Evaluating the efficiency of sodium bicarbonate and ascorbic acid in protecting apple fruit from injury isolated fungus *Aspergillus niger* producing ochratoxin under normal storage conditions

تقييم كفاءة مادتي بيكاربونات الصوديوم وحامض الاسكوربيك في حماية ثمرة التفاح من الاصابة بعزلة الفطر *Aspergillus niger* المنتجة لسم الاوكراتوكسين تحت ظروف الخزن الطبيعية

د. هدى عبد الرضا عبد الله
جامعة كربلاء –كلية العلوم الطبية التطبيقية

الخلاصة

بينت نتائج الدراسة الحالية فعالية محلول بيكاربونات الصوديوم في حماية ثمار التفاح المجرحة والسليمة بصورة تامة اذ بلغت نسبة الأصابة وشدتها صفراً ، اما محلول حامض الاسكوربيك فلم يوفر حماية للثمار اذ بلغت نسبة الاصابة 100% وشدة الاصابة 25% .

Abstract

This study included evaluation of the efficiency of the subjects a solution sodium bicarbonate concentration of 0.05 mg and ascorbic acid concentration of 0.5 ml in protecting the apples fruits from infected by *Aspergillus. niger* producing ochratoxin A, where the study included the treatment two groups of apples (stricken and right) by sodium bicarbonate and ascorbic acid with treatment vaccine *A. niger* under study, this study was conducted in the form of experience Stockpile for ten days under normal laboratory conditions, and the results showed the effectiveness of sodium bicarbonate solution in protecting the apples (stricken and right) fully as the prevalence and severity of zero, while the acid solution of ascorbic did not provide Protection of the fruits as the percentage of 100% incidence and severity of injury 25%

المقدمة

تتعرض ثمار التفاح للإصابة بالعديد من الآفات المختلفة أثناء جنيها وخزنها وتسويقها، منها التعفن البني والتعفن الأبيض والأزرق وغيرها مما تسبب في خفض قيمتها التسويقية، وقد سجلت العديد من الفطريات المسببة لهذه التعفنات منها *Alternaria alternate* , *Diplodia* spp. , *Fusarium* spp , *Penicillium* spp. , *Aspergillus* spp.) [1]. للحد من إصابة ثمار التفاح بالفطريات استخدمت عدة وسائل منها خزن الثمار في غرف مبردة وذلك لتأخير تكوين الاثيلين لأنه يعمل على نضج الثمار بسرعة او معاملة الثمار بها يبوكلورات الصوديوم وأيضا يمكن حفظه بتراكيز عالية من ثنائي اوكسيد الكربون، إضافة إلى استعمال طرائق حياتية كالبكتريا [2] .

يعتبر الفطر *Aspergillus niger* احد أنواع الرشاشيات وأكثرها انتشارا ويحدث أمراضا للفواكه والخضروات تدعى بالعفن الأسود، ينتشر هذا الفطر بشكل واسع في التربة بالإضافة إلى تواجده داخل المنازل [3] . ويعد جنس *Aspergillus* وحدا من عشرات الانواع والتي تتميز بهايفات مقسمة تتفرع بزاوية 45 مْ وتنتج كونيدات (سبورات غير جنسية) وإن الأنواع الثلاثة المهمة في أمراضيتها للإنسان هي *A. fumigatus* , *A.niger*, *A. flavus* [4] .

تعد السموم الفطرية اهم المركبات الايضية الثانوية التي تنتجها الفطريات ، ويقتصر إنتاجها على أنواع قليلة من الفطريات او حتى ضمن السلالات العائدة لنفس النوع [5].والبعض الآخر يعرف السموم الفطرية على أنها مركبات ايضية ثانوية ذات أوزان جزيئية واطئة لها القابلية على إحداث تأثيرات صحية للإنسان والحيوان [6]. ومن اهم الامثلة على السموم الفطرية هو الاوكراتوكسين Ochratoxin A (OTA) ضمن مجموعة Pentaketide Mycotoxin ، ينتج من قبل فطريات *Aspergillus* و *Penicillium* في مختلف المنتجات النباتية التي تتخذها مصدرا لغذائها مثل الحبوب والقهوة والفاصوليا والكاكاو والمكسرات والبيرة والنبيذ والتوابل وثمار العنب (الزبيب والكشمش) [8 ;7] . هناك أنواع عديدة من الفطريات قادرة على إنتاج الاوكراتوكسين A والتابعة لجنس*Aspergillus* وأكثرها شيوعا *A. ochraceus* و *A. alliaceus* و *A. sclerotiorum* و *A. sulphureus* ، اما الأنواع التابعة لجنس *Penicillium* فاهمها *P. viridicatum* و *P. cyclopium* و *P. commune* و *P. palitans* و *P. purpurescens* [9] .

