# استخلاص وتنقية المنتجات الأيضية الثانوية لفطر *Aspergillus fumigatus* ذات التأثير البيولوجي على بعض السلالات البكيرية من الأوساط الغذائية المختلفة

*تاريخ استلام البحث 2001/10/21- تاريخ قبوله 2003/03/05*


## ملخص

يساهم بحثنا في اجاد أنسب بيئة تخمرية تعتمد على السكروز، مستخلص الخميرة أو مسحوق كل من (الأرز، الشعير والقمح) كمصادر للكربون والنيتروجين عند pH=6 والتحضين على °C(30-25-20) تحت ظروف ساكنة لانتاج كمية معتبرة من الكتلة الخلوية لاحسن عزلة فطرية *A. Fumigatus* وكمية وفيرة من المنتجات الأيضية الثانوية ذات التأثير البيولوجي على بعض سلالات بكتيريا الاختبار. أظهر الاختبار البيولوجي ثلاث **مجموعات** من البكتيريا حسب حساسيتها للمنتجات الأيضية الثانوية للفطر (مقاومة ، حساسة ، شديدة الحساسية).

أظهرت النتائج أن في 100ml من بيئة التخمر المضاف لها 3g من مسحوق الأرز بلغت الكتلة الخلوية 2245 mg و 18.6 mg من المنتجات الأيضية الثانوية للعزلة الفطرية *A. Fumigatus* (101). أما البيئة المضاف لها 4g من مسحوق القمح سجلت بها 2633mg من الكتلة الخلوية و 18.2 mg من المنتجات الأيضية الثانوية للفطر. المنتجات الأيضية الثانوية تمت تنقيتها بالمذيبات العضوية، كروماتوجرافيا العمود (أوكسيد الألومنيوم $Al_2O_3$ ثم كروماتوجرافيا الطبقة الرقية). حددت قيم معامل السريان ($R_f$ (0.051-0.937 لكل البقع الناتجة بعد تجفيفها والمحددة بعشرة 10 مركبات تتقارب في التركيب الكيميائي.


***الكلمات المفتاحية:*** *المنتجات الأيضية، السلالات البكتيرية، التأثير البيولوجي، بيئات التخمر، باسيليس فيوميقاتيس.*


**ل. دهيمات**
قسم البيولوجيا
كلية علوم الطبيعة و الحياة
جامعة منتوري
قسنطينة، الجزائر
**م.م. عطا الله**
المركز الوطني للبحث
الدوخي، القاهر، مصر



## Abstract

Our research consists has determine the optimum media of fermentation (Czapeck-dox) containing of sucrose, enriched by yeast extracted or powder of (rice, barley or wheat) like source of carbon and nitrogen, to pH=6 test, after 14 days of fermentation stationary at (20,25,30)°C to get a better biomass of *Aspergillus fumigatus (101)* and a level raised of secondary metabolites having an inhibitory effect on the bacteria test. The results of the bio essay tests gotten like follows: (Bacteria resistant, less resistance, Very sensitive ).

In 100ml of fermentation medium enriched by 3g powder of rice. gave an important mass cellular 2245mg and 18.6 mg of the metabolites secondary d'*A. fumigatus (101).* The extraction and purification of the secondary metabolites has been achieved by different organic solvents, their separation is made by Thin Layer Chromatography (TLC) and Chromatography on Column (CC), this survey to permit the obtaining of 10 compounds according to their $R_f$ (0.051-0.937).


***Keywords:*** *Secondary metabolites, Bacteria's test, Bioassay, Fermentation, medium, Aspergillus fumigatus.*


## Résumé

Notre recherche consiste à déterminer le milieu optimum de fermentation (Czapeck-Dox) contenant de saccharose, enrichi par extrait de levure ou farine de( riz , orge ou blé) comme source de carbone et d'azote, à pH=6 test, après 14 jours de fermentation stationnaire à(20,25,30)C pour obtenir une meilleur biomasse *d'Aspergillus fumigatus(101)* et un niveau élevé de métabolites secondaires ayant un effet inhibiteur sur les bactéries. Les résultats des tests de bio essai obtenus comme suit : Bactéries résistantes, sensibles, très sensibles.

Dans 100ml de milieu de fermentation enrichi par 3g de poudre du riz. a donné une importante masse cellulaire 2245mg et 18.6 mg du métabolites secondaires d'*A. fumigatus (101)*. L'extraction et purification des métabolites secondaires a été réalisé par différentes solvants organiques, leurs séparation est faites par chromatographie sur couche mince(CCM) et chromatographie sur colonne (CC), cette étude à permis l'obtention de 10 composants selon leurs $R_f$ (0.051-0.937).


***Mots clés :*** *Métabolites secondaires, Bactéries test, Bio-essai, Milieux de fermentation, Aspergillus fumigatus.*


**L. DEHIMAT**
Département de Biologie
Faculté des Sciences
Université Mentouri
Constantine, Algérie
**M.M. ATALLA**
National Research
Center, Dokhi
Cairo, Egypt


**بتتبع** تاريخ المضادات الحيوية، فانه من المؤكد اعتبار السنوات (1939-1945) م نقطة تحول في تاريخ الطب والميكروبيولوجيا. لعبت الأكتينوميستات Actinomycètes دورا بارزا في هذا المجال. وأنتجت عددا كبيرا من المضادات الحيوية المهمة التي تستعمل في الطب، وفي تغذية الحيوانات [15]. كما أن المضادات الحيوية يمكن أن تنتج

© جامعة منتوري، قسنطينة، الجزائر، 2003.

