواد الراتنجية بظهور العكورة **[28]**.

6- ألكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

تم الكشف عن الفلافونيدات حسب طريقة **[26]** من خلال الكشفين التالين :

أ- كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي

مُزج 2 مل من المستخلص مع 1 مل من هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي ، فكان ظهور اللون الأصفر دليلاً على وجود الفلافونيدات .

ب - ألكشف عن الفلافونيد والفلافونول

أذيب 1 مل من المستخلص في 1 مل من حامض الكبريتيك المركز. فكان ظهور اللون الأصفر الداكن دليلاً على إن الكشف أجابي .

7- ألكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

- **كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز**

حُضّر كاشف الفينول بإذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر . ثم أضُيف 0.5 مل من هذا الكاشف إلى 0.5 مل من المستخلص في أنبوبة اختبار ورُجّت جيداً ثم أضيف 2.5 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى المحلول . فكان ظهور اللون الأحمر البني دليلاً على وجود الكاربوهيدرات **[29]** .

8- ألكشف عن الفينولات Phenols

• كاشف كلوريد الحديديك Ferric chloride reagent

حُضّر هذا الكاشف بإذابة 1 غم من كلوريد الحديديك $FeCl_3$ في 100 مل من الماء المقطر . وقد رُطّبت ورقة ترشيح بالمستخلص النباتي ، ثم أضيفت قطرات من كاشف كلوريد الحديديك وتم تعريض الورقة إلى بخار الأمونيا . فإذا ظهراللون الأزرق دل على وجود الفينولات **[25]**.

9- ألكشف عن الفيوكيومارينات Fuocoumarins

أضيف 1 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 10 % إلى 1 مل من المستخلص . فكان ظهور اللون الأصفر أو الأصفر المخضر دليلاً على وجود الفيوكيومارينات **[23]** .

10- ألكشف عن الترايتيربينويد Triterpenoids

أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 1 مل من محلول الكلوروفورم ، ثم أضيف المحلول الناتج إلى 2 مل من المستخلص . فكان ظهور اللون الأحمر أو الأرجواني دليلاً على وجود الترايتيربينويد **[23]** .

تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A.flavus* وإنتاج سم الافلا B_1 و B_2

اتبعت طريقة **[5]** ، إذ تم مزج كل من المستخلصات المائية أو الكحولية لكل من نبات الكرم والزعتر والهيل كل على حده مع الوسط ألزرعي آكار دكستروز البطاطا (PDA) بعد إن برد إلى 40 °م ، و بثلاثة تراكيز (5 ، 10 ، 15) % لكل مستخلص من المستخلصات النباتية ، و بمعدل ثلاثة مكررات لكل تركيز ، و بعد تصلب الوسط ، تم نقل قرص بقطر 5 ملم بوساطة ثاقب الفلين Cork borer إلى وسط الطبق من مزرعة الفطر *A.flavus* النامي على وسط PAD و بعمر 5 أيام . وتم استعمال مجموعتين سيطرة الأولى بدون إضافة إي مادة للوسط ألزرعي ، والثانية بإضافة Clotrimazole بتركيز2 ملغم / مل إلى الوسط ، حضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة (2±27) °م و لمدة سبعة أيام . و تم قياس قطر المستعمرة النامية (معدل قطرين متعامدين)، و سجلت النتائج ، وحسبت نسبة التثبيط باستعمال المعادلة الآتية **[30]** :

نسبة التثبيط = [(السيطرة – المعاملة) / السيطرة] X 100

ومن ثم تم الكشف عن سم الافلا B_1 و B_2.

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع المستخلص الأكثر فعالية في نمو الفطر تم اختبار التراكيز 1 ،2 ،3 ،4 ،5 ،6 ملغم/مل من المستخلصات المؤثرة لغرض تحديد أدنى تركيز مثبط MIC لها في نمو الفطر و بالاعتماد على طريقة الانتشارdiffusion method إذ نشر المعلق السبور للفطر *A. flavus* بقدر 2×10^{-4} سبور/مل بواسطة ناشرة spreader على وسط (PDA) بعد تصلبه ، ثم عملت الحفر بوساطة الثاقب الفليني قطر 0.5 سم ووضع كل تركيز من المستخلصات النباتية في حفره بقدر 0.5 مل ، مع الأخذ بنظر الاعتبار بان هناك سيطر موجبة ماء مقطر وسيطرة سالبة بإضافة Clotrimazole بتركيز2 ملم / مل من الماء المقطر إلى الوسط ، وحسب بعد ذلك التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية **[31]** .