ووجد ان الاوكراتوكسين له عدة تأثيرات منها انه مسرطن وسام للكلى ومشوه للأجنة وله تأثيرات سامة وراثياً. [10] . يمتص هذا السم في القناة المعوية عند تناول الأغذية الملوثة به ويؤدي الى حدوث تغيرات مرضية واضحة في الكلية وكبح للجهاز المناعي وحتى السرطان وله القابلية على الارتباط بألبومين المصل ، وغالبا ما يفرز هذا السم في الحليب للإنسان والحيوان عند تناولهما الأغذية الملوثة به ، وان وجود هذا النوع من السم في حليب الأطفال الرضع يعد مشكلة صحية كبيرة لفتت انتباه الكثير من الباحثين لما هذا المركب من تأثيرات بالغة الأهمية خصوصا وان الجهاز المناعي لم يكتمل في هذه المرحلة من عمر الإنسان [11] . يؤثر السم في المناعة الخلطية وذلك بتخفيض إنتاج الأجسام المضادة[12] . وهناك إشارات حول علاقته بحدوث تورمات في الجهاز البولي للإنسان وحدوث سرطان الكلى[13] . فضلا عن تأثيراته السابقة يسبب أيضا تغيير الكروموسومات في الخلايا اللمفاوية للإنسان ويسبب كسر في احد شريطي DNA . [14] .

مركب بيكاربونات الصوديوم وصيغته Na_2HCO_3، ويدعى رماد الصودا او صودا الغسل، يكون تواجده بالشكل العادي على شكل بودرة بيضاء، محاليله في الماء قلوية. كما يمكن ان يتواجد بشكل طبيعي كمعدن او بشكل صناعي ويتم ذلك حاليا بطريقة سولفيه (solvay method)، يدخل في الكثير من الصناعات الغذائية ويستخدم أيضا في إنضاج العجين حيث يتحرر غاز ثنائي اوكسيد الكربون فينتفخ العجين كذلك دوره في الصناعات الدوائية كمادة مضادة للحموضة وللقضاء على حب الشباب وله العديد من التطبيقات الاخرى مثل الصابون ، المنظفات ، طفايات الحريق، وكمادة مضافة في علف الحيوانات [15] .

يعتبر حامض الاسكوربيك أو ما يسمى بفيتامين ج حمض مشتق من الجلوكوز في النباتات ومعظم الثدييات ما عدا الرئيسيات ومنها الإنسان نتيجة لعدم وجود إنزيم L-gulonolactone المطلوب لتصنيع الفيتامين ويتواجد بشكل مسحوق او بلورات بيضاء او صفراء قليلا تسود تدريجيا بالضوء ، تستخدم في مجالات طبية علاجية حيث يسبب نقصه في الجسم مرض الاسقربوط (نزف اللثة) ، أما صيدلانيا يستخدم كسواغ مضاد للاكسدة . [16] .

وبالنظر لقلة المخازن التي تتوفر فيها شروط الخزن الصحي في العراق ارتأينا تقييم كفاءة مادتي بيكاربونات الصوديوم وحامض الاسكوربيك كمواد مانعة لإصابة ثمار التفاح بالفطر *A. niger*

المواد وطرق العمل

تم الحصول على عزلة مشخصة من مختبر السموم الفطرية- قسم التحليلات المرضية / كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء، اخذ 50 غم من ثمار التفاح المصابة بالفطر *A.niger* (مجموعة السيطرة) وخلطها في الخلاط مع القليل من الماء المقطر المعقم بعدها تم ترشيح الخليط باستخدام قطع الشاش المعقم. اضيف الى الراشح 100 مل مذيب الكلوروفورم ورج الخليط في قمع الفصل لمدة 5 دقائق مع مراعاة فتح صمام القمع بين الحركات للتخلص من الغازات المتكونة وفصلت مادة الكلوروفورم الحاوية على الاوكراتوكسين المستخلص من الثمار المصابة وتركت في دورق نظيف لتجف لمدة 24 ساعة ثم ذوبت متبقيات الراشح بـ 2 مل كلوروفورم ، تم الكشف عن وجود الاوكراتوكسين باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة (TLC) ذات ابعاد (20×20) سم حيث نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة (120) م لمدة ساعة قبل الاستعمال واستخدم نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (98 : 2) [17] .