من أنواع مختلفة لنفس الجنس الميكروبي [23،25].

العديد من المنتجات الأيضية الميكروبية ذات الفعل المضاد للبكتيريا تم استخلاصها وتنقيتها، لكن البعض منها تم إدماجها ضمن المركبات الدوائية [7]. يفرز فطر *Aspergillus fumigatus* العديد من المواد الأيضية الثانوية في حالة توفر أوساط غذائية ذات مصادر كربونية وازوتية تحتوي على العناصر الأزمة والضرورية لنمو وتطور الفطر بصفة جيدة والتي قد يكون للبعض منا تأثيرا مبيدا أو مثبطا لنمو الأنواع البكتيرية [22].

إن الدراسة المخبرية التي أجريناها مكنتنا من معرفة أنسب بيئة غذائية وكذا الظروف البيئية المحيطة بنمو الفطر لانتاج كمية معتبرة من الكتلة الخلوية لحسن عزلة فطرية *A. fumigatus*، وكمية وفيرة من المنتجات الأيضية الثانوية ذات التأثير البيولوجي على بعض السلالات البكتيرية.

## الطرق والوسائل

### 1- عينة الفطر *Aspergillus fumigatus*

تم الحصول على عزلات الفطر المستخدمة من مخبر علم الأحياء الدقيقة التطبيقية كلية العلوم قسم علوم الطبيعة والحياة- جامعة منتوري قسنطينة. سبق عزله من حبوب النجيليات جدول (1). وتم تعاريفها من طرف (Dehimat 1990) وتأكد تعريفها من طرف Atalla و[*]Bretton. نميت العزلة الفطرية لأجراء الدراسات المختلفة المظهرية والمجهرية واستخلاص منتجاتها الأيضية الثانوية [9].

### 2- العزلات البكتيرية

حصل على العزلات البكتيرية

*Acenitobacter sp., Bacillus subtilus,*
*Escherichia coli, Klebsiella pneumonia,*
*Protus vulgaris, P. mirabilis,*
*Pseudomonas aerogenosa,*
*Pseudomonas sp.,*
*Staphylococcus aureus,*
*S. blanc, S. épidermis,*

من مخبر علم الأحياء الدقيقة – المستشفى الجامعي ابن باديس ومستشفى الكلى- قسنطينة.

| العزلات الفطرية | المصدر | منطقة العزل |
|---|---|---|
| *Aspergillus fumigatus (8)* | حمص مستورد (3) *Cicer arietium* | برج بوعراريج |
| *Aspergillus fumigatus (9)* | القمح الصلب (1) *Triticum durum* M BB | قسنطينة |
| *Aspergillus fumigatus (100)* | القمح الصلب (2) *Triticum durum* BD17 | قسنطينة |
| *Aspergillus fumigatus (101)* | القمح الصلب (3) *Triticum durum* Ch. | قسنطينة |
| *Aspergillus fumigatus (102)* | القمح اللين (1) *Triticum vulgare* NR steros | قسنطينة |
| *Aspergillus fumigatus (163)* | خرطال (1) *Avoine avan* | سطيف |
| *Aspergillus fumigatus (164)* | خرطال (2) *Avoine provisoire* | سطيف |
| *Aspergillus fumigatus (165)* | شعير (2) *Hordeum vulgare* tichidrette | سطيف |

**جدول 1:** عينات العزلات الفطرية *Aspergillus fumigatus* المعزولة من مصادر مختلفة من صوامع غلال الشرق الجزائري (برج بوعراريج، سطيف وقسنطينة).

### 3- البيئات الغذائية

#### 1.3- بيئات النمو الصلبة والسائلة

استخدمت بيئة Czapeck-Dox: تتم اذابة مكونات البيئة:

$NaNO_3$ (2 g/L), $MgSO_4$ $7H_2O$ (0.5 g/L),
KCl (0.5 g/L), $KH_2PO_4$ (1 g/L),
$FeSO_4,7H_2O$ (0.001 g/L), $C_{12}H_{22}O_{11}$ (20 g/L),

في حجم 500ml من الماء المقطر مع التسخين والتحريك الجيد, يكمل الحجم إلى 1000 مل, يضبط pH البيئة عند (6-7) وتوزع في دوارق بحجم 250ml وتعقم في الأتوكلاف تحت ضغط يقدر ب 1,5 ضغط جوي ودرجة حرارة 120°م لمدة 20دقيقة. وتحفظ بعد ذلك في الثلاجة لحين الاستعمال.[3]

نفس مكونات بيئة Czapeck -Dox السائلة مع اضافة الأجار - اجار بمقدار 20g/L. وتجدر الإشارة أن هذا الأخير تتم اضافة بالتدرج لتجنب تكوره في الماء. تعقم البيئة في الأتوكلاف تحت نفس الشروط السابقة [13].