التحليل الإحصائي Statistic analysis

تم تصميم التجربة للمستخلصات النباتية بوصفها تجربة عاملية (5x2x3) للنوع النباتي و نوع المستخلص و التركيز على التوالي ، و باستعمال التصميم العشوائي التام Completely Randomized Design (CRD) و بثلاثة مكررات ، و قورنت المتوسطات باستعمال أقل فرق معنوي LSD و على مستوى احتمالية 0.05 وشمل هذا التحليل تجربة تأثير النوع النباتي و نوع المستخلص وتركيزه والتداخل بينها في معدل قطر المستعمرة (سم) **[32]** .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات النباتية .

يوضح الجدول (1) أن أعلى دالة حامضية كانت مسجلة للكركم إذ بلغت 6.96 للمستخلص الكحولي و6.50 للمستخلص المائي ، وفي نبات الزعتر بلغت 5.91 للمستخلص الكحولي و5.54 للمستخلص المائي ، أما الهيل فقد سجل اقل دالة حامضية للمستخلص الكحولي والتي بلغت 5.42 في حين المستخلص المائي سجل 5.98 .

و يلاحظ في الجدول نفسه أن النسب المئوية للمستخلصات المائية أعلى من المستخلصات الكحولية للنباتات المدروسة في ماعدا الكركم ، إذ كانت النسبة المئوية للمستخلصات المائية هي 11.75 % و 11.1 % و 6.25 % للهيل و الزعتر و الكركم على التوالي ، أما النسبة المئوية للمستخلصات الكحولية فقد كانت 9.5 % و 8.8 % و 8.05 % للزعتر و الهيل والكركم على التوالي . و يتبين أن النسبة المئوية للمستخلص المائي لثمار الهيل احتلت المرتبة الأولى ، في حين المستخلص المائي للكركم احتل المرتبة الأخيرة .

الجدول (1) الخواص الفيزيائية و النسب المئوية للمستخلصات المائية و الكحولية للنباتات المدروسة

ت	النباتات	نوع المستخلص	لونه وهو سائل	لونه بعد التجفيف	الدالة الحامضية	الوزن الصافي للمستخلص(غم)	النسبة المئوية للمستخلص %
1	الزعتر	مائي	بني فاتح	برتقالي غامق	5.54	2.22	% 11.1
		كحولي	زيتوني	زيتوني غامق	5.91	1.90	% 9.5
2	الكركم	مائي	أصفر معتم	برتقالي محمر	6.50	1.25	% 6.25
		كحولي	أصفر براق	ذهبي	6.96	1.61	% 8.05
3	الهيل	مائي	ليموني	اصفر فاتح	5.98	2.35	% 11.75
		كحولي	اصفر مخضر	اصفر مخضر	5.42	1.76	% 8.8

الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية

نظرا لما أظهرته المستخلصات النباتية المدروسة من فاعلية تثبيطية عالية اتجاه الفطر *A. flavus* ، جرى التحري عن محتوى المستخلصات المؤثرة من المركبات الفعالة و ذلك باستعمال الكواشف الكيميائية المختلفة ، إذ أظهرت الكشوفات النوعية أن النباتات المدروسة تحوي عددا من المكونات الحافظة الفعالة مثل التانينات و الصابونينات و الكلايكوسيدات و الفينولات و القلويدات و الراتنجات و الفلافونيدات و الكربوهيدرات و الفيوكيومارينات و الترايتيربينويد و غيرها ، و يوضح الجدول (2) أن المستخلص الكحولي للزعتر احتوى على جميع المركبات التي ذكرت ما عدا الصابونينات ، أما المستخلص المائي للزعتر فلم يحتوي على الصابونينات والراتنجات و الفلافونيدات ، في حين المستخلص المائي والكحولي للهيل لم يحتويان على والراتنجات والفلافونيدات والفينولات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد وكذلك عدم وجود القلويدات في المستخلص الكحولي للهيل ولا الصابونينات في المستخلص المائي للهيل ، واحتوى المستخلص الكحولي للكركم على الكلايكوسيدات والراتنجات والكربوهيدرات والفينولات ، وانعدم وجود القلويدات والتانينات والراتنجات والفلافونيدات والفيوكيومارينات والترايتيربينويد في المستخلص المائي للكركم .

الجدول (2) الكشوفات النوعية للمستخلصات النباتية الفعّالة .