تم عمل خط مستقيم على صفيحة TLC يبعد بمسافة (1.5) سم من قاعدة الصفيحة. واخذ 15 مايكرو لتر بواسطة أنبوبة شعرية من السم القياسي ووضع على الخط بمسافة 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة وعلى مسافة 2 سم من البقعة الخاصة للقياس الأول حيث وضعت نفس الكمية من السم القياس وهكذا تم وضع نفس الكميات من كل عينة من عينات الفطريات المختبرة وعلى نفس المسافة المذكورة اعلاه (2 سم) بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول الى مسافة تقارب (2 سم) من النهاية العليا للصفيحة ، أخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي (360) نانوميتر وتم الكشف عن وجود الاوكراتوكسين مطابقة معامل الترحيل (RF) ولون التألق لمحتوى المستخلصات من الاوكراتوكسينات مع المادة القياسية [19 ; 18] .

حضر الوسط ألزرعي PDA حسب تعليمات الشركة المصنعة (Hi-Media / India) إذ تم اخذ 39 غم من الوسط وأذيب في 1 لتر ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقة ، استعمل لغرض تنشيط عزلة الفطر *A. niger*وأضيف إليه المضاد الحيوي كلورمفينيكول مقدار 50 ملغم / لتر ثم صب في أطباق بتري وترك ليبرد، تم تنشيط عزلة الفطر قيد الدراسة بتلقيح (40) طبق من وسط PDA وحضنت بدرجة حرارة25 مْ ±2ولمدة 7 أيام.

حضر لقاح الفطر *A. niger*وذلك بأخذ 10 أطباق من وسط PDA المنمى عليه الفطر*A. niger* بعمر أسبوع وأضيف إلى كل طبق ماء مقطر معقم وبواقع 20 مل لكل طبق ، ثم حرك الطبق جيدا لضمان الحصول على لقاح الفطر ، وبعدها تم جمع اللقاح من جميع الأطباق في دورق واحد معقم لتتم عملية تغطيس الثمار فيه ، تم حساب تركيز اللقاح باستخدام طريقة [20] . اذ بلغ تركيز اللقاح 2.1×10^6 بوغ / مل ، نفذت التجربة وفقا للخطوات التالية :

1- تم تهيئة كمية من ثمار التفاح الأحمر بلغت 8 كغم وبعد تعقيمها بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% وغسلها بالماء المقطر المعقم نقلت الى طبق حاوي على ورق نشاف إلى ان جفت وبعدها قسمت الى قسمين متساويين، والقسم الواحد قسم إلى مجموعتين ثانويتين الأولى تم إحداث جروح في الثمار بواسطة شفرة معقمة بطول وعمق سنتمترين والمجموعة الثانية تركت دون إحداث جروح فيها (الثمار السليمة) .

2- تم معاملة المجموعة الثانوية الأولى من ثمار التفاح المجرح بمحلول بيكاربونات الصوديوم بتركيز 0.05 ملغم / لتر بطريقة التغطيس. إذ غطست الثمار لمدة دقيقتين ، بعد ذلك عوملت نفس المجموعة من الثمار بعالق الفطر *A. niger*المحضر مسبقا وبطريقة التغطيس أيضا ولمدة دقيقتين.

كررت نفس العملية مع المجموعة الثانية من الثمار السليمة.