**2.3- بيئات التخمر :**جهزت هذه البيئات بدءا من بيئة Czapeck -Dox السائلة وفق [13].

#### 1.2.3 - بيئات التخمر المضاف إليها السكروز

وزعت بيئة التخمر المحضرة سابقا في فلاسكات سعتها 250 ml بحجم 100 ml، يضاف لكل منها تراكيز مختلفة من السكروز (0، 0.25، 0.5، 1، 1.5، 2، 3، 5)g/L.

#### 2.2.3 - بيئات التخمر المضاف إليها مستخلص الخميرة

يضاف لبيئة التخمر المضاف إليها 4g سكروز/100 ml كبيئة قاعدية، يضاف إليها تراكيز مختلفة من مستخلص الخميرة (0، 0.7، 2، 3، 5)g/L.

#### 3.2.3 - بيئات التخمر المضاف إليها مسحوق الأرز

يضاف لبيئة التخمر المضاف إليها 4g سكروز/100 ml كبيئة قاعدية، يضاف إليها تراكيز مختلفة من مسحوق الأرز (0، 1، 2، 3، 4، 5)g/L .

[*] A. Bretton, Faculté de Botanique, Université Clermont Ferrand II, France.

**4.2.3 - بيئات التخمر المضاف إليها مسحوق الشعير**

يضاف لبيئة التخمر المضاف إليها 4g سكروز/ 100 ml كبيئة قاعدية، يضاف إليها تراكيز مختلفة من مسحوق الشعير (0، 1، 2، 3، 4، 5)g/L .

**5.2.3 - بيئات التخمر المضاف إليها مسحوق القمح**

يضاف لبيئة التخمر المضاف إليها 4g سكروز/100 ml كبيئة قاعدية، يضاف إليها تراكيز مختلفة من مسحوق القمح (0، 1، 2، 3، 4، 5)g/L .

**4- الدراسة المظهرية والمجهرية لفطر *A. fumigatus***

بالاستعانة بقطرة من كاشف Lactophénol تمت الدراسة المجهرية [11].

**5- الاختبار البيولوجي للمنتجات الأيضية الثانوية لفطر *A. fumigatus***

اجرى الاختبار البيولوجي باتباع طريقة أقراص من مستعمرات العزلات المختلفة لفطر *A. fumigatus* بقطر 5 mm تؤدي إلى إقاف نمو الأنواع البكتيرية. توضع أقراص العزلات الفطرية على سطح الأطباق بتري تحتوي على الأجار المغذي (GN) يساعد على نمو مختلف الأنواع البكتيرية، بعد 18 ساعة من التحضين على 37°م يسجل متوسط قطر منطقة التثبيط أو التأثير لكل قرص [6].

**6 - إنتاج الكتلة الخلوية والمنتجات اليضية لعزلات فطر *A. fumigatus***

**1.6 - قياس الكتلة الخلوية**

إستخدمت العزلات الفطرية

*A. fumigatus (8 ,99 ,100 , 101 , 163 , 164 , 165)*

لتقدير كفاءتها على إنتاج كمية معتبرة من الكتلة الحيوية في بيئات التخمر المختلفة من مزارع عمرها 7 أيام ، حيث حقنت بيئات التخمر بمعدل $10^6$ جرثومة/ ml 1. ثم التحضين على (20، 25، 30)°م تحت ظروف ساكنة لمدة 14 يوم. أجريت التجربة من مكررين ، بعد إنقضاء فترة التحضين ، جفف الغزل الفطري على درجة حرارة (105 - 110)°م لمدة 3 ساعات يعاد التجفيف لمدة ساعة مرة أو أكثر حتى ثبات الوزن الجاف [12].

**2.6 - استخلاص وتنقية المنتجات الأيضية الثانوية لفطر *A. fumigatus (101)***

تم حقن بيئات التخمر المضاف لها مستخلص الخميرة بحجم 50 ml بمعدل $10^6$ جرثومة/ ml 1 من العزلة الفطرية *A. Fumigatus (101)* في دوارق سعة 250 ml تحتوى على 50 ml، وتحضن على درجة حرارة 30°م لمدة اسبوعين (14) يوما تحت ظروف ثابتة اجريت التجربة من 3 مكررات [14].

**1.2.6 - الاستخلاص بالمذيبات العضوية :**

بعد انتهاء مدة التحضين يضاف لكل حوجلة حجم مماثل من الكلوروفورم 50 ml ، تقطع المزرعة الفطرية بالخلاط الكهربائي مع التسخين على درجة حرارة 40 °م ويرشح المستخلص خلال قطعة شاش أو موسلين، يتم التخلص من الكلوروفورم وفق عملية التبخير تحت التفريغ من خلال سلفات الصوديوم اللامائى Anhydro - Sodium

يذاب الراسب في 10 ml من Ethyl Acetate (EA) ويضاف إليه Oxalate de potassium 1N بحجم مماثل، ويضبط pH المحلول عند 2 بالتنقيط بحمض (HCl) المركز. يجزأ المحلول ويفصل إلى طبقتين. يضاف إلى الطبقة الحامضية حجم مماثل من الكلوروفورم ويعدل ال pH عند 10 بإضافة بكربونات الصوديوم ($NaHCO_3$) (1N)، ويجزا المحلول ويفصل 3 مرات. يجمع مستخلص الكلوروفورم ويغسل بالماء المقطر (حجم / حجم) 3 مرات ويفصل.