ت	الكشوفات النوعية	المستخلص المائي للزعتر	المستخلص الكحولي للزعتر	المستخلص المائي للكركم	المستخلص الكحولي للكركم	المستخلص المائي للهيل	المستخلص الكحولي للهيل
1	**الكشف عن القلويدات**						
	أ- كشف واكنر	+	+	-	-	+	-
	ب- كشف ماير	+	+	-	-	+	-
2	**الكشف عن التانينات**						
	أ- كشف خلات الرصاص	+	+	-	-	+	+
	ب- كشف كلوريد الحديديك	+	+	-	-	+	+
3	**الكشف عن الصابونينات**						
	أ- كشف كلوريد الزئبقيك	-	-	+	-	-	+
	ب- رغوة المحلول المائي	-	-	+	-	-	+
4	**الكشف عن الكلايكوسيدات**						
	أ- كاشف فهلنك	+	+	+	+	+	+
	ب- كاشف موليش	+	+	+	+	+	+
5	**الكشف عن الراتنجات**						
	- كشف حامض HCl 4 %	-	+	-	+	-	-
6	**الكشف عن الفلافونيدات**						
	أ- كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي	-	+	-	-	-	-

	ب- كشف حامض الكبريتيك المركز	-	+	-	-	-	-
7	**الكشف عن الكربوهيدرات** - كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز	+	+	+	+	+	+
8	**الكشف عن الفينولات** - كشف كلوريد الحديديك	+	+	+	+	-	-
9	**الكشف عن الفيوكيومارينات** - كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي	+	+	-	-	-	-
10	**الكشف عن الترايتيربينويد** - كشف حامض الكبريتيك المركز مع الكلوروفورم	+	+	-	-	-	-

تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus* .

أظهرت النتائج في الجدول (3) أن هناك فروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 بين النوع النباتي و نوع المستخلص و التراكيز ، و أن هناك فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 نتيجة التداخل بين العوامل الثلاثة أعلاه .

فمن حيث النوع النباتي أظهر نبات الكركم تفوقاً على بقية النباتات في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر *A. flavus* ، إذ أعطى أقل معدل نمو للفطر و هو 4.45 سم ، و يأتي نبات الزعتر بالمرتبة الثانية بين النباتات في تأثيره التثبيطي إذ أعطى معدل نمو 4.58 سم ، و جاء نبات الهيل بالمرتبة الأخيرة الذي أعطى معدل نمو 5.39 سم ، إذ لم يوجد أي فرق معنوي بين نبات الكركم والزعتر ، في حين يوجد فرق معنوي بين نبات الكركم والهيل ، وكذلك بين نبات الزعتر والهيل و عند مستوى احتمالية 0.05 ، و هذا قد يعود إلى اختلاف في طبيعة و نوعية المركبات التي يحتويها كل نبات أو الجزء النباتي ، فبعضها مثبط و بعضها مشجع و بعضها الآخر من دون تأثير**[33]** .

أما فيما يخص نوع المستخلص فقد أظهر المستخلص الكحولي تفوقاً على المستخلص المائي في تأثيره التثبيطي على نمو الفطر المدروس و بفروقات معنوية و عند مستوى احتمالية 0.05 ، إذ بلغ معدل النمو للفطر باستعمال المستخلص الكحولي 2.95 سم ، في حين كان باستعمال المستخلص المائي 6.66 سم ، و قد يعود هذا التباين إلى اختلاف القطبية فيما يخص المذيب المستعمل إذ تعود إلى اختلاف ثابت العزل الكهربائي لهذه المذيبات ، و من ثم ستختلف المركبات الذائبة في الماء أو الكحول**[34]** .

لقد أعطيت المستخلصات الكحولية فاعلية تثبيطية أعلى من المستخلصات المائية في كل من نباتات الكركم والزعتر، إذ لم يظهر إلا سوى تأثير طفيف للمستخلصات المائية ، أما فيما يخص المستخلص المائي لنبات الهيل الذي أظهر فاعلية تثبيطية أعلى من المستخلص الكحولي ، إذ أشار **[35]** إلى أن الفاعلية التثبيطية القليلة للمستخلصات النباتية قد يعزى إلى قلة كمية المواد الفعالة في المستخلصات ، أو ضعف فاعليتها أو إلى ضرورة فصل المكونات الفعالة لها .

لقد اظهر المستخلص الكحولي للكركم كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر و بالتراكيز 5 , 10 15 ملغم/مل ، فقد كان قطر المستعمرة 0 سم للتراكيز جميعها إذ منع تكون السبورات وظهر الفطر بشكل مستعمرة صغيره بيضاء ، و توجد فروقات معنوية واضحة بينه وبين المستخلص المائي للكركم ، إذ لم يظهر أي تأثير على نمو الفطر فيما عدا تركيز 15 ملغم/مل فقد بلغ قطر المستعمرة عنده 8.5 سم الشكل (1) ، وقد يعزى السبب إلى وجود الراتنجات في المستخلص الكحولي وغيابه في المستخلص المائي.