3- معاملة المجموعة الثانوية الاخرى من الثمار المجرحة بحامض الاسكوربيك تركيز 0.5 ملغم / لتر بطريقة التغطيس ، اذ غطست الثمار لمدة دقيقتين ، وبعد ذلك عوملت نفس المجموعة من الثمار بعالق الفطر *A. niger* المحضر مسبقا ، بطريقة التغطيس لمدة دقيقتين أيضا.
وكررت نفس العملية مع الثمار السليمة.
4- تم تهيئة مجموعة من ثمار التفاح المجرحة (كمجموعة سيطرة) ثم معاملتها بلقاح الفطر *A. niger* فقط بالإضافة الى معاملة مجموعة اخرى من ثمار التفاح (السليم) بنفس لقاح الفطر كمجموعة سيطرة اخرى.
5- حفظت مجاميع الثمار المعاملة كلا على حده في اكياس نايلون نظيفة واغلقت الاكياس جيدا وخزنت تحت ظروف المختبر الطبيعية لمدة 10 ايام ، ثم حسبت شدة الاصابة وذلك بعد عمل مفتاح لشدة الاصابة مكون من خمسة درجات حسب طريقة [21] . كما موضح ادناه :
1- ثمار سليمة =0
2- الثمار التي أتلفت الاصابة من 1- 25 % من أنسجتها =1
3- الثمار التي أتلفت الاصابة من 26 – 50 % من أنسجتها =2
4- الثمار التي أتلفت الاصابة من 51 – 75 % من أنسجتها =3
5- الثمار التي أتلفت الاصابة من 76 – 100% من أنسجتها =4

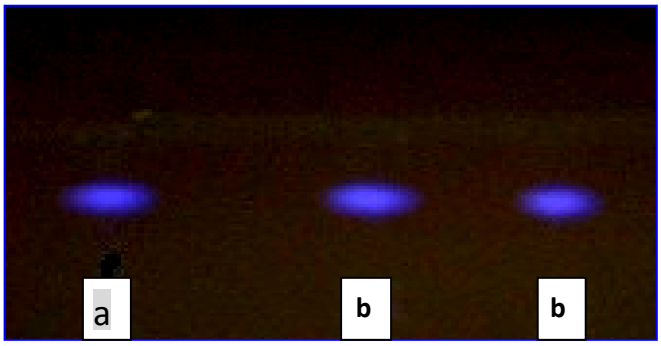
7- التحليل الإحصائي : تم حساب النسبة المئوية لشدة الاصابة حسب معادلة Mckinney 1923 [22] .

$$\text{شدة الاصابة} = \frac{\text{عددالثمار من درجة } 0\times0 + 1\times1 \text{.....عدد الثمار من الدرجة } 4\times4}{\text{عدد الثمار الكلية} \times 4}$$

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج اختبارTLC لقابلية عزلة *A. niger* على إنتاج الاوكراتوكسين وذلك من خلال مطابقة معامل الترحيل ولون التألق لمستخلص عزلة الفطر مع السم القياسي للاوكراتوكسين وكما موضح في صورة (1) .
أظهرت النتائج الموضحة في جدول (1) تفوق مادة بيكاربونات الصوديوم بتركيز 0.05 ملغم / لتر في حماية ثمار التفاح في كلا المجموعتين المجرح والسليم بنسبة 100% حيث كان معدل نسبة الاصابة بفطر *A. niger* للمجموعتين المعادلتين بمادة بيكاربونات الصوديوم 0% ، بينما لم يظهر حامض الاسكوربيك أي دور ايجابي في حماية الثمار في المجموعة المجرحة من الاصابة بالفطر *A. niger* وكان معدل الاصابة 100% ، بينما اظهرت كفاءتها العالية في حماية الثمار السليمة من الاصابة بالفطر وكان معدل نسبة الاصابة 0%.

صورة (1) استخدام تقنية TLCفي الكشف عن قدرة الفطر A. niger على انتاج الاوكراتوكسين .
a- السم القياسي للاوكراتوكسين b- مستخلص الفطر .