يبخر الكلوروفورم في جهاز التبخير تحت التفريغ Rotavapeur يجفف الراسب من خلال سلفات الصوديوم الصوديوم الامائي Anhydros. Sodium باستعمال جهاز التجفيف (Dessiccateur) للحصول على المنتجات الأيضية الثانوية الخامة لفطر *A. fumigatus (101)*.

**2.2.6 - كروماتوغرافيا العمود:**

**Chromatographie sur Colonne (CC)**

يسخدم عمود (10 x 2.5) cm يحتوي على اكسيد الألمنيوم ($Al_2O_3$) ويضاف اليه عينة المنتجات الأيضية الثانوية الخام بعد اذابتها في 10 ml من البنزين، يستقبل مستخلص البنزين النازل في حوجلة سعتها 500 ml والممثل في المنتجات الأيضية الثانوية الخامة المجمعة على بعضها.

**3.2.6 - كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة:**

**Chromatographie sur couche mince (CCM)**

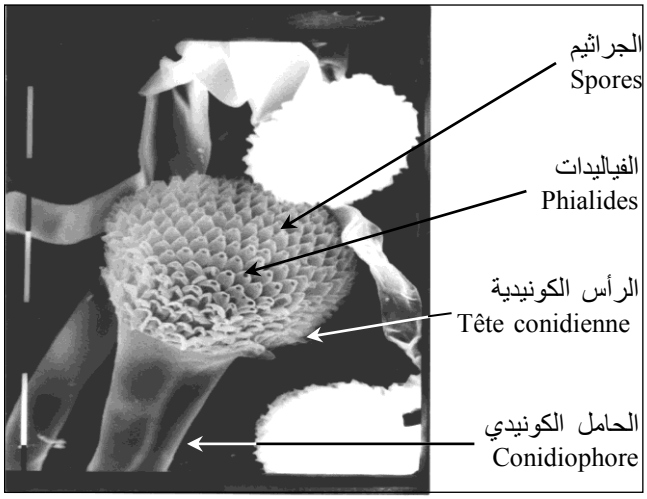
جرى سريان للمواد الأيضية الثانوية الخامة المجمعة على صفائح زجاجية من (Silicagel G F254) بسمك 0.5 cm، توضع الصفائح في المحلول العضوي الذواب والمتكون من:

(5 : 4 : 1) (Toluene - Ethyl Acetate - Acid Formique) (حجم / حجم / حجم)، تقرأ النتائج بتعريض الصفائح الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي $\lambda$ = 365 nm.

## النتائج والمناقشة

من المشاهدة العينية تبدو مستعمرة عزلات *A. fumigatus* بشكل خيطي، مسطحة وشفافة في الأيام الأولى من النمو، لتتلون بالأحمر خلال 3 إلى 4 أيام، وتصبح خضراء برونزية بعد ذلك. أما الملاحظة المجهرية سمحت بمعرفة أن العزلة الفطرية تبدو بشكل هيفات ملساء، متفرعة, تكون ميسليوم شفافا متشابكا، يكون حامل كونيدي

طويل ينتهي برأس منتفخة، تتوضع عليها حويصلات Phialides متراصة ومتزاحمة، تخرج منها أجسام صغيرة الحجم تعرف بالجراثيم Spores. هذه الملاحظات سجلت من طرف عدد من الباحثين الذين أشتغلوا كثيرا على العزلة الفطرية *A. fumigatus* [3،9،23]. شكل (1).




**شكل (1):** الحامل الكونيدي للعزلة الفطرية *Aspergillus fumigatus* تحت المجهر الإلكتروني (تكبير= 3380)

تم معرفة مدى حساسية الأنواع البكتيرية لتأثير اقراص بقطر 5 mm من عزلات فطر *A. fumigatus* (8 ,99 ,100 , 101 , 163 , 164 , 165) النامية على بيئة الأجار المغذي لمدة 18 ساعة من التحضين على درجة حرارة 37°م، تبين من الجدول (2) أن متوسط قطر منطقة التثبيط يختلف من عزلة إلى أخرى بالنسبة للسلالات البكتيرية المختلفة ويتراوح ما بين mm (15-10).

أبدت السلالة *Acenitobacter sp.*، مقاومة للمنتجات الأيضية لمختلف عزلات الفطر بـ mm (13-10) تلتها *Klebsiella pneumonia (1)* بـ mm (13-11.6)، في حين أبدت السلالة *Staphylococcus blanc* حاسية شديدة بـ (13- 15) mm، تلتها كل من *Escherichia coli (1,2)* بـ (12.70 - 14.60) mm، 14 , 14.20 - على الترتيب، *Pseudomonas sp.* بـ (13-14.10) mm ثم السلالات البكتيرية:

*P. mérabilis, Protus vulgaris,*
*klebseilla pneumonia (é), Bacillus subtilis,*

وأخيرا:

*S. épidermis, Staphylococcus aureus,*
*Pseudomonas aerogenas.*

ومما تجدر الإشارة إليه أن غالبية العزلات الفطرية لها أثير مباشر في تثبيط نمو مختلف السلالات البكتيرية الممرضة وغير الممرضة، الموجبة والسالبة مع صبغة جرام. كما يمكن التنويه أن العزلتين *A. fumigatus (101, 8)* كانا لهما الأثر الواضح على تثبيط نمو السلالات البكتيرية المختلفة. هذا يتوافق وما أشار إليه [1،4،8،20]، ويذكر [22] أن التوزيع التكراري للفطر *A. fumigatus* سواء ممرض أو متطفل يوضح قدرته على إفراز السموم المثبطة لنمو البكتيريا الموجبة والسالبة مع صبغة جرام. كما أن الفطر معروف بقدرته المرضية العالية على النبات وبعض عزلاته ممرضة للأنسان والحيوان [22،26].

