مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (5) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (5) 2018

تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات الصبار (*Opuntia ficus-indica*) تجاه عزلة من فطر *Aspergillus niger*

الدكتورة نوال علي*
الدكتورة هاجر ناصر**
أمجد ديب***

(تاريخ الإيداع 18 / 2 / 2018. قُبِل للنشر في 2 / 10 /2018)

□ ملخّص □

أُجريت هذه الدراسة لتقييم الفعالية التثبيطية للمستخلصات المائية، الإيتانولية والميتانولية لسوق، أزهار وثمار نبات الصبار (*Opuntia ficus-indica*) بتراكيز (125، 250، 500، 1000) ملغ/مل إزاء عزلة من فطر *Aspergillus niger* ومقارنتها مع المحلول المائي للصاد الحيوي (الفلوكونازول) بتركيز 10 مكغ/مل. بينت الدراسة اختلاف فعالية المستخلصات المدروسة في قدرتها التثبيطية تجاه الفطر المدروس، حيث أظهر المستخلص الميتانولي للأزهار أعلى نسبة تثبيط (76.86، 81.32)% عند التركيزين (500، 1000) ملغ/مل على التتالي، تلاه المستخلص الميتانولي للساق بنسبة تثبيط بلغت (73.49، 76.14) % عند التركيزين السابقين، ومن ثم المستخلص الإيتانولي للأزهار بنسبة تثبيط (40.96، 57.83) % عند ذات التركيزين السابقين، في حين بلغت نسبة تثبيط الفلوكونازول 65.66% عند التركيز المستخدم، بينما كانت المستخلصات المائية للأزهار، الثمار والساق الأقل تأثيراً بنسب تثبيط بلغت على التتالي (36.74، 23.49، 12.53) % عند التركيز 1000 ملغ/مل.

الكلمات المفتاحية: نبات الصبار *Opuntia ficus-indica*، مستخلصات، *A.niger*، فلوكونازول.

*أستاذ – قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
**أستاذ – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.
***طالب دراسات عليا (ماجستير) – قسم الكيمياء البيئية في المعهد العالي لبحوث البيئة – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم الأساسية المجلد (40) العدد (5) 2018
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Basic Sciences Series Vol. (40) No. (5) 2018

Evaluating The inhibitory Efficacy Of Cactus plant Extracts (*Opuntia ficus-indica*) Against The Isolation Of *Aspergillus niger* Fungus

Dr. Nawal Ali[*]
Dr. Hajar Nasser[**]
Amjad Deeb[***]

(Received 18 / 2 / 2018. Accepted 2 / 10 /2018)

□ ABSTRACT □

This study was carried out to evaluate the inhibitory effect of aqueous, ethanolic and methanolic extracts of the cladodes, flowers and fruits cactus plant (*Opuntia ficus-indica*) with concentrations of (125, 250, 500, 1000) mg/ml against the isolation of *Aspergillus niger* fungus and compared it with aqueous solution of antibiotic (fluconazole) at concentration 10 µg/ml. The study showed a difference in efficacy of studied extracts in inhibiting the growth of studied fungus, The methanolic extract of flowers showed higher inhibiting ratios (76.86, 81.32) % at concentrations (500, 1000) mg/ml respectively, followed by the methanolic extract of cladode by inhibiting ratios reached (73.49, 76.14) % at the previous concentrations, then followed by the ethanolic extract of flowers by inhibiting ratio (40.96, 57.83) % at the same of previous concentrations, while inhibiting ratio of fluconazole reached 65.66% at the used concentration, whereas the aqueous extracts of flowers, fruits and cladode had the lowest effect by inhibiting ratios reached (36.74, 23.49, 12.53) % respectively at concentration 1000 mg/ml.

Key words: Cactus plant (*Opuntia ficus-indica*), extracts, *A. niger*, fluconazole.

[*]**Professor, Department of Botany, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[**]**Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[***] **Master Student, Department of Environmental Chemistry at Higher Institute for Environmental Researches, Faculty of Sciences, Tishreen University, Lattakia, Syria,**
E-mail: amjad21992@outlook.com.

مقدمة:

ازدادت في الآونة الأخيرة معدلات الإصابة بالفطريات الغازية وبشكل ملحوظ خلال العقدين الماضيين، مما أسهم في ازدياد معدل الوفيات وبشكل خاص لدى المرضى ضعيفي المناعة، وقد حدث ذلك نتيجة لمقاومة أنواع من الأحياء الدقيقة (جراثيم، فطريات، ... إلخ) لعدد من الصادات الحيوية، والتي تحتفظ بعديد من الآثار الجانبية (Sardi *et al*., 2011; Kuleta *et al*., 2009).

تتباين الأمراض الفطرية في طبيعتها، العوامل المسببة لها، وتوزعها، وبذلك تتراوح العدوى التي تسببها للإنسان، من عدوى سطحية للجلد والأظافر (1.7 بليون عدوى/سنة في جميع أنحاء العالم) إلى داء مبيضات جلدي مخاطي (أكثر من 85 مليون عدوى/السنة) إلى عدوى فطرية جهازية (أكثر من 2 مليون عدوى/السنة) (Brown *et al*., 2012; Willey *et al*., 2008; Rappleye and Goldman, 2006).

تتخذ الفطريات ومنها جنس *Aspergillus* (الرشاشيات) أساليب وراثية وفيزيولوجية متعددة لتجنب دفاعات المضيف مسببة بذلك الإصابة والمرض بوساطة إفرازها أنزيمات خارج خلوية، والتي تعد أحد أهم عوامل الخطورة الكامنة، ومن هذه الأنزيمات (الإيلاستاز، البروتيناز، الكاتالاز، الفوسفوليباز C) (Alpsoy, 2010; Kuleta *et al*., 2009; Blankenship and Mitchell, 2006).

يشكل جنس *Aspergillus* عامل خطورة مهم على الصحة العامة، إذ توصف بعض أنواعه بكونها عوامل ممرضة للبشر ومفرزة لسموم ضارة (Reverberi *et al*., 2010)، ويعد استنشاق الأبواغ المحمولة بالهواء الطريق الرئيس لحدوث العدوى بهذه الفطريات، ويمكن تبعاً لمناعة المضيف للأبواغ المستنشقة أن تُقتل من قبل الخلايا البالعة (Phagocytes)لدى الأشخاص ذوي المناعة القوية، بينما تستطيع الأبواغ لدى الأشخاص ضعيفي المناعة الهروب من الخلايا البالعة مُحدثة مجموعة واسعة من الأمراض تتراوح بين (الحساسية الرئوية والعدوى الدموية) (Oliveira and Caramalho, 2014)، وترتبط تقريباً كل الأمراض المحدثة بالرشاشيات، مع عدوى غازية تعرف باسم *Aspergillosis*، تترافق مع معدل وفيات مرتفع قد يصل إلى 60 % (Hohl and Feldmesser, 2007; Lin *et al*., 2001).