وكذلك اظهر المستخلص الكحولي للزعتر كفاءة عالية في تثبيط نمو الفطر وبالتراكيز 10, 15 ملغم/مل ، فقد كان قطر المستعمرة 0 سم في حين التركيز 5 ملغم/مل بلغ نمو المستعمرة 2 سم ، وتوجد فروقات معنوية واضحة بينه وبين المستخلص المائي للزعتر ، إذ لم يظهر أي تأثير على نمو الفطر فيما عدا تركيز 15 ملغم/مل فقد بلغ قطر المستعمرة عنده 7.75 سم الشكل (2) ، لربما تعزى إلى وجود الراتنجات والفلافونيدات في المستخلص الكحولي وعدم وجودها في المستخلص المائي.

في حين اظهر المستخلص الكحولي للهيل تاثيراً تثبيطاً معتدلاً على نمو الفطر عند التراكيز 5 , 10, 15 ملغم/مل وبمعدل نمو (4.41 و 4.91 و 5.91) سم ، وتوجد فروق معنوية كذلك بينه وبين المستخلص المائي للهيل فقد كان معدل نمو الفطر 5.25 سم عند التركيز 5 ملغم/مل و 6.41 سم عند تركيز 10 ملغم/مل و 9 سم عند تركيز 15 ملغم/مل الشكل (3) ، ويتبين لنا بأن المستخلص المائي والكحولي للهيل يزيد من معدل نمو الفطر *A. flavus* بزيادة التركيز ، بالعكس على ما هو علية في مستخلصي الكركم والزعتر بنوعيهما المائي والكحولي ، و قد يعود السبب في ذلك إلى التداخل بين المواد المستخلصة و تأثيرها على المادة التي يعود اليها التأثير التثبيطي ، إذ أشار**[36]** إلى أنه أحياناً يؤدي وجود المكونات الفعالة مع بعضها في المستخلصات الخام Crude Extracts إلى تأثير سلبي وليس فعال .

و قد يعود التباين بين النباتات في تأثيرها على نمو الفطر *A. flavus* المدروس إلى ما تحتويه من مركبات كيميائية أساسية و ثانوية و نوعية مركباتها الفعالة التي يعود اليها التأثير التثبيطي ، إذ يحتوي النبات الواحد على أكثر من مادة فعالة ، لما لها من استخدام كمواد حافظة للأغذية ، فرايزومات نبات الكركم تحتوي على الزيوت الطيارة مثل *a*-phellandrene و Sabinene و Cineol و Borneol و Zingiberene و Sesquiterpines ،بالإضافة إلى Curcumin **[10]** .إما أوراق نبات الزعتر فقد تحتوي على أهم مركبين Thymol و Carvacrol **[37]**. في حين تحتوي ثمار الهيل على مركبين مهمين 1,8 – Cineole و α-Terpinyl acetate **[38]** .

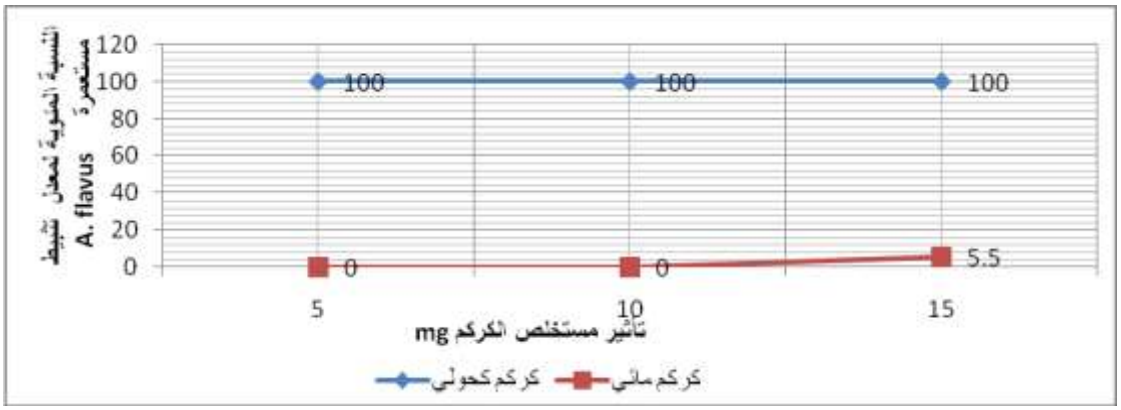
الجدول (3) تأثير النوع النباتي ومستخلصه وتركيزه والتداخل بينهما في معدل قطر مستعمرة (سم) الفطر *A. flavus* بعد أسبوع من الحضن بدرجة حرارة 27 ± 2 °م .