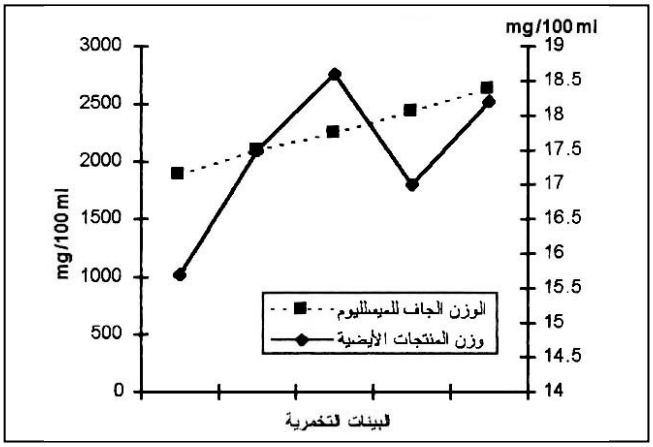
تم تنمية العزلات الفطرية *A. fumigatus (8, 99, 100, 101, 163, 164, 165)* على بيئات تخمرية مختلفة في محتواها من السكروز، مستخلص الخميرة، مسحوق كل من الأرز، الشعير أو القمح وبعض العناصر المعدنية في بيئة Czapeck -Dox السائلة، عند pH =6 ودرجات حرارة (20، 25 ن 30)°م لمدة 14 يوم من التحضين تحت ظروف ساكنة، للاختيار أنسب وسط غذائي تخمري يمكن تنمية العزلات الفطرية عليه لإنتاج كتلة خلوية تعطي كمية معتبرة من المنتجات الأيضية الثانوية ومنه أحسن عزلة فطرية. أظهرت النتائج المسجلة في الجدول (3) والشكل (2) أن 100 ml من البيئة رقم 3 المحتوية على بيئة Czapek- Dox بها 4g سكروز مضافا لها 3g من مسحوق الأرز وتعتبر كأحسن بيئة لإعطاء 2245 mg من الوزن الجاف للميسليوم و16.8 mg من المنتجات الأيضية الثانوية للعزلة الفطرية *A. fumigatus (101)*. ليس بالضرورة أن أكبر كتلة خلوية تعطي أكبر كمية من المنتجات الأيضية الثانوية الخامة،

| السلالات الميكروبية | متوسط قطر نمو عزلات فطر *A. fumigatus* (mm) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **8** | **99** | **100** | **101** | **102** | **163** | **164** | **165** |
| *Acenitobacter sp.* | 12.00 | 11.00 | 12.00 | 13.00 | 12.70 | 10.00 | 11.00 | 12.00 |
| *bacillus subtilis* | 12.40 | 12.60 | 14.00 | 14.20 | 14.20 | 14.10 | 13.70 | 13.80 |
| *Escherichia coli (1)* | 14.60 | 14.50 | 14.50 | 14.70 | 14.70 | 14.20 | 14.50 | 14.60 |
| *Escherichia coli (2)* | 13.00 | 14.00 | 12.80 | 13.10 | 12.70 | 13.00 | 13.00 | 13.00 |
| *Klebsiella pneumonia (1)* | 13.00 | 11.60 | 12.20 | 11.80 | 11.40 | 11.60 | 11.70 | 11.80 |
| *Klebsiella pneumonia (2)* | 14.00 | 12.00 | 12.00 | 13.00 | 13.80 | 12.80 | 12.30 | 13.00 |
| *Proteus vulgaris* | 14.00 | 12.00 | 12.70 | 11.00 | 10.00 | 14.50 | 13.80 | 11.00 |
| *Proteus merabilis* | 13.60 | 13.00 | 12.80 | 13.00 | 11.80 | 12.00 | 12.00 | 12.20 |
| *Pseudomonas aerogenas* | 13.50 | 13.00 | 13.60 | 12.80 | 12.00 | 12.60 | 14.00 | 13.00 |
| *Pseudomonas sp.* | 14.00 | 13.70 | 13.00 | 13.10 | 13.10 | 13.80 | 14.10 | 13.70 |
| *Staphylococcus aureus* | 13.00 | 13.00 | 12.80 | 13.10 | 13.20 | 13.00 | 11.00 | 12.80 |
| *Staphylococcus blanc* | 15.00 | 14.00 | 14.80 | 14.80 | 14.00 | 13.00 | 13.80 | 13.70 |
| *Staphylococcus epidermis* | 13.00 | 13.40 | 13.60 | 13.00 | 12.80 | 13.40 | 13.80 | 13.60 |