يعد النوع *A.niger* أحد أهم مسببات أمراض الرشاشيات عند الإنسان ويدعى بالرشاشية السوداء، وهو من المسببات الشائعة لالتهاب الأذن الفطرية Otomycosis، والتي تسبب الألم، فقدان سمع مؤقت، وفي الحالات الشديدة إتلاف قناة الأذن وغشاء الطبل، ويأتي في المرتبة الثالثة من حيث الخطورة بعد *A.fumigatus* (الرشاشية الدخناء) و *A.flavus* (الرشاشية الصفراء)، (Manisha and Panwar, 2012; Araiza *et al*., 2006).

يستخدم لعلاج داء الرشاشيات مجموعة من الصادات الحيوية تعرف بمركبات الآزول منها الفوريكونازول الذي يعد الخط الأول للعدوى الغازية، والإيتراكونازول الخيار الرئيس لعلاج داء الرشاشيات التحسسي والمزمن، (Stensvold *et al*., 2012)، وبالرغم من ذلك تبين وجود أنواع من الرشاشيات لديها مقاومة تجاه تلك المركبات (Prigitano *et al*., 2016)، فتطلبَّ ذلك تقييم مركبات جديدة ذات فعالية مضادة للفطريات، وقد حظيت المركبات الطبيعية بالاهتمام الكبير في العقد الماضي (2004–2015) لتكون مصادر علاجية جديدة (Toure *et al*., 2011; Kamba and Hassan, 2010).

أشار الكثير من الباحثين في مجال الصادات الطبيعية للأحياء الدقيقة (جراثيم وفطريات) إلى استخدام المستخلصات النباتية لأسباب عديدة منها; وفرتها، سهولة الحصول عليها، قلة كلفتها، والأهم من ذلك كونها أكثر فائدة لقلة تأثيراتها الجانبية (DeBoer *et al*., 2005).

استعمل نبات الصبار (*Opuntia ficus-indica*) في الطب الشعبي التقليدي لدوره في علاج العديد من الأمراض المتضمنة فعاليات مضادة للالتهاب، خافضة لشحوم الدم، واقية للأعصاب، مضادة لقرحة المعدة، وبالإضافة للفعاليات المضادة للأكسدة، كما استعمل أيضاً لعلاج الداء السكري، الحروق، التهاب القصبات، الربو وعسر الهضم، وقد أظهرت المركبات الفعالة المستخلصة من أجزاء النبات فعاليات تثبيطية عالية تجاه الأحياء الدقيقة بما فيها الفطريات (Belay *et al*., 2015)، فقد اختبر Ennouri *et al*., (2014) فعالية مستخلص الهكسان لأزهار نوعين من نبات الصبار خلال أربع مراحل من الإزهار (*Opuntia ficus-indica, Opuntia stricta*) تجاه نوعين من الفطريات (*Aspergillus niger, Candida lipolytica*)، فكان مستخلص الهكسان للأزهار الكاملة للنوعين هو الأكثر فعالية تجاه فطر *A.niger*، وأظهر التحليل الكيميائي بوساطة جهاز الكروماتوغرافيا الغازية (GC–MS) لمستخلصات النوعين احتوائه على أحماض كربوكسيلية، تربينات، استرات ومركبات كحولية.

أشار Castillo-Reyes *et al*., (2015) إلى فعالية المستخلصين المائي والإيتانولي لساق نبات الصبار (*Opuntia ficus-indica*) تجاه فطر *Phytophthora cinnamomi* ،وتراوح التركيز المثبط الأدنى (MIC) بين (6.96- 8.6) ملغ/مل.

كما بيِّن Kumaar *et al*., (2013) فعالية المستخلص الميتانولي لثمار نبات الصبار (*Opuntia Dillenii*) تجاه الفطر *A.niger*، وأظهر المستخلص الميتانولي فعالية تثبيطية عالية ازدادت بزيادة التركيز وكانت مماثلة لفعالية الصاد المدروس (Amphotericin B).

أهمية البحث وأهدافه:

أدى الاستخدام الواسع للصادات الحيوية ومنها الصادات الفطرية إلى ظهور سلالات مقاومة ذات سمية عالية للإنسان والحيوان، وأصبح من الصعب السيطرة عليها، لذلك اتجهت الدراسات الحالية للبحث عن مركبات طبيعية بديلة آمنة وقليلة التكلفة، ونظراً لكون نبات الصبار منتشر في بيئتنا المحلية بوفرة، ولكونه من النباتات الطبية المستخدمة في الطب الشعبي لعلاج العديد من الأمراض أو الوقاية منها. لذا كان الهدف من البحث:

1- الحصول على مستخلصات مائية وكحولية من سوق، أزهار وثمار نبات الصبار. (*Opuntia ficus-indica*)

2 – الكشف النوعي عن بعض المركبات الكيميائية الفعالة في مستخلصات نبات الصبار.

3 – دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات في نمو فطر *A.niger*.

4 – مقارنة فعالية مستخلصات أجزاء نبات الصبار مع بعضها.

5 – مقارنة فعالية المستخلصات مع الصاد الحيوي (فلوكونازول).

طرائق البحث ومواده:

1- جمع العينات النباتية: تم جمع عينات نبات الصبار من مناطق ريفية عدة شرقي مدينة اللاذقية مع مراعاة الظروف المناخية والبيئية (حرارة معتدلة وتربة شبه جافة)، وخلال الأشهر التي تكون فيها المركبات الفعالة بأعلى تركيز لها، جُمعت عينات الساق خلال شهر نيسان 2017 (Marizel *et al*., 2015)، بينما جُمعت عينات الأزهار خلال شهر حزيران (Ammar *et al*., 2015)، في حين جُمعت عينات الثمار في تمام النضج خلال شهر آب من ذات العام (Rabhi *et al*., 2013).