النبات	التركيز / نوع المستخلص	مقارنة 1 ماء مقطر	مقارنة 2 Clotrimazole 2mg/ml	5 mg /ml	10 mg/ml	15 mg/ml	المعدل للنوع النباتي
كركم	كحولي	9	0	0	0	0	4.45
	مائي	9	0	9	9	8.5	
زعتر	كحولي	9	0	2	0	0	4.58
	مائي	9	0	9	9	7.75	
هيل	كحولي	9	0	4.41	4.91	5.91	5.39
	مائي	9	0	5.25	6.41	9	
المعدل للتركيز		9	0	4.49	4.89	5.19	

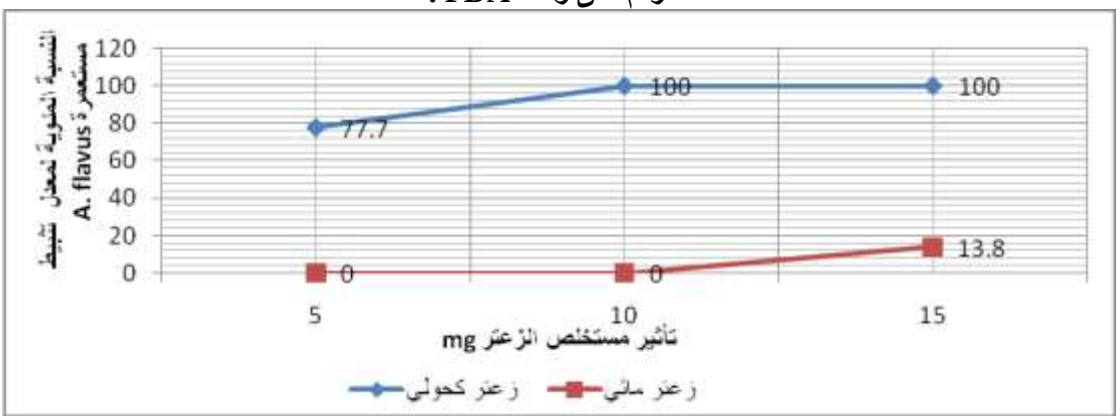
المعدل لنوع المستخلص	كحولي	مائي
	2.95	6.66

العامل	النوع النباتي	نوع المستخلص	التركيز	التداخل
LSD 0.05	0.22	0.18	0.28	0.68

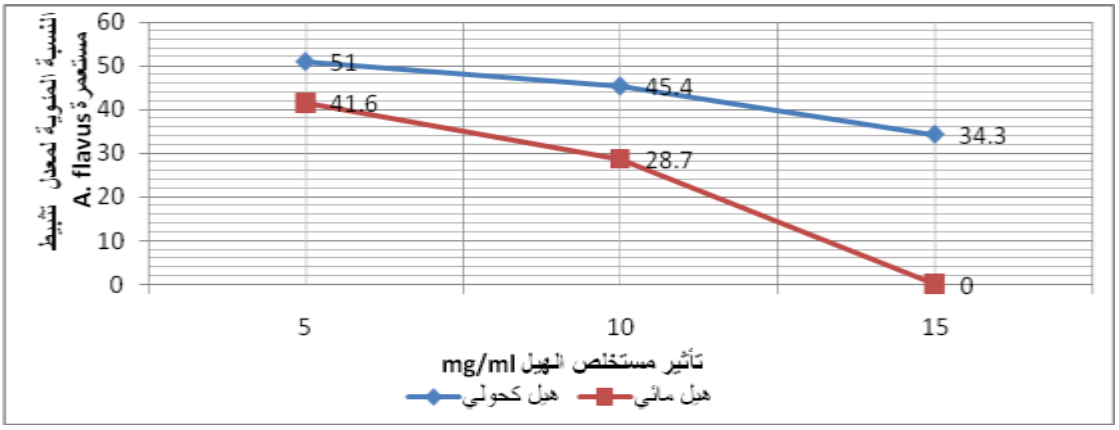
- التجربة أجريت بثلاث مكررات .



الشكل (1) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الكركم على وسط PDA .



الشكل (2) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الزعتر على وسط PDA .



الشكل (3) النسبة المئوية للتثبيط نتيجة تعريض الفطر *A. flavus* إلى تراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لنبات الهيل على وسط PDA .