**جدول 2:** حساسية السلالات الميكروبية لأقراص قطرها 5mm من عزلات فطر *Aspergillus fumigatus* النامية على بيئة الأجار المغذي (GN) لمدة 18 ساعة من التحضين على درجة حرارة 37°م.

| رقم البيئة | بيئة Czapeck -Dox | تركيز السكروز g/100ml | الإضافات التخمرية | الوزن الجاف لميسليوم الفطر mg/100ml | وزن المنتجات الأيضية للفطر mg/100ml |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | + | 4.0 | ـــــ | 1885 | 15.7 |
| 2 | + | 4.0 | 3g مستخلص الخميرة /100ml | 2101 | 17.5 |
| 3 | + | 4.0 | 3g مسحوق الأرز /100ml | 2245 | 18.6 |
| 4 | + | 4.0 | 4g مسحوق الشعير /100ml | 2436 | 17.0 |
| 5 | + | 4.0 | 4g مسحوق القمح /100ml | 2633 | 18.2 |

**جدول 3:** اختيار أهم البيئات التخمرية التي أعطت كمية معتبرة من الكتلة الخلوية والمنتجات الأيضية الثانوية لفطر *Aspergillus fumigatus (101)* .




**شكل(2):** أهم البيئات التخمرية التي أعطت كمية معتبرة من الكتلة الخلوية والمنتجات الأيضية الثانوية لفطر *A. fumigatus (101)*.

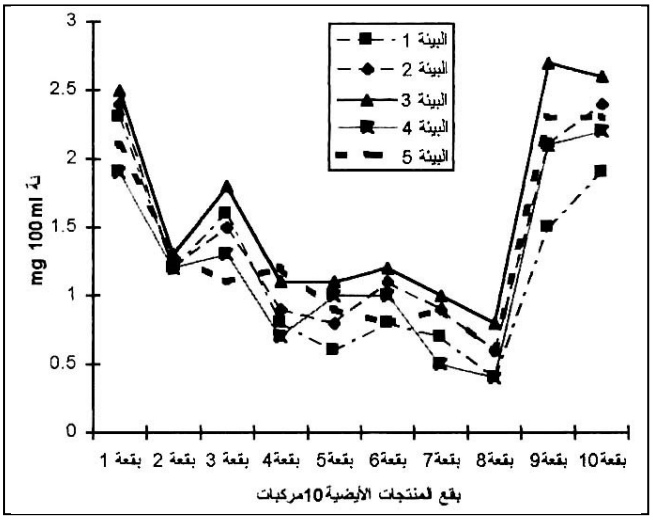
كما هو موضح في البيئة رقم 5 التي أسفرت فيها النتائج على 2633 mg من الكتلة الخلوية مقابل 18.2 mg من المنتجات الأيضية الثانوية. إن السكروز كمصدر للكربون مع مسحوق الأرز كمصدر للنيتروجين يؤديان إلى توفير العناصر الازمة والضرورية لنمو وتطور الفطر بصفة جيدة شكل (2). وهذه النتائج تتوافق إلى حد كبير مع ما أشار إليه كل من : [8،14،24]. كما أن فطر *A. fumigatus* مثل باقي الفطريات يحتاج إلى عوامل عديدة لها التأثير البين على نموه، ويعتبر الكربون والأزون من العناصر المغذية الضرورية والفعالة، كما أن الأملاح النعدنية وبعض الفيتامينات يمكنها أن تنشط نمو الفطر وهذا ما أشار إليه كل من [10،2،19،17،16،21].

تعد انتهاء فترة التحضين لمدة 14 يوم من تنمية فطر *A. fumigatus (101)* على بيئات التخمر Czapeck -Dox ذات تراكيز معلومة من (سكرو، مستخلص الخميرة، مسحوق الأرز، مسحوق الشعير ومسحوق القمح) أجرى استخلاص المنتجات الأيضية الثانوية من كل بيئة تخمرية، وتمت التنقية بالمذيبات العضوية كروماتوجرافيا العمود باستخدام عمود أكسيد الألومينيوم $Al_2O_3$، ثم كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة بالسريان على ألواح Silica gel F254 وباستخدام مخلوط المذيب Toluene-Ethyl Acetate Acid formique حجم/حجم/حجم (1: 4 : 5) بالطريقة المذكورة في الطرق والوسائل. بعد التجفيف حددت قيم معامل السريان $R_f$ لكل البقع الموجودة الناتجة.