أُحضرت العينات إلى المختبر، نُظفت جيداً من الأشواك والأتربة العالقة بها، غُسلت بالماء المقطر عدة مرات، قُطعت عينات الساق والثمار إلى شرائح باستخدام سكين حادة، تُركت الأجزاء النباتية لتجف في الظل عدة أيام، ثم وُضعت في فرن درجة حرارته 35^0C حتى ثبات الوزن، طُحنت الأجزاء النباتية بعد ذلك باستخدام الخلاط الكهربائي للحصول على مسحوق ناعم، تم حفظه في الثلاجة بعبوات زجاجية عاتمة ومحكمة الإغلاق لحين الاستخدام (Belay *et al*., 2015).

شكل (1): نبات الصبار *Opuntia ficus-indica*

2- تحضير المستخلصات:

2-1- المستخلص المائي: تم التحضير وفقاً لطريقة (Fabry *et al*., 1996;Tragoolpua, 1996) مع بعض التعديلات: أُخذ 20غ من المسحوق النباتي ووُضع في دورق مخروطي مُعقم، وأُضيف إليه 200 مل ماء مقطر معقم درجة حرارته 40^0C، غُطي الدورق بورق من الألمنيوم، وُضع في حمام مائي هزاز درجة حرارته 35^0C لمدة 30 دقيقة، ثم حُفظ في الظلام لمدة 24 ساعة، رُشِحَ المستخلص بوساطة ثلاث طبقات من الشاش المعقم لفصل العوالق الكبيرة، ثم رُشح بأوراق Whatman No.1 لفصل المادة النباتية عن السائل، ثم أُخذ المستخلص وبُخر بجهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40^0C للحصول على سائل كثيف، ثم جفف لاحقاً في فرن بدرجة حرارة 40^0C حتى ثبات الوزن، حُفظت الخلاصة المركزة في البراد عند درجة حرارة 4^0C ضمن عبوات زجاجية عاتمة لحين الاستخدام.

2-2- المستخلص الكحولي: تم التحضير وفقاً لطريقة (Gnanakalai and Gopal, 2016) مع بعض التعديلات: أُخذ 20غ من المسحوق النباتي ووُضع في دورق مخروطي معقم، وأُضيف إليه 200 مل من كل من المذيبات (إيتانول، ميتانول) بتركيز 95% كلٌّ على حده، غُطي الدورق بورق من الألمنيوم، ثم وضع على هزاز مغناطيسي لمدة نصف ساعة، حُفظ في الظلام لمدة أسبوع، مع التحريك من حين لآخر، رُشِحَ بأوراق Whatman No.1 لفصل المادة النباتية عن السائل، أُخذ المستخلص وبُخر بجهاز المبخر الدوار عند درجة حرارة 40^0C للحصول على سائل كثيف، ثم جفف لاحقاً في فرن بدرجة حرارة 40^0C حتى ثبات الوزن، حُفظت الخلاصة المركزة في البراد عند درجة حرارة 4^0C ضمن عبوات زجاجية عاتمة لحين الاستخدام.

3- الكشوفات النوعية الأولية عن بعض المركبات الكيميائية الفعالة:

أُجريت كشوفات نوعية أولية عدة عن المركبات الكيميائية الأساسية (المركبات الفينولية، الفلافونوئيدات، الغليكوزيدات الستيروئيدية، القلويدات، السابونينات) في المستخلصات المائية والكحولية للأجزاء النباتية، وذلك باستخدام كواشف مختلفة وفقاً للطرائق الموصوفة من قبل (Prashant *et al*., 2011; Kanoun, 2011; Obasi *et al*., 2010; Roopashree *et al*., 2008; Audu *et al*., 2007).

❖ الكشف عن المركبات الفينولية: تمت إضافة (2-3) قطرات من محلول كلوريد الحديد 1% إلى 2 مل من كل مستخلص بتركيز 1%، مما أدى إلى ظهور لون بنفسجي غامق يشير إلى وجود المركبات الفينولية.

❖ الكشف عن الفلافونوئيدات: تم مزج 2 مل من كل مستخلص مع 1 مل من هيدروكسيد الصوديوم (0.5M)، مما أدى إلى ظهور لون أصفر يشير إلى وجود الفلافونوئيدات.

❖ الكشف عن الغليكوزيدات الستيروئيدية (اختبار Libermann Buchard): تم حل 1 مل من كل مستخلص بكميات متساوية من حمض الخل اللامائي والكلوروفورم، ثم بُرد المزيج إلى الدرجة 0^0C، تم بعدها نقل المزيج إلى أنبوب اختبار جاف، ثم أُضيف إليه حمض الكبريت المركز ببطء على جدار الأنبوب، وأُعتبر ظهور لون بني محمر دليل على وجود الغليكوزيدات الستيروئيدية.

❖ الكشف عن القلويدات: تمت إضافة عدة قطرات من كاشف Wagner (يود البوتاسيوم اليودي) إلى 1 مل من كل مستخلص، مما أدى إلى ظهور راسب بني يشير إلى وجود القلويدات.

❖ الكشف عن السابونينات: تم رج 0.5 غ من كل مستخلص مع 2 مل ماء مقطر، مما أدى إلى ظهور رغوة كثيفة، وأُعتبر استمرار ظهور الرغوة لمدة 15 دقيقة دليل واضح على وجود السابونينات.

4- عزل فطر *A.niger*:

تم الحصول على عزلة واحدة من فطر *A.niger* من مستشفى تشرين الجامعي في اللاذقية، حيث أُخذت العينة الممرضة وزرعت على مستنبت Sabouraud Dextrose Agar (SDA) وحُضنت عند درجة حرارة 30^0C لمدة أسبوع، تم بعدها عزل وتنقية الفطر المراد دراسته، وحدد وفـق المفاتيح التصنيفيـة التالية: (Diba *et al*., 2007; McClenny, 2005; Domsch *et al*., 1980) ، ثمّ حُفظ في الثلاجة عند الدرجة 4^0C في أنابيب تحتوي على مستنبت (SDA)، لحين إجراء الدراسات اللاحقة عليه.

5- اختبار الفعالية المضادة للفطريات:

أُختبرت فعالية المستخلصات المائية والكحولية للأجزاء النباتية والمحلول المائي للفلوكونازول في تثبيط نمو فطر *A.niger* بطريقة الغذاء المسمم The Poison Food method (Suarez- Jimenez *et al*., 2007) مع بعض التعديلات المناسبة للبحث، حُضرت تراكيز المستخلصات الآتية (125، 250، 500، 1000) ملغ/مل بينما حُضر محلول الفلوكونازول بتركيز 10 مكغ/مل وفقاً ل (Belay *et al*., 2015)، تم تحضير التراكيز باستخدام المعادلة: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$، حيث أن:

C_1: تركيز المحلول الأم قبل التمديد (ملغ/مل)، V_1: حجم المحلول الأم قبل التمديد (مل).