جدول (1) تأثير معاملة ثمار التفاح ببيكاربونات الصوديوم وحامض الاسكوربيك في معدل نسبة اصابتها بالفطر *A. niger*

حالة الثمار / المعاملات	معدل نسبة الاصابة	
	مجرح%	سليم %
بيكاربونات الصوديوم	0	0
حامض الاسكوربيك	100	0
السيطرة	100	100

تشير النتائج المبينة في جدول (2) الى تأثير معاملة ثمار التفاح ببيكاربونات الصوديوم وحامض الاسكوربيك على معدل شدة الاصابة بالفطر *A. niger* حيث بينت النتائج الكفاءة العالية لمادة بيكاربونات الصوديوم في تثبيط الاصابة بالفطر *A. niger* لمجموعتي الثمار السليمة والمجرحة وكان معدل شدة الاصابة 0% ، بينما الثمار المعاملة بحامض الاسكوربيك في مجموعة المجرح كان معدل شدة الاصابة بها 25% بالمقارنة مع مجموعة السليم الذي اثبت فيها كفاءة حامض الاسكوربيك في تثبيط نمو الفطر والاصابة بمعدل شدة الاصابة 0% مقارنة بمجموعة السيطرة فقد كانت شدة الاصابة بالمجرح 100% وفي معاملة السليم 91.6 % .

جدول(2) تأثير معاملة ثمار التفاح ببيكاربونات الصوديوم وحامض الاسكوربيك على معدل شدة اصابتها بالفطر *A. niger*

حالة الثمار / المعاملات	معدل شدة الاصابة	
	مجرح%	سليم %
بيكاربونات الصوديوم	0	0
حامض الاسكوربيك	25	0
السيطرة	100	91.6
L.S.D.	16.6	18.4

وكما موضح في صورة (2) المتمثلة بثمرة تفاح (مجرح) معاملة ببيكاربونات الصوديوم مع لقاح الفطر حيث يلاحظ سلامة الثمرة من الاصابة بالفطر *A. niger* بشكل كامل مقارنة بمجموعة السيطرة المتمثلة بالثمرة المجرحة المعاملة بلقاح الفطر فقط.

صورة(3) توضح ثمرة التفاح (السليم) المعاملة ببيكاربونات الصوديوم وتظهر الصورة كفاءة المادة في حماية الثمرة من الاصابة بالفطر *A. niger* مقارنة بمعاملة السيطرة المتمثلة بالثمرة السليمة المعاملة بلقاح الفطر فقط والتي تظهر الاصابة بالتعفن الطري.

بينما تشير صورة (4) الى معدل شدة الاصابة بالفطر *A. niger* والبالغ 25% في ثمرة التفاح (المجرح) المعاملة اولا بحامض الاسكوربيك ثم بلقاح الفطر حيث تشير عدم كفاءة الحامض في حماية الثمار من الاصابة بالفطر بشكل كامل اما في معاملة الثمار السليمة فكانت مادة حامض الاسكوربيك ذات كفاءة عالية في حماية الثمرة من الاصابة بالفطر نفسه ، وكان معدل شدة الاصابة 0% مقارنة بمعاملة السيطرة ، صورة (5). وقد يعود سبب تأثر الفطر بتلك المركبات إلى فعالية بيكاربونات الصوديوم العالية في الاختلال بالمحتوى المائي للغذاء حيث تقلل من كمية الماء الحر المهم لنمو الخلية المايكروبية فتصبح البيئة الغذائية غير ملائمة للنمو المايكروبي ، حيث تزداد الازموزية مما يؤدي إلى بلزمة الخلية الفطرية وتوقف نشاطها ومن ثم هلاكها لأنه كل ميكروب له محتوى مائي محدد ينمو فيه ، أما حامض الاسكوربيك فيكون تأثيره من خلال خفض مستوى PH إضافة إلى تأثيره في الجزيئات الغير المتاينة والتي تؤثر في الخلية المايكروبية وتثبط بعض الإنزيمات إضافة إلى انه كل ما كانت الجزيئات الغير المتاينة هي السائدة تؤثر على الأغشية السايتوبلازمية للخلية .[23، 24] .

توافقت نتائج هذه الدراسة مع [25] اذ بينت نتائج دراستها كفاءة حامض الاسكوربيك في توفير حماية لبذور الحنطة من الاصابة بالفطر *A. flavus* تحت ظروف الخزن الطبيعية اذ بلغ المعدل العام لنسبة الاصابة في البذور المعاملة بالحامض 20% في حين ارتفعت الاصابة الى 89% في البذور غير المعاملة بالحامض.

واكدت دراسة اخرى للباحثان [26] . التثبيط الكامل لحامض الاسكوربيك لبكتريا *Bacillus subtilis* وانواع اخرى من البكتريا وكذلك فعالية الحامض في تثبيط نمو الفطرين *A. niger , A. flavus*.