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

بعد معرفة تأثير المستخلصات النباتية في نمو الفطر *A. flavus* و تحديد نوع المستخلص الأكثر فعالية في نمو الفطر ، ظهر من الجدول (4) إن المستخلص الكحولي للكركم والزعتر سجلا أدنى تركيز مثبط هو 1ملغم / مل ، في حين المستخلص المائي لهما لم يسجل إي تركيز مثبط أدنى ، إما نبات الهيل فقد كان التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي هو 2 ملغم /مل بينما المستخلص المائي سجل 4 ملغم / مل .

الجدول (4) التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات النباتية الفعّالة في الفطر *A. flavus* .

ت	النوع النباتي	نوع المستخلص	التركيز المثبط الأدنى
1	**الكركم**	الكحولي	1 mg/ml
		المائي	-
2	**الزعتر**	الكحولي	1 mg/ml
		المائي	-
3	**الهيل**	الكحولي	2 mg/ml
		المائي	4 mg/ml

تأثير المستخلصات النباتية في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 من قبل الفطر *A. flavus* .

تم تحديد سم الافلا B_1 وB_2 نوعياً المنتج من قبل العزلة *A.flavus* AfZ_3 في وسط (PDA) الحاوي على تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية بعد تنمية العزلة فيه لمدة 7 أيام بدرجة 27±2°م ، من خلال المقارنة مع سم الافلا B_1 وB_2 القياسي.

أظهرت النتائج في الجدول (5) إن معاملة الفطر بتركيز 5 و 10 و 15 ملغم/مل من مستخلص الكركم الكحولي والزعتر المائي يؤدي إلى انعدام ظهور سم الافلا B_1 و B_2 . وكذلك بينت النتائج إن معاملة الفطر بتركيز 15 و 10 ملغم/مل من مستخلص الكركم المائي والزعتر الكحولي لم يظهر سم الافلا B_1 و B_2 ، في حين التركيز 5 ملغم/مل اظهر وجود سم الافلا B_1 لكلا المستخلصين. أما المستخلص المائي والكحولي للهيل فقد منع ظهور سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز 15 ملغم/مل ، والتركيز 10ملغم/مل فقد ظهر فيه سم الافلا B_1 ، في حين ظهر سم الافلا B_1 و B_2 عند تركيز 5 ملغم/مل للمستخلص المائي وظهر النوع B_1 للمستخلص الكحولي عند نفس التركيز .

وقد يعود السبب في عدم ظهور سم الافلا B_1 و B_2 هو إن المستخلصات تعمل على تغير التركيب الكيميائي للسم أو ترتبط بشدة معه**[7]** ، أو ربما تمنع المستخلصات تكون مركب Acetate من الايض الأولي الذي يعتبر أللبنة الأساسية في تكوين سم الافلا ، إما في حالة ظهور سم الافلا B_1 وغياب B_2 هو لربما ارتباط المستخلصات بأحد مركبات مسار تكوين سم الافلا B_2 .

ويتفق تأثير المستخلص الكحولي للكركم والمائي للزعتر على إنتاج سم الافلا مع ما وجده **[4]** إذ إن جميع التراكيز (2 و4 و6) % من الكافائين في وسط النخالة الصلبة ثبط إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 ، في حين لا تتفق نتائج تأثير المستخلص المائي للكركم والكحولي للزعتر والمستخلص المائي والكحولي للهيل مع ما وجده**[4]** إن زيادة تركيز القهوة في وسط النخالة الصلبة يؤدي إلى ظهور سم الافلا ، لكنها تتفق مع ما وجده**[39]** إذ إن معاملة الفطر بتراكيز قليلة من الزيت الطيار لقشور ثمار الكريب فروت عند التركيز (0.125 و0.25) % في وسط مستخلص الخميرة والسكروز أدى إلى ظهور النوع B_1، لكن زيادة التركيز إلى 0.5% لم يظهر سم الافلا.

الجدول (5) تأثير التراكيز المختلفة ملغم/مل من المستخلصات النباتية الفعالة في إنتاج سم الافلا B_1 وB_2 بفعل *A. flavus* في وسط PDA .

ت	النوع النباتي	نوع المستخلص	سم الافلا					
			B_1			B_2		
			5	10	15	5	10	15
1	الكركم	كحولي	-	-	-	-	-	-
		مائي	+	-	-	-	-	-
2	الزعتر	كحولي	+	-	-	-	-	-
		مائي	-	-	-	-	-	-
3	الهيل	كحولي	+	+	-	-	-	-
		مائي	+	+	-	+	-	-

+ : أنتاج سم الافلا .
- : عدم أنتاج سم الافلا .