C_2: تركيز المحلول بعد التمديد (ملغ/مل)، V_2: حجم المحلول بعد التمديد (مل).

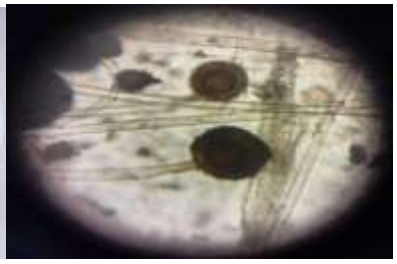
تم بعدها إضافة (1) مل من كل تركيز من التراكيز المذكورة إلى 10 مل من مستنبت الـ (SDA) وحُرّك جيداً، ثمّ صُب في أطباق بتري بلاستيكية قطرها 9 Cm، تُركت لتتصلب عند درجة حرارة المخبر، أُخذ بعد ذلك قرص بقطر (5) مم من أطراف مستعمرة الفطر المدروس بعمر أسبوع بوساطة إبرة معقمة، وُضعت في منتصف كل طبق، أما الأطباق الشاهدة فتمت باستنبات الفطر على مستنبت (SDA) خالٍ من المستخلص، حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 ± 2^0C لمدة (7) أيام (Belay *et al*., 2015).

تمّت التجربة بإجراء ثلاثة مكررات لكل مستخلص ولكل تركيز على حده وللأطباق الشاهدة أيضاً، تم بعدها قياس قطر المستعمرة النامية في منتصف كل طبق، ثم حُسب متوسط أقطار نمو المستعمرات الفطرية للمكررات الثلاثة، ومن ثمّ النسب المئوية للتثبيط في كل معاملة وفق المعادلة الآتية (Yigit and Korukluoglu, 2007):

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد} - \text{متوسط قطر مستعمرة المعاملة}}{\text{متوسط قطر مستعمرة الشاهد}} \times 100$$

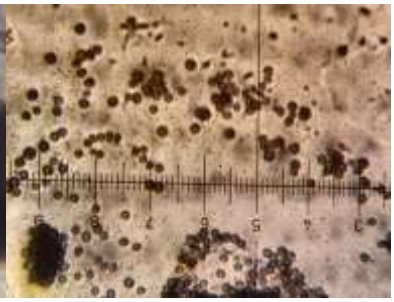
النتائج والمناقشة:

يبين الشكل (2) مستعمرة فطر *A.niger* نامية على مستنبت(SDA) بعد 7 أيام من الحضن عند درجة حرارة 30^0C، حيث ظهرت المستعمرة منتشرة على كامل الطبق سوداء داكنة اللون من الناحية العلوية وذات لون أبيض باهت من الناحية السفلية، أما مجهرياً فقد ظهر الحامل الكونيدي في نهايته انتفاخ، مُتوضع عليه صف أو صفين من الخلايا، والتي تحمل بدورها خلايا قارورية الشكل تسمى بالخلايا المولدة للأبواغ (Phialides) (الشكل3)، وبلغت ثخانة الحامل الكونيدي (5–7.4) ميكرون (الشكل4)، وهذا يتفق مع نتائج (McClenny, 2005)، والتي أظهرت بأن ثخانة الحامل البوغي لفطر *A.niger* يمكن أن تتراوح بين (2.5–8) ميكرون، أما الأبواغ فقد ظهرت بشكل دائري وحيدة الخلية، سوداء اللون وذات سطح خشن غير منتظم، تراوحت أبعادها بين (2–3) ميكرون (الشكل5)، وهذا يتفق مع نتائج (Diba *et al*., 2007; Domsch *et al*., 1980).



شكل (2): مستعمرة فطر *A.niger* نامية على مستنبت (SDA) بعمر 7 أيام

شكل (3): البنية المجهرية لفطر *A.niger* (تكبير 40x10)



شكل (4): الحامل البوغي لفطر *A.niger* (تكبير 40x10)

شكل (5): الأبواغ الكونيدية عند فطر *A.niger* (تكبير 40x10)

يُظهر الجدول (1) التصنيف العلمي لفطر *A.niger* (Geiser, 2009):

مملكة	الفطريات
شعبة	*Ascomycota*
صف	*Eurotiomycetes*
رتبة	*Eurotiales*
فصيلة	*Trichocomaceae = Eurotiaceae*
جنس	*Aspergillus*
نوع	*Aspergillus niger*

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (2) احتواء المستخلصات المائية، الإيتانولية لكل من سوق، أزهار وثمار نبات الصبار على (الفينولات، الفلافونوئيدات، الغليكوزيدات ستيروئيدية، القلويدات، السابونينات)، بينما احتوت المستخلصات الميتانولية للأجزاء النباتية على جميع المركبات السابقة باستثناء مستخلصي السوق والثمار، إذ أظهرا وجود جميع تلك المركبات ما عدا الغليكوزيدات الستيروئيدية، وقد لُوحظ ارتفاع نسب بعض المركبات في الكحول (إيتانول، ميتانول) مقارنةً بالماء، وهذا يتفق مع معظم الدراسات التي تناولت نبات الصبار (Wasnik and Tumane, 2016; Belay *et al.*, 2015)، والتي أظهرت احتواء المستخلصات المائية والكحولية (الإيتانولية، الميتانولية) لساق نبات الصبار على تلك المركبات بنسب متفاوتة.

جدول (2): الكشوفات النوعية الأولية عن بعض المركبات الكيميائية الفعالة في مستخلصات نبات الصبار

الجزء النباتي	المذيب	المركبات الفينولية	الفلافونوئيدات	الغليكوزيدات الستيروئيدية	القلويدات	السابونينات
ساق	ماء	+	+	+	+	++
	إيتانول	++	++	++	++	++
	ميتانول	++	++	−	++	++
أزهار	ماء	+	+	+	+	++
	إيتانول	++	++	++	++	++
	ميتانول	++	++	+	++	++
ثمار	ماء	+	+	+	+	+
	إيتانول	++	++	++	++	+
	ميتانول	++	++	−	++	+

تشير: (−) إلى غياب المركب الفعال، (+) إلى وجود المركب الفعال، (++) إلى وجود المركب الفعال بوفرة.