وتوافقت النتائج مع ما توصل اليه [27] . اذ اثبتت الدراسة التركيز الفعال لمادة بيكاربونات الصوديوم في كبح الاصابة بمرض اللفحة المبكرة المسبب لها الفطر *Alternaria Solania* لنباتات البطاطا تم الحصول على تثبيط كامل عند تركيز 1% و2% خفض نسبة الاصابة بالمرض بأكثر من 86.8%.

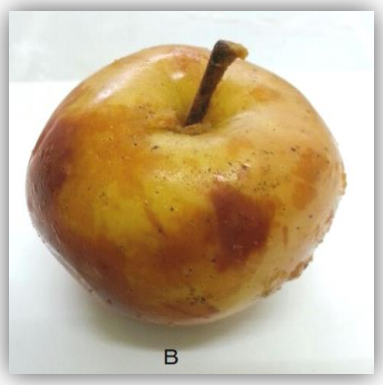
وجاءت النتائج مقاربة لما توصل اليه [28] . في دراسة له اثبتت فعالية بيكاربونات الصوديوم بتثبيط نمو هايفات فطر *Fusarium oxysporum* المسبب في تعفن جذور البصل وكانت نسبة التثبيط 80.66 %.

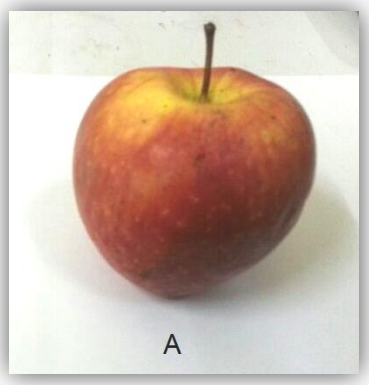
وتوافقت النتائج مع دراسة للباحث [29] حيث اكدت نتائج بحثه فعالية بيكاربونات الصوديوم في تثبيط نمو ثلاث انواع من الفطريات المسببة للعفن ثمار العنب *A. niger , Alternaria ssp. & Botrytic cirnerea* بشكل تجربة خزنية لمدة 30 يوم .

وفي دراسة اجريت من قبل [30]. حيث بينت نتائج الدراسة تثبيط نمو سبورات وهايفات فطر , *Fusarium oxysporum Alternaria alternate & Botrytis cinerea* من قبل بيكاربونات الصوديوم بتركيز 200mM.

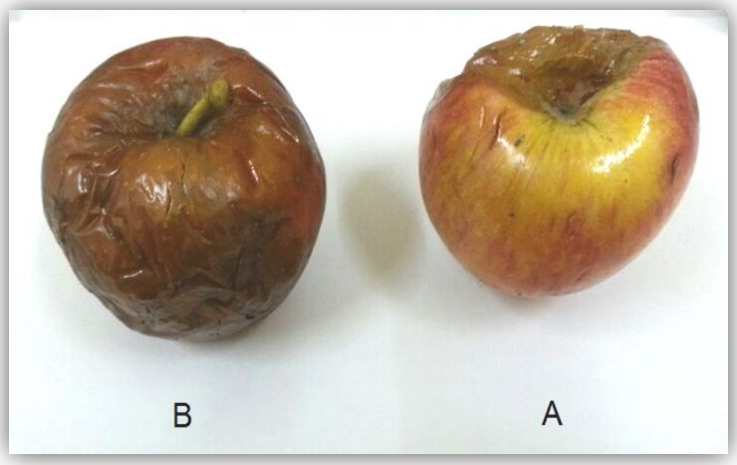
الصورة (2) تقييم كفاءة بيكاربونات الصوديوم في حماية ثمرة التفاح من الاصابة بالفطر *A. niger* تحت ظروف الخزن الطبيعية . A- ثمرة تفاح مجرح معاملة ببيكاربونات الصوديوم + راشح الفطر . B - ثمرة تفاح مجرح معاملة براشح الفطر فقط

الصورة (3) تقييم كفاءة بيكاربونات الصوديوم في حماية ثمرة التفاح من الاصابة بالفطر *A. niger* تحت ظروف الخزن الطبيعية . A - ثمرة تفاح سليم معاملة ببيكاربونات الصوديوم + راشح الفطر . B- ثمرة تفاح سليم معاملة براشح الفطر فقط .