تبين من الجدول (4) والشكل (3) أن نوعية وكمية المنتجات الأيضية الثانوية المستخلصة تختلف تبعا للبيئات التخمرية، وكذا العناصر اللازمة للإنتاج، تباين في قيم معامل السريان $R_F$ تراوح بين (0.051-0.937).

| رقم البقعة | معامل السريان $R_f$ | لون البقع تحت الضوء المرئي | الموجة القصيرة 254 nm | الموجة الطويلة 365 nm | نقطة الانصهار |
|---|---|---|---|---|---|
| | الخصائص الفيزيائية للبقع | | | | |
| 1 | 0.051 | أصفر | بني | بنفسجي | 192 - 190 |
| 2 | 0.093 | | أصفر برتقالي | بنفسجي باهت | 192 - 190 |
| 3 | 0.218 | | طوبي | بنفسجي | 212 - 210 |
| 4 | 0.375 | | أصفر باهت | بنفسجي باهت | 212 - 210 |
| 5 | 0.505 | | أزرق باهت | بنفسجي | 192 - 190 |
| 6 | 0.590 | | أخضر | بنفسجي باهت | 182 - 180 |
| 7 | 0.656 | | طوبي | بنفسجي باهت | 192 - 190 |
| 8 | 0.697 | أزرق | أخضر مزرق | أخضر غامق | 212 - 210 |
| 9 | 0.821 | بني مصفر | بنفسجي | أسود | 222 - 220 |
| 10 | 0.937 | أصفر | بني | بنفسجي غامق | 192 - 190 |

**جدول (4):** قيم $R_f$ والخواص الفيزيائية للمنتجات الأيضية الثانوية لفطر *Aspergillus fumigatus (101)* .




**شكل (3):** أوزان المنتجات الأيضية الثانوية للعزلة الفطرية النامية على أنسب بيئات التخمر المختلف *A. fumigatus(101)*.

لون البقع عند مشاهدتها بمصباح الأشعة فوق البنفسجية (UV) بطول الموجة القصيرة 254 nm تراوح بين (بني، أصفر برتوقالي، طوبي ن أصفر باهت، أزرق باهت،

أخضر، أخضر مزرق، بنفسجي)، والطويلة 365 nm(بنفسجي، بنفسجي باهت، أخضر غامق، بنفسجي غامق)، أما في الضوء العادي ظهرت بعض البقع بالألوان (أصفر، أزرق، بني مصفر). بناءا عليه حددت 10 مركبات مما يجدر التنويه إليه هو أن نقاط انصهار هذه المنتجات الأيضية كانت كما يلي:

(180- 182)°م بالنسبة للمركب (6)، (190-192)°م بالنسبة للمركب (1،2، 5، 7،10) و (210-212)°م بالنسبة للمركبات (3، 4 ، 8 ،9). لوحظ تداخل بين المركبات أثناء سريانها في العمود، مما يدل على وجود تقارب بعضها في التركيب الكيميائي وهذا ما لاحظه : [8،14].

| رقم البقعة | $R_F$ | أنسب بيئات التخمر المختلفة | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 0.051 | 2.3 | 2.4 | 2.5 | 1.9 | 2.1 |
| 2 | 0.093 | 1.2 | 1.2 | 1.3 | 1.2 | 1.3 |
| 3 | 0.218 | 1.6 | 1.5 | 1.8 | 1.3 | 1.1 |
| 4 | 0.375 | 0.8 | 0.9 | 1.1 | 1.0 | 1.2 |
| 5 | 0.505 | 0.6 | 0.8 | 1.1 | 0.7 | 0.9 |
| 6 | 0.590 | 0.8 | 1.1 | 1.2 | 1.0 | 0.8 |
| 7 | 0.665 | 0.7 | 0.9 | 1.0 | 0.5 | 0.9 |
| 8 | 0.697 | 0.4 | 0.6 | 0.8 | 0.4 | 0.6 |
| 9 | 0.821 | 1.5 | 2.1 | 2.7 | 2.1 | 2.3 |
| 10 | 0.937 | 1.9 | 2.4 | 2.6 | 2.2 | 2.3 |
| المجموع mg/100ml | / | 11.8 | 13.9 | 16.1 | 12.3 | 13.5 |
| المنتج الخام mg/100ml | / | 15.7 | 17.5 | 18.6 | 17.0 | 18.2 |
| مركبات أخرى mg/100ml | / | 3.9 | 3.6 | 2.5 | 4.7 | 4.7 |

**جدول 5:** أوزان المنتجات الأيضية الثانوية للعزلة الفطرية *A. fumigatus (101)* النامية على أنسب بيئات التخمر المختلف.

يبين جدول (5) الأوزان المختلفة للمنتجات الأيضية الثانوية للعزلة الفطرية *A. fumigatus (101)* النامية على أنسب بيئات التخمر المختلفة، ومنه يلاحظ أن المنتجات الأيضية الثانوية تواجدت بكميات متقاربة في بيئات التخمر المناسبة لنمو وتطور الفطر أي في البيئات التي أعطت أحسن النتائج. أما بعض المركبات (1، 9، 10) لوحظت بكميات معتبرة مقارنة بباقي المركبات، علاوة على المركب (8) الذي لوحظ وبكميات ضئيلة مع كل بيئات التخمر. وهذا يدل على مدى تأثير العناصر المغذية على النشاط الأيضي للعزلة الفطرية وقدرتها على النمو والتطور. كما سجل وجود مركبات أو شوائب أخرى علاوة على المنتجات الأيضية الثانوية المقصودة من البحث والتي سبق وأن درست من طرف [1].