تبين النتائج الواردة في الجداول (3، 4، 5) أن المستخلصات المائية، الإيتانولية والميتانولية لنبات الصبار (*Opuntia ficus-indica*) ثبطت نمو الفطر *A.niger* بنسب مختلفة، تبعاً للمذيب وتركيز المستخلص والجزء المستخدم من النبات.

أظهر الجدول (3) التأثير الفعال للمستخلص المائي للأجزاء المدروسة، وكان مستخلص الأزهار هو الأكثر فعالية مقارنةً بمستخلصي الساق والثمار، إذ بلغت نسبة التثبيط 54.81 % عند التركيز 250 ملغ/مل، ويعود ذلك إلى قدرة الماء على استخلاص مجموعة من المركبات الطيارة إضافةً إلى المركبات القطبية (Hajji *et al.*, 2010)، في حين بلغت نسب تثبيط مستخلصي الساق والثمار عند التركيز السابق (36.14، 28.91) % على التتالي، وقد يُعزى انخفاض فعالية المستخلص المائي للثمار إلى وجود مركبات (فينولية، ستيرولية) يمكن أن تلعب دور منشطات نمو إذا وجدت بنسب معينة، وذلك تبعاً لنوع الفطر (Bajwa *et al*., 2004; Furies, 1973)، بينما بلغت نسبة تثبيط المحلول المائي للفلوكونازول عند التركيز المستخدم 65.66%.

جدول (3): متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم) والنسب المئوية لتثبيط نمو فطر *A.niger* بوجود تراكيز مختلفة من المستخلص المائي (ملغ/مل) والفلوكونازول بتركيز 10 مكغ/مل

نبات الصبار	الشاهد		الفلوكونازول		125 ملغ/مل		250 ملغ/مل		500 ملغ/مل		1000 ملغ/مل		LSD
	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
الساق	8.3a	0	2.85j	65.66	6.1d	26.50	5.3f	36.14	6.96bc	16.14	7.26b	12.53	6.40
الأزهار	8.3a	0	2.85j	65.66	4.25h	48.79	3.75i	54.81	4.63g	44.21	5.25f	36.74	4.47
الثمار	8.3a	0	2.85j	65.66	6.05d	27.10	5.9de	28.91	6.15d	25.90	6.35d	23.49	6.11

* الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%، LSD محسوبة لكل مستخلص.

أما بالنسبة للمستخلصات الإيتانولية الموضحة في الجدول (4) فقد أظهر مستخلص الأزهار الفعالية الأعلى عند التركيز 1000 ملغ/مل، إذ بلغت نسبة تثبيط 57.83 %، ويعود هذا إلى غنى الأزهار بالأحماض الدهنية غير المشبعة والتربينات (Ennouri *et al*., 2014; Ammar *et al*., 2012)، تلاه مستخلصا الساق والثمار بنسب تثبيط بلغت (51.20، 47.59)% على التوالي عند التركيز ذاته، وقد يُعزى انخفاض فعالية مستخلص الثمار إلى كون الثمار المجموعة عالية النضج ذات محتوى فينولي عالي يمكن أن يلعب دور منشط لنمو الفطر، وهذا يتفق مع نتائج (Rabhi *et al*., 2013) إذ أظهرت الثمار الناضجة الحمراء اللون أعلى محتوى فينولي وأقل فعالية مثبطة لعدد من الكائنات الحية الدقيقة مقارنةً مع الثمار الخضراء والصفراء اللون.

جدول (4): متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم) والنسب المئوية لتثبيط نمو فطر *A.niger* بوجود تراكيز مختلفة من المستخلص الإيتانولي (ملغ/مل) والفلوكونازول بتركيز 10 مكغ/مل

نبات الصبار	الشاهد		الفلوكونازول		125 ملغ/مل		250 ملغ/مل		500 ملغ/مل		1000 ملغ/مل		LSD
	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
الساق	8.3a	0	2.85i	65.66	6.22c	25.06	5.4de	34.93	5.2e	37.34	4.05g	51.20	5.21
الأزهار	8.3a	0	2.85i	65.66	5.53d	33.37	5.24e	36.86	4.9ef	40.96	3.5h	57.83	4.79
الثمار	8.3a	0	2.85i	65.66	7.05b	15.06	5.65d	31.92	4.72f	43.13	4.35g	47.59	4.69

* الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%، LSD محسوبة لكل مستخلص.

يبين الجدول (5)، أن المستخلص الميتانولي للأزهار كان الأكثر فعالية عند التركيز 1000 ملغ/مل بنسبة تثبيط 81.32 %، وقد يعود هذا إلى وجود عديدات الفينول (Bergaoui *et al*., 2007)، تلاه مستخلصا الساق والثمار بنسب تثبيط بلغت (76.14، 56.62)% على التتالي عند التركيز ذاته، وبشكل عام تعود فعالية المستخلص الميتانولي إلى قدرته على إذابة مركبات عضوية ذات فعالية مضادة للأحياء الدقيقة، وهذا يتفق مع نتائج (Gnanakalai and Gopal, 2016; Wasnik and Tumane, 2016).

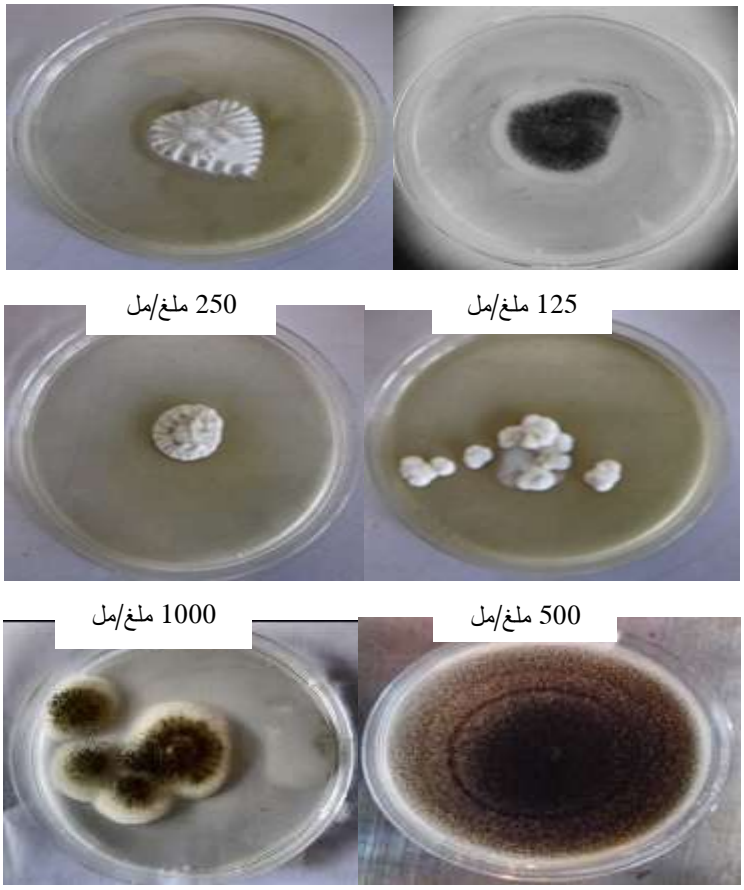
جدول (5): متوسط أقطار المستعمرات الفطرية (سم) والنسب المئوية لتثبيط نمو فطر *A.niger* بوجود تراكيز مختلفة من المستخلص الميتانولي (ملغ/مل) والفلوكونازول بتركيز 10 مكغ/مل