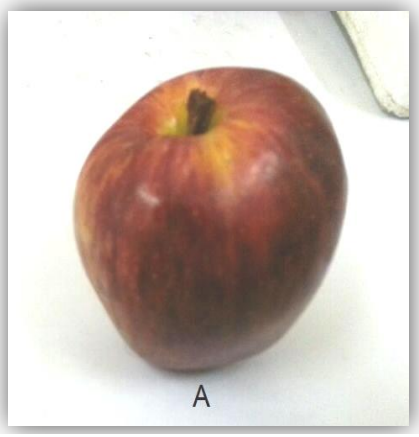


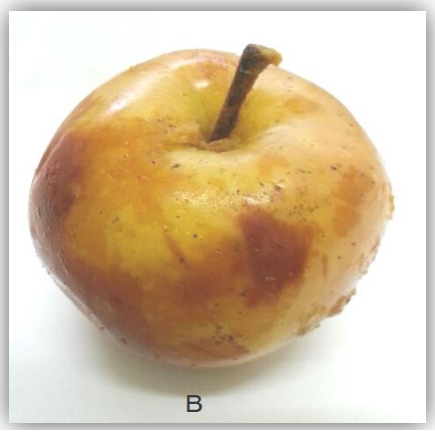


الصورة (4) تقييم كفاءة حامض الاسكوربيك في حماية ثمرة التفاح من الاصابة بالفطر*A. niger*تحت ظروف الخزن الطبيعية . A- ثمرة تفاح مجرح معاملة بحامض الاسكوربيك + راشح الفطر B - ثمرة تفاح مجرح معاملة براشح الفطر فقط . .



الصورة (5) تقييم كفاءة حامض الاسكوربيك في حماية ثمرة التفاح من الاصابة بالفطر *A. niger* تحت ظروف الخزن الطبيعية .
A - ثمرة تفاح سليم معاملة بحامض الاسكوربيك + راشح الفطر B- ثمرة تفاح سليم معاملة براشح الفطر فقط .





المصادر

1- Al-Rahamah, A.N.; Moslem, M.A., and Elkhder, K.A., (2000). Chemical control of post-Hearves of some fruits. Pakistan Journal of Biological sciences, 3.

2- Sansavini, S. (1986). The chilling requirement in apple and its role in regulating time of flowering in spring in cold- winter climate " Symposium on growth Regulators in fruit production (international ed.). ActaHorticulurae. PP: 179.

3- Samson, R.A.; Houbraken J.;Summerbell R.C.; Flannigan, B. and Miller J.D. (2001). Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In (Microorganisms in Home and indoor world Environments. New York. Taylor Francis. PP: 292-287.

4- Ashoor, A. and Abu-Baleer, Y. (2002) Is the Classical Classification of aspergillosisparanasal sinuses to non-invasive and invasive still valis or not ? Bahrain Medical Bulletin. 24: 91-94.

5- Hussein, H.S. and Brasel, J.M. (2001), Toxicity Metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology information statement mycotoxins. PP: 34-89.

6- Creppy, E.E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol. Left. 127 (1-3) : 19-28.

7- Aish, J.L. ; Rippon, H. ; Barlow,T. and Hattersley, S. L. (2004) .Ochratoxin in mycotoxin in food . Detection and control (N. Magan and M. Olsen, eds) Cambridge ,Englnd : Wood head publishing Limited ., pp. 38-307 .

8- Vargo, J. and Z. Kozakiewicz (2006) . Ochratoxin A in grape and grape-derived products . Trends Food Sci. Technol., 17, 72-81 .

9- Egan, H.; Stoloff, L. ;Castegenaro, M. ; Scott, P. ; Oneil, K. ; Bartsch, H. and Davis, W. (1989). Environmental carcinogens selected methods of analysis . International agency for research on cancer, Lyon. Vol. 5 , IARC Publication, No. 44, P. 455.

10- Lock, E. A. and Hard, G. C. (2004) Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse : review of the NCL/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information . Crit. Rev. Toxicol., 34: 99-211.