## خـاتمة

يعتبر استخلاص وتنقية المنتجات الأيضية الثانوية من المصادر الميكروبية وخاصة الفطريات من الميادين التي يجب الاهتمام بها أكثر فأكثر لما لها من تطبيقات علمية في مجالات عدة، طبية، صناعية وزراعية. أن تنمية الفطريات على بيئات تخمرية طبيعية التركيب الكيميائي ذات فوائد عدة. أن النتائج المحصل عليها في بحثنا مشجعة للغاية مما يحفزنا على متابعة البحث خصوصا في تشخيص المنتجات الأيضية الثانوية المستخلصة ومعرفة خصائصها وطبيعتها الكيميائية، لتدخل مستقبلا حيز الاختبارات والتحاليل في مختلف الميادين.

## REFERENCES


**[1]-** Atalla M.M. and Dehimat L., *Egypt. J. Appl. Sc*. 9(5), (1994), pp. 250-263.

**[2]-** Berger C.C., Mez W.G. and Selva H.M., Coll. Physicians, Sung. Univ. New-York., Antimicrob. Agents. Chemother. 45(4), (1973), pp. 388-391.

**[3]-** Botton B., Breton A., Fevre M., Ph. Guy J., Larpent P. and Veau P., "Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle", Masson, (1990), pp. 95-105.

**[4]-** Cahagnier F. and Mutton F.L., "Les mycotoxines: connaissances actuelles et risque pour la santé dans la chaîne alimentaire", (1984), pp.3-45.

**[5]-** Carbonnelle B.F., Denis A., Marmonier G. and Rivargues P., "Bactériologie médicale: techniques usuelles", (1987), pp. 224-243.

**[6]-** Clément N.L., *J. Assoc. Annal. Chem*., 51, (1968), pp. 611-612.

**[7]-** Daguet G.L. and Charbbert Y.A., *Antibiotique*, (1986), p. 230.

**[8]-** Davis N.D., Diener V.L. and Eluridj D.W., *Appl. Microbiol*., 14, (1966), pp.378-380.

**[9]-** Dehimat L. and Atalla M.M., "Etude des mycotoxines de moisissures contaminant les céréales et légumes secs variées", thèse de magister (1990), ISN, Univ. Constantine.

**[10]-** Domsch K.H., Gams W. and Anderson T.Y., "Compendium of fungi", Vol. I, Academic Press Publishers, London, New-York, Torento, Sydney, (1980).

**[11]-** Dorothy E.T. and Christensen M.C., *Mycologia,* 78(3), (1986), pp. 475-477.

**[12]-** Feriera N.P., *Microbiological Aspect*., (1967), pp. 157-168.

**[13]-** Guiraud J. and Galzy P., "Analyses microbiologiques dans les industries alimentaires", Collection Génie Alimentaire, Les éditions de l'usine, (1980), p. 21.

**[14]-** Kieksy J.W. and Cole R.J., "Serming for toxin production fungi", *Mycopathologia et Mycologia Application*, 54, (1974), pp. 291-296.

**[15]-** Korozybski T., Kowszyk G.Z. and Kurzlowiez W., "Antibiotics, origin, nature and properties", Pergaman, Oxford, (1967).

**[16]-** Kurbatskaya Z.A., *Int. Microbiol. Virusal*, Kiev, (USSR), 38(3),(1976a). pp. 299-302.

**[17]-** Kurbatskaya Z.A., *Int. Microbiol. Virusal*, Kiev, (USSR), 38(4), (1976b). p. 4769.

**[18]-** Kurbatskaya Z.A. and IbraginovA.G., *Int. Microbiol. Virusal*, Kiev, (USSR), 41(4), (1979), pp. 358-362.

**[19]-** Kurbatskaya Z.A. and Trosnetiskii A.A., *Int. Microbiol. Virusal*, Kiev, (USSR), 83(3), (1986), pp. 51-54.

**[20]-** Lee Ung Soo, Jen Hyarg Suk, Tanaka Tochit Sugu, Toyaski Noritsume Yoschit, Sungn On Yan, Jincho Chamin and Treno Yochio, *Appl. Environ. Microbiol*., 52(6), (1986), pp. 1258-1260.

**[21]-** Rao K.K., Ptel U.P. and Patel B., Fac. Sci. Mahajara, Soyajirora, Univ. Boroda, India, *Indian. J. Exp. Biol.*, 15(7), (1974), pp. 588-589.

**[22]-** Rapper K.B. and Fennel I.D., "The genes *Aspergillus*", William and Wilkinson, Baltimore, (1965), p. 4743.

**[23]-** Richard Cole J., Jerry W., Kirksey Joe W., Dorner R., David M., Wilson J.C., Johanson J.R., Neil A. Buel, Games P., Springh Kuldip K., Chexal J.C., Richard Cox H., *J. Agric. Food. Chem*., 125 (4), (1977), p. 41.

**[24]-** Shonura T., Ezoki N., Tsurworka T., Niwa T., *J. Antibiot*., 23, (1970), pp. 155-161.

**[25]-** Smith D.F. and Lunech G.P., *J. Dairy. Sci*., 56, (1973), pp. 828-829.

**[26]-** Thruston J.R., Cyewski S.J., Pier A.C. and Richard J.L., *Amer. J. Vet. Res*., 33, (1972), p. 929.

**[27]-** Woo P.W.K., Dion H.W. and Bartz Q.R., "Butirosins β-aminoglucosside antibiotics III structures", *Tetrahedron. Litt*., (1971), pp. 2625-2662.


□