نبات الصبار	الشاهد		الفلوكونازول		125 ملغ/مل		250 ملغ/مل		500 ملغ/مل		1000 ملغ/مل		LSD
	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	القطر	%	
الساق	8.3a	0	2.85fg	65.66	3.25f	60.84	3.09f	62.77	2.2h	73.49	1.98hi	76.14	2.63
الأزهار	8.3a	0	2.85fg	65.66	7.15b	13.85	3.3f	60.24	1.92hi	76.86	1.55i	81.32	3.48
الثمار	8.3a	0	2.85fg	65.66	7.4b	10.84	5.66c	31.80	5.1d	38.55	3.6e	56.62	5.44

* الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية عند مستوى دلالة 5%، LSD محسوبة لكل مستخلص.

كما تبين النتائج في الجداول (3، 4، 5) أن مستخلص الميتانول للأجزاء المدروسة كان الأكثر تأثيراً في *A.niger* تلاه مستخلص الإيتانول، وقد ازدادت الفعالية بازدياد التركيز، وهذا يتفق مع نتائج (Wasnik and Tumane, 2016; Kumaar *et al*., 2013)، أما بالنسبة للمستخلص المائي كان الأقل تأثيراً، واقتصرت فعاليته عند التركيزين (125، 250) ملغ/مل، وقد يعود هذا إلى وجود مركبات ذات أوزان جزيئية منخفضة يمكن أن تلعب دور تثبيطي عالي، وهذا يتفق مع نتائج (محمد، 2012؛ Ekwenye and Elegalam, 2005)، على عكس التركيزين (500، 1000) ملغ/مل فقد أظهرا زيادة في معدل نمو الفطر، وهذا يعود إلى التداخل بين المواد المُستخلصة، والذي يمكن أن يؤثر في فعالية المادة التي يُعزى لها التأثير التثبيطي، وهذا يتفق مع نتائج (نعمة ومحمد، 2011؛ Al-Abed *et al*., 1993).

لوحظ عند مقارنة فعالية مستخلصات الأجزاء النباتية مع الصاد المدروس، تفوق المستخلص الميتانولي للأزهار في الفعالية على الفلوكونازول عند التراكيز (500، 1000) ملغ/مل بنسبة (14.57، 19.25) % على التتالي، بينما تفوق المستخلص الميتانولي للساق على الفلوكونازول بنسبة (10.65، 13.76) % عند ذات التركيزين السابقين، وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أظهرت تفوق المستخلص الميتانولي لبعض الأشن (Evernia prunastri, and Pseudevernia furfuracea var) في الفعالية المثبطة لبعض الفطريات من بينها فطر *A.niger* على عدد من الصادات الحيوية (Karabulut *et al*., 2015; Stojanović *et al*., 2013).



شكل(6): مستعمرات فطر *A.niger* معاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص الميتانولي لساق نبات الصبار مقارنةً بالشاهد والفلوكونازول بعد حضن 7 أيام

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات :

1 – اختلفت فعالية المستخلصات تبعاً للجزء النباتي المدروس والمذيب المستخدم في الاستخلاص من جهة، وتركيز المستخلص من جهة أخرى.

2 – أظهرت الكشوفات النوعية الأولية وجود أنواع عدة من المركبات الكيميائية الفعالة في المستخلصات المدروسة.

3 – أبدى المستخلص الميتانولي للأزهار الفعالية التثبيطية الأعلى مقارنةً بالمستخلصات الأخرى والفلوكونازول، وبلغت نسبة التثبيط 81.32 % عند التركيز 1000 ملغ/مل.

4 – لوحظ تنشيط لنمو الفطر عند التراكيز (500، 1000) ملغ/مل للمستخلصات المائية للساق، الأزهار والثمار.

التوصيات :

1 – اختبار الفعالية التثبيطية تجاه فطريات ممرضة أخرى.

2 – دراسة تأثير مستخلصات محضرة باستخدام مذيبات أخرى كالاسيتون والكلوروفورم.

3 – عزل وتحديد المركبات الفعالة الموجودة فيها كمياً.

المراجع :

1- محمد، صبرية عبد علي. *الفعالية التثبيطية لمستخلصات الزنجبيل Ginger* (*Zingiber officinale Rosc.*) تجاه بعض الفطريات. مجلة أبحاث البصرة (العلميات)، المجلد 2، العدد 38، 2012، 98-108.

2- نعمة، عقيل عبد؛ محمد بان طه. *تأثير المستخلصات المائية والكحولية للكركم والزعتر والهيل في نمو* الفطر *Aspergillus flavus وكفاءة إنتاجه لسم الأفلاتوكسين B1 و B2*. مجلة جامعة كربلاء العلمية، المجلد 9، العدد 4، 2011، 119-130.

3- AL-ABED, A.S.; QASEM, J.R. AND ABU-BLAN, H.A. *Antifungal effects of some common wild plant species on certain plant pathogenic fungi*. Dirasat (Pure and Applied Science), Vol. 20, 1993, 149-158.

4-ALPSOY, L. *Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities*. Afr.J. Biotechl, Vol. 9, N. 17, 2010, 2474-2481.

5- AMMAR, I.; ENNOURI, M. AND ATTIA, H. *Phenolic content and antioxidant activity of cactus (Opuntia ficus-indica L.) flowers are modified according to the extraction method*. Industrial Crops and Products, Vol. 64, 2015, 97-104.