المصادر Reference

1. Peter, K. V. & Nirmal - Babu, K .(2004) . Introduction: in Peter, K. V. (2004). Handbook of Herbs and Spices . 2nd Volume ., Woodhead Publishing Ltd : 365 pp.
2. Olowokudejo, J. D. ;Kadiri, A. B. & Travih, V.A. (2008) . An Ethnobotanical survey of herbal markets and medicinal plants in lagos state of Nigeria . Ethnobotanical Leaflets., 12: 851-65 .
3. Alpsoy, L. (2010). Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. Afr. J. Biotechl. ,9(17):2474-2481.
4. Maraqa, A. ;AL-sharo'a, N. F. ;Farah, H. ;Elbjeirami, W. M. ; Shakya, A. K. & Sallal, A. J. (2007) . Effect of Nigella sativa extract and oil on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* . Turk . J. Biol., 31: 155-159.
5. Sudhakar, P.;Latha, P.;Sreenivasulu, Y.;Bhaskar Reddy, B. V.;Hemalatha, T. M. ;Balakrishna, M. and Raja Reddy . (2009) . Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AfB1) in peanut by methyleugenol . K. Ind. J. Exp. Biol. ,47:63-67.
6. Reddy,V. K ; Srinivas, M. ; Reddy, A. R. ; Srujana, G. ; Surekha, M. & Reddy, S. M. (2011) . Plant extracts in the management of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* . Intern. J. Pharma . Bio. Sci., 2(2) :492 – 498 .
7. Hajare, S. S. ; Hajare, S. N. & Sharma, A. (2005) . Aflatoxin inactivation using aqueous extract of ajowan (*Trachyspermum ammi*) seeds . J. food Sci., 70(1): 29 – 34 .
8. Rajasinghe, M. ;Abeywickrama, K. & Jayasekera, R. (2009) . Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and aflatoxin formation in selected spices during storage . Trop. Agr. Res. Ext., 12(1):1- 6 .
9. Quiles, J. L. ;Mesa, M. D. ;Ramírez-Tortosa, C. L. ;Aguilera, C. M. ;Battino, M. ;Gil, A. & Ramírez-Tortosa, M. C. (2002) . *Curcuma longa* extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits . Arterioscler Thromb Vasc Biol., 22:1225-1231.
10. Chattopadhyay, I. ;Biswas, K. ;Bandyopadhyay, U. & Banerjee, R. K. (2004) . Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications . Current Sci ., 87 (1, 10): 44 – 53.
11. Çikrikçi, S. ; Mozioglu, E. & Yilmaz, H. (2008) . Biological activity of curcuminoids isolated from *Curcuma longa* . Rec. Nat. Prod., 2(1): 19 – 24 .
12. Ireson, C. R, ;Jones, D. J. L. ; Orr, S. ;Coughtrie, M. W. H. ;Boocock, D. J. ;Williams, M. L. ;Farmer, P. B. ;Steward, W. P. & Gescher, A. J. (2002) . Metabolism of the cancer

chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine . Cancer Epidemiol. , 11 : 105 – 111.