11- Fung, F and Clark, R. (2004). Health effect of mycotoxins : Toxicological. Overview. Toxicol., 42 : 217-234.

12 - Elaroussi, M. A. ; Mohamed, F. R. ; El-barkouky, E. M. ; Atta, A. M.; Abud, A. M. and Hatab, M. H. (2006) Experimental ochratoxicosis in broiler chickens, Avian pathology, 35(4): 263-269 .

13- Brase, S. ; Encinas, A. ; Keck, J. and Nising, C. F. (2009) Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites ., chemical reviews 109(9) : 3903-3909 .

14- Awaad, M.H.H. ; Atta, A.M. ; Abd El-Ghany, W.A. ; Elmenawey, M.; Ahmed, k.; Hassan, A.A. ; Nada, A.A. and Abdelaleem, G.A. (2011).Effect of specific combination of Mannan – Oligosaccharides and β-Glucans extracted from yeast cell wall on the health status and growth performance of ochratoxicated broiler chickens, J. of American Sci., 7(3): 82-96 .

15- Karabulate, O. A.; Bursa, G. and Mansour, M. (2003). Near-harvest application of *Metschnikowiafructicola,* ethanol and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in Central California. Plant Dis., 87 : 1384 – 1384.

16- McGregor, C.P. and Biesalski, H. K. (2006). Rational and impact of vitamin C in clinical nutrition. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic care 9 (6) : 697 - 703.

17- الجميلي ، سامي عبد الرضا (1996). المقاومة المتكاملة ضدالاصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل . اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة . جامعة بغداد .

18- Sobolev, V.S. and Doner, J. W. (2002). Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural Commodities by liquid Chromatography, J. of Association of Official Analytical chemists International, 85 : 642-45.

19- Nasir, M. S. and Jolly, M.E. (2002). Development of a fluorescene polarization assay for the determination of aflatoxins in grains. J. Agricultural Food chem, 50 : 3226-21.

20- Clark. F.E. (1965). Agar –plats method for total microbial (C.F) Black . (1965). Maehods for soil analysis part 2 publishers madeson , Wisconsin, U.S.A.PP: 1572 .

21- Horsfall, J.G. and Heuberger, J.W. (1942) . Measuring magnitude of a defoliation disease of tomatoes . Phytopsthology ,32:226-232 .

22- Mckinney, H.H. (1923) . Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helimenthosporium sativum* J. Agri. Res. 26:195-217 .

23- Yuming, B.; Xiaomin, Z. and Donald, L.S. (2003). Soy bean plant growth resulting from coinoculation of Bacillus strains with Bradyrhizobiumjaponicum. Canadan Journal of crop science. 43: 2-13.

24- Karabulate, O. A.; Bursa, G. and Mansour, M. (2003). Near-harvest application of *Metschnikowiafructicola,* ethanol and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in Central California. Plant Dis., 87 : 1384 – 1384.

25 - الموسوي ، رغد علي (2013). دراسة تأثير حامض الاسكوربيك في تثبيط نمو الفطر *Aspergillus niger* في محصول الحنطة المحلية .مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة . 2013:vol. 5 / no. 2

26- Gupta G.C.D., and Guha B.C., (1942). The effect of Vitamin C and certain other substances on the growth of micro-organisms, Annals of Biochemistry and Experimental Medicine Journal, 1:14-26.

27- Abd-Elkareem, F. (2007). Potassium or Sodium Bicarbonate in Combination with Nero for controlling Early Blight Disease of potato plants under Laboratory Greenhouse and Field Conditions. Egypt. J. phytopathol., Vol. 35. No. 1 pp : 73 - 86

28- Turkkan, M. and Erper, I. (2014). Evalution of antifungal activity of sodium salts against onion basal rot cased by *Fusarium oxysporum* cepae . plant protect. Sci. , vol.50 , No. 1:19-25 .

29- Ozgur, A.k. ; Josephl, S. ; Franka, M. G. and Monir, M. ; (2003). Near harvest application of mestschni kowia fructicola , ethanol and sodium bicarbonate to contral California . APS Journals , vol. 87, N. 11, 1384-1389 .

30- Zaker, M. (2014). Antifungal evalution of some inorganic salts against three phytopathogenic fungi . International Journal of Agriculture and crop sci. , 7-14/1352-1358