6- AMMAR, I.; ENNOURI, M.; KHEMAKHEM, B.; YANGUI, T. AND ATTIA, H. *Variation in chemical composition and biological activities of two species of Opuntia flowers at four stages of flowering*. Industrial Crops and Products, Vol. 37, N. 1, 2012, 34-40.

7- ARAIZA, J.; BONIFAZ, A. AND CANSECO,P. *Otomycosis clinical and mycological study of 97 cases*. Rev Laryngol Otol Rhinol (Bord), Vol. 127, 2006, 251-254.

8- AUDU, S.A.; MOHAMMED, I. AND KAITA, H.A. *Phytochemical screening of the leaves of Lophira lanceolata (Ochanaceae).* Life Science Journal, Vol. 4, N. 4, 2007, 75-79.

9- BAJWA, R.; SHAFIQUE, S.; ANJUM, T. AND SHAFIQUE,S. *Antifungal activity Of Allelopathic Plant Extracts IV: Growth Response Of Drechslera Hawaiiensis,Alternaria Alternata And Fusarium Monilifrome To Aqueous Extract Of Parthenium Hysterophorus*. International Journal Of Agriculture And Biology, Vol. 6, N. 3, 2004, 511-516.

10- BELAY, K.; ABISA, Z.; ABRAHA, T.; MEBRAT,W. AND BEDASSA,S. *Phys-ico Chemical Properties, Phyto-chemical Screening, Antimicrobial Activities and Nutritional Values of Cactus (Opuntia ficus-indica) Around Adigrat*. International Journal of Informative and Futuristic Research, Vol. 3, N. 2, 2015, 1697-2347.

11- BERGAOUI, A.; BOUGHALLEB, N.; BEN, J.H.; HARZALLAH-SHIRIC, F.; EL MAHJOUB M. AND MIGHRI, Z. *Chemical composition and antifungal activity of volatiles from three Opuntia species growing in Tunisia*. Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol. 10, N. 15, 2007, 2485-2489.

12- BLANKENSHIP JR. AND MITCHELL, AP. *How to build a biofilm: a fungal perspective*. Curr Opin Microbiol, Vol. 9, 2006, 588-594.

13- BROWN, G.D.; DENNING, D.W.; GOW, N.A.R.; LEVITZ, S.M.; NETEA, M.G. AND WHITE, T.C.. *Hidden Killers: human fungal infections*. Sci. Transl. Med. Vol. 4, N.13, 2012, 1-9.

14- CASTILLO-REYES, F.; HERNANDEZ-CASTILLO, FD.; CLEMENTE-CONSTANTINO, JA.; GALLEGOS- MORALES, G.; RODRIGUEZ-HERRERA, RU. AND AGUILAR, C. *In vitro antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against Phytophthora cinnamomi Rands*. African Journal of Agricultural Research, Vol. 10, N. 50, 2015, 4554-4560.

15- DE BOER, H.J.; KOOL, A.; BROBERG, W.R.; MZIRAY, I.; HEDBERG. AND LEVENFORS, J.J. *Antifungal activity of some herbal remedies from Tanzanias.J. Ethnopharmacol*, Vol. 96, 2005, 461-469.

16- DIBA, K.; KORDBACHEH, P.; MIRHENDI, SH.; REZAIE, S. AND MAHMOUDI, M. *Identification of aspergillus species using morphological characteristics*. Pak. J. Med. Sci, Vol. 23, N. 6, 2007, 867-872.

17- DOMSCH, K.A; GAMS, W. AND ANDERSON, T.H. *Compendium of Soil Fungi*. Academic Press, London, Vol. 1, 1980, 859.

18-EKWWNYE, UN. AND ELEGALAM, NN. *Antibacterial activity of ginger (Zingiber officinale Roscoe) and garlic (Allium sativum L.) extracts onEscherichia coli and Salmonella typhi.* Journal of Molecular Medicine and Advanced Science, Vol. 1, N. 4, 2005, 411-416.

19- ENNOURI, M.; AMMAR, I.; KHEMAKHEM, B. AND ATTIA,H. *Chemical composition and antibacterial activity of Opuntia ficus-indica F. inermis (cactus pear) flowers.* Journal of Medicinal Food, Vol. 17, N. 8, 2014, 908-914.

20- FABRY, W.;OKEMO, P. AND ANSORG,R. *Fungistatic and fungicidal activity of East African medicinal plants*. Mycoses, Vol. 39,1996, 67-70.

21- FURIES, N. *Effect Of Volatile Organic Compounds On The Growth And Development Of Fungi*. Trans brit. Mycol. Soc, Vol. 60, 1973, 1-21.

22- GEISER, D. *Sexual structures in Aspergillus: morphology, importance and genomics*. Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology. Vol. 47, N. 1, 2009, 21-26.

23- GNANAKALAI, K. AND GOPAL,R. *IN VITRO ANTIBACTERIAL ACTIVITIES OF OPUNTIA FICUS INDICA STEM AND FRUIT EXTRACTS USING DISC DIFFUSION METHOD*. International Journal of Current Pharmaceutical Research, Vol. 8, N. 2, 2016, 68-69.

24-HAJJI, M.; MASMOUDI, O.; SOUISSI, N.; TRIKI, Y.; KAMMOUN, S. AND NASRI, M. *Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme(ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from Periploca laevigata root barks*. Food Chemistry, Vol. 121, N. 3, 2010, 724-731.

25- HOHL, T.M. AND FELDMESSER,M. *Aspergillus fumigatus: Principles of Pathogenesis and Host Defense. Eukaryotic Cell*, Vol. 6, 2007, 1953-63.

26- KAMBA, A.S. AND HASSAN, L.G. *Phytochemical screening and antimicrobial activities of Euphorbia balsamifera leaves, stems and root against some pathogenic microorganisms*. African Journal of pharmacy and pharmacology, Vol. 4, N. 9, 2010, 645-652.

27- KANOUN, K. *Contribution à l'étude phytochimique et activité antioxydante des extraits de Myrtus communis L. (Rayhane) de la région de Tlemcen (Honaine). Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de Magister*. Universite Aboubekr Belkaid Tlemcen, 2011, 118.

28- KARABULUT, G . AND OZTURK, S. Antifungal activity of Evernia prunastri, Parmelia sulcata, Pseudevernia furfuracea var. Furfuracea. Pak. J. Bot, Vol. 47, N. 4, 2015, 1575-1579.