13. Stahl-Biskup, E. & Venskutonis, R. P. (2004) . Thyme : in Peter, K. V. (2004). Handbook of Herbs and Spices. 2nd Volume ., Woodhead Publishing Ltd : 365 pp.
14. Kulevanova, S. & Panovska, T. K. (2001) . Antioxidant activity of essential oils of different wild *Thymus* L. Species . Bull. Chem. Technol. Macedonia , 20(1): 61-66 .
15. El – zemity, S. R. & Ahmed, S. M. (2005) . Antifungal activity of some essential oils and their major chemical constituents against some phytopathogenic fungi . J. Pest. Cont. Environ. Sci., 13(1): 61 – 72 .
16. Lwasa , S & Bwowe, E . (2007) . Exploring the economic potential of cardamom (*Elettaria cardamomum*) as alternative and promising income source for Uganda's smallholder farmers . Afr. Crop Sci. Soci., 8:1317 – 1321.
17. Verma, S. K. ;Jain, V. & Katewa, S. S. (2009) . Blood pressure lowering , fibrinolysis enhancing and antioxidant activities of cardamomum (*Elettaria cardamomum*). Ind. J. Biochemistry & Biophysics ., 46 : 503 – 506.
18. Bansod,S. & Rai, M. (2008). Antifungal activity of essential oils from indian medicinal plants against human pathogenic *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* ., World J. Med . Sci . 3 (2): 81-88 .
19. yulia, E ;shipton, W. A. & Coventry, R. J. (2006) . Activity of some plant oils and extracts against *Colletotrichum gloeosporioides* . plant Pathol. J. , 5 (2) : 253 – 257 .
20. Aryantha, N. P. ; Lunggani, A. T. (2007) . Suppression on the aflatoxin-B production and the growth of *Aspergillus flavus* by lactic acid bacterial (*Lactobacillus delbrueckii* , *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus planetarium*) . Biotechnol., 6(2):257-262.
21. Bokhari, F. M. (2002) . Aflatoxins production by *Aspergillus flavus* ,isolated from different food stuffs commonly used in Jeddah region , Saudi Arabia . Pak. J. Biol. Sci., 5(1):69-74.
22. Kerem, Z. ; German-Shashoua, H. & Yarden, O. (2005). Microwave-assisted extraction of bioactive saponins from chickpea (*Cicer arietinum* L) . J. Sci. Food Agric., 85:406–412.
23. Harborne,J.B. (1984) . Phytochemical Methods : Aguide to Modern Techniques of Plants Analysis . 2nd . edt. , Chapman & Hall , London , New York .
24. Ahmed,M. ; Nazil,S. & Anwar,M. (1989) . Studies on tannins from bark of *Pinus roxburghii* . J. Chem. Soc. Pakistan ., 11 : 213 – 217 .
25. Adedayo,O. ; Anderson,W. ; Young,M. ; Sncickus,V. ; Patil,P. & Kolawole,D. (2001) . Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower . pharmacut ., Biol. 39 : 1 – 5.
26. AL-Khazragi,S.M. (1991) . Biopharmacological study of Artemisia herba alba . M.Sc.thesis . Univ . Baghdad .
27. الشيخلي، محمد عبد الستار و عبد الجليل، فريال حسن و العزاوي، حسن فياض(1993). الكيمياء الحياتية العملي، الجامعة المستنصرية.
28. Shihata, I. M.(1951). A pharmacological study of Anagallis arvensis . M. D. Vet. Thesis. Cairo University.
29. Meyer,E. & Walther,A. (1988) . Methods for the estimation of protein , lipid , carbohydrate and chitin in fresh water invertebrates . J. Arch. Hydroboil ., 13 : 161 – 177 .
30. Yigit, A. & Korukluoglu, M. (2007) . The effect of potassium sorbate , NaCl and PH on the growth of food spoilage fungi . Annals Microbiol., 57 (2): 209-215.
31. Thenmozhi, M. & Kannabiran, K. (2010) . Studies on isolation, classification and phylogenetic characterization of novel antifungal *Streptomyces sp*. VITSTK7 in India . Curr. Res. J. Biol. Sci., 2(5): 306-312 .
32. الإمام ، محمد محمد الطاهر (2007) . تصميم وتحليل التجارب . دار المريخ للنشر ، المملكة العربية السعودية ، ط1 : 408 صفحة .
33. Gonçalez, E. ; Felicio, J. D. ; Pinto, M. M. ; Rossi, M. H. ; Medina, C. ; Fernandes, M. J. B. & Simoni, I. C. (2003) . Inhibition of aflatoxin production by *Polymnia sonchifolia* and its in vitro cytotoxicity . Arq. Inst. Biol., 70 (2) : 139 -143 .

34. Bernard, T.(1997). Reactions in Solution. An Applied Analytical Approach. 1st . edt ., John Wiley & Sons Ltd. England : 554 pp.

35. مجيد، قيثار رشيد و الشطي، صباح مالك حميد و عبد الكريم، علي حسين (1998). المحتوى الكيميائي للزعتر Thymus vulagaris و تأثير مستخلصه التثبيطي على بعض البكتريا الموجبة و السالبة لصبغة كرام. مجلة البصرة للعلوم الزراعية. المجلد11 ، العدد1: 41-50 .

36. Al-Rawi, A.(1988). Poisonous plants of Iraq. 3rd . edt. Baghdad.

37. WHO (World Health Organization) . (1999) . Monographs on Selected Medicial Plants . 1ST volume ., WHO Library Cataloguing in Publication Data : 289 pp.

38. Korikanthimath, V. S. (2001) . Cardamom (small) : in Peter, K. V. (2001) . Handbook of Herbs and Spices. 1st volume ., Woodhead Publishing Ltd : 326 pp .

39. الوائلي ، هديل وائل (2006) . تأثير الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* وأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citratus* في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وانتاجه للافلاتوكسين B_1. رسالة ماجستير/ كلية التربية / ابن الهيثم – جامعة بغداد .