29- KULETA, J.K.; KOZIK, M.R. AND KOZIK, A. *Fungi pathogenic to humans: molecular basis of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol, Vol. 56, 2009, 211–224.
30 - KUMAAR, AS.; VANITHA, J.; VENKATESHWARAN, K.; REDDY, KS. AND KARTHIKEYAN, D. *Antibacterial and antifungal activity of Opuntia dillenii(Cactaceae) fruit extract.* Journal of Environmental Nanotechnology. Vol. 2, N. 1, 2013, 16-19.
31- LIN, S.J.; SCHRANZ, J. AND TEUTSCH, S.M. *Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature*. Clinical Infectious Diseases, Vol. 32, 2001, 358-66.
32- MANISHA, K. AND PANWAR, N. *Morpho-Pathological Effects Of Isolated Fungal Species On Human Population*. Open Access Scientific Reports, Vol. 1, N. 11, 2012, 1-6.
33- MARIZEL, G.; GARCIA, A.; CERVANTES, I.; NAIR, V.; DEL SOCORRO SANTOS-DIAZ, M.; REYES-AGU ERO, A.; GUERAUD, F.; NEGRE-SALVAYRE, A.; ROSSIGNOL, M.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. AND BARBA DE LA ROSA, A.P. *Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from Opuntia spp. cultivars with different domestication gradient*. Journal of Food Composition and Analysis, 2015, 1-12.
34- MCCLENNY, N. *Laboratory detection and identification of aspergillus species by microscopic observation and culture: the traditional approach*. J. Med. & Vet. Mycol, Vol. 1, N. 43, 2005, 125-128.
35- OBASI, N.L.; EGBUONU, A.C.C.; UKOHA, P.O. AND EJIKEME,P.M. *Comparative phytochemical and antimicrobial screening of some solvent extracts of Samanea saman pods*. African journal of pure and applied chemistry, Vol. 4, N. 9, 2010, 206-212.
36- OLIVEIRA, M. AND CARAMALHO, R. *Aspergillus fumigatus: a mere bioaerosol or a powerful biohazard? Nova Acta Científica Compostelana (Bioloxía)*, Vol. 21, 2014, 57-64.
37- PRASHANT, T.; Kumar, B.; Kaur, M.; Kaur, G. AND Kaur, H. *Phytochemical screening and Extraction: A Review*, Internationale Pharmaceutica Science, Vol. 1, N. 1, 2011, 98-106.
38- PRIGITANO, A.; CARMELA ESPOSTO, M.; BIFFI, A.; DE LORENZIS, G.; FAVUZZI, V.; KONCAN, R.; LO CASCIO, G.; BARAO OCAMPO, M.; COLOMBO, C.; PIZZAMIGLIO, G.; ROMANO, L. AND MARIA TORTORANO,A. *Triazole resistance in Aspergillus fumigatus isolates from patients with cystic fibrosis in Italy*. Journal of Cystic Fibrosis, 2016, 1-6.
39- RABHI, A.; FALLEH, H.; LIMAM, F.; KSOURI, R.; ABDELLY, C. AND RAIES, A. *Upshot of the ripening time on biological activities, phenol content and fatty acid composition of Tunisian Opuntia ficus-indica fruit*. African Journal of Biotechnology, Vol. 12, N. 40, 2013, 5875-5885.
40- RAPPLEYE, C.A. AND GOLDMAN, W.E. *Defining virulence genes in the dimorphic fungi*. Annu Rev Microbiol, Vol. 60, 2006, 281–303.
41- REVERBERI, M.; RICELLI, A.; ZJALIC, S.; FABBRI, A. AND FANELLI, C. *Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi*. Applied Microbiology and Biotechnology, Vol. 87, 2010, 899-911.
42- ROOPASHREE, T.S; DANG, R.; RANI, S.R.H. AND NARENDRA, C. *Antibacterial activity of anti-psoriatic herbs: Cassia tora, Momordica charantia and Calendula officinalis*. International Journal of Applied Research in Natural Products, Vol. 1, N. 3, 2008, 20-28.

43- SARDI, J.C.; ALMEIDA, A.M. AND MENDES GIANNINI,M.J. *New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review*. Arch Oral Biol, Vol. 156, 2011, 951–959.
44- STENSVOLD, C.R.; JORGENSEN, L.N. AND ARENDRUP,M.C. *Azole-resistant invasive aspergillosis: relationship to agriculture*. Curr Fungal Infect Rep, Vol. 6, 2012, 178–91.
45-STOJANOVIĆ, I.; RADULOVIĆ, N.; CVETKOVIĆ, V.; MITROVIĆ3, T. AND SLAVIŠA, S. *Antimicrobial activity of methanol extracts of four parmeliaceae lichen species*. Physics, Chemistry and Technology, Vol. 11, N. 1, 2013, 45 – 53.
46- SUÁREZ-JIMÉNEZ, G.; CORTEZ-ROCHA, M.; ROSAS-BURGOS, C.; BURGOSHERNÁNDEZ, A.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. AND CINCO-MOROYOQUI,F. *Antifungal Activity of Plant Methanolic Extracts Against Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenb. And Fumonisin B1 Production*, Vol. 25, N. 2, 2007, 134-142.
47- TOURE, A.; BAHI, C.; OUATTARA, K.; DJAMA, J.A. AND COULIBALY, A. *Phytochemical screening and in vitro antifungal activities of extracts of leaves of Morinda morindoides (Morinda, Rubiaceae)*. Journal of Medicinal Plants Research, Vol. 5, N. 31, 2011, 6780-6786.
48- TRAGOOLPUA, K. *Effect of the extract from eight species of medicinal plants on growth of selected plant pathogenic molds and dermatophytes. M.Sc. thesis*.
Department of Biology, Faculty of Sciences, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand, 1996.
49- WASNIK, D. AND TUMANE, P.M. *In Vitro Antibacterial Activity Of Opuntia Ficus-Indica L. (Prickly Pear) Against Multiple Drug Resistant (MDR) Bacteria Isolated From Clinical Samples*. World Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, Vol.5 , N. 3, 2016, 996-1006.
50- WILLEY, J.M.; SHERWOOD, L.M. AND WOOLVERTON, C.J. *Prescott, Harley and Klein's microbiology, 7th edn. McGraw Hill, Singapore*, 2008.
51- YIGIT, A. AND KORUKLUOGLU, M. *The effect of potassium sorbate , NaCl and PH on the growth of food spoilage fungi*. Annals Microbiol., Vol. 57, N. 2, 2007, 209-215.