مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 41-عدد 2 (2025): 98- 111

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 41 No.2 (2025): 98 -111

دراسة تحليلية ومقارنة لإنتاج القلويدات والفعالية الحيوية لخمس معزولات من الأسبرجيلوس على وسطين من المخلفات الزراعية والشعير

ناديا إسماعيل خضر[1]، عدنان أحمد علي نظام[2]

[1]طالبة دكتوراه في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية
nadia.khuder@damascusuniversity.edu.sy
[2]أستاذ دكتور في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية
a.nizam@damascusuniversity.edu.sy

الملخص

يساهم محتوى وسط التنمية في توجيه الفطر نحو إنتاج مستقلبات ذات خصائص نوعية يمكن الإستفادة منها في مجالات صناعية أو دوائية حيث يهدف البحث إلى تركيب أوساط تنمية فطرية من مخلفات زراعية Agricultural waste (AW) وتنمية أنواع فطر الأسبرجيلوس عليها وتقدير تأثيرها في إنتاج القلويدات Alkaloids ومقارنتها بوسط خلاصة الشعير التجاري، حيث استخلصت القلويدات وقدرت كمياً في ثلاثة أنواع من الخلاصات؛ المائية والميتانولية وخلات الإتيل لخمسة معزولات فطرية منماة على الوسطين السابقين ومن ثم اختبرت على مجموعة من الأحياء الدقيقة الممرضة لتحديد التركيز المثبط الأدنى لها Minimum Inhibitory Concentration (MIC) واستخدم برنامج SPSS 22 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها. أظهرت النتائج تفوق مذيب خلات الإتيل في استخلاص القلويدات يليه الميتانول فالماء، بشكل عام أعطت كل معزولة تركيز للقلويدات اعتماداً على الوسط الذي تفضله، حيث كانت أكثر معزولة قادرة على إنتاج القلويدات على وسط المخلفات الزراعية وخلاصة الشعير تابعة للنوع *A. niger1* 30.73 ± 0.5 مكغ/ملغ والنوع *A. carbonarius* 14.09 ± 0.2 مكغ /ملغ على الترتيب، تطابقت المحتوى الكلي للقلويدات ضمن الخلاصات مع الفعالية الحيوية إذ أعطت خلاصة خلات الإتيل أفضل النتائج على جميع الأحياء الدقيقة الممرضة يليها الميتانول والماء، وبلغت أفضل خلاصة خلات الإتيل للمعزولة *A. niger1* بقيمة MIC بلغت 1.9 ملغ/مل وللميتانول للمعزولة *A. avenaceus* المنماة على وسط خلاصة الشعير بقيمة MIC بلغت 3.1 ملغ/مل وللماء للمعزولة *A. avenaceus* على وسط المخلفات الزراعية بقيمة MIC 5.3 ملغ/مل، وكان التأثير المثبط الأدنى الأفضل لخلاصات خلات الإتيل والميتانول على جرثوم *Escherichia coli* حيث بلغت قيمة MIC 1.4 – 3.1 ملغ/مل على الترتيب، وكان التأثير المثبط الأكبر للخلاصة المائية على جرثوم *Staphylococcus aureus* بقيمة MIC بلغت 4.3 ملغ/مل، وكانت أفضل خلاصة مضادة لفطر *C. albicans* تابعة للمعزولة *A. niger1* بقيمة MIC بلغت 2.9 ملغ/مل، نوصي باستخدام وسط المخلفات الزراعية كوسط لإنتاج القلويدات الفطرية في جنس الأسبرجيلوس كمصنع حيوي مصغر ينتج العديد من المركبات الواعدة المضادة للأحياء الدقيقة الممرضة.

الكلمات المفتاحية: مخلفات زراعية، أسبرجيلوس، القلويدات، خلاصات، التركيز المثبط الأدنى.

تاريخ الإيداع: 2023/10/29
تاريخ الموافقة: 2024/01/03

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

ISSN (online): 2789-6366
http://journal.damascusuniversity.edu.sy/index.php/index/index

Analytical study and comparison of the production of alkaloids and the bioactivity of five *Aspergillus* isolates on two mediums of agricultural waste and malt

Nadia Ismael khuder[1], Adnan Ahmad Ali Nizam[2]

[1]Ph.D. Students Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus, Syrian Arab Republic nadia.khuder@damascusuniversity.edu.sy
[2]Prof. Dr. at Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus, Syrian Arab Republic a.nizam@damascusuniversity.edu.sy

Abstract

The content of the growth medium contributes to directing the fungus towards producing metabolites with specific properties that can be used in industrial or pharmaceutical fields. The research aims to formulate fungal growth medium from agricultural wastes (AW) and cultivate the *Aspergillus* species on them, and estimate their impact on the production of alkaloid compounds and their comparison with commercial malt extract media, where the alkaloids extracted and estimated in three types of extracts: Aqueous, methanol, and ethyl acetate for five isolates grown on the two previous media and then tested on a group of pathogenic microorganisms to determine their minimum inhibitory concentration (MIC), the SPSS 22 was used to statistically process and analyze the data. The results showed that the solvent ethyl acetate was superior in extracting alkaloids, followed by methanol and water. In general, each isolate gave a concentration of alkaloids depending on the medium it preferred, as the isolate was more capable of producing alkaloids on the agricultural waste medium and malt extract medium, belonged to the type *A. niger1*, 30.73 ± 0.5 µg /mg, and the type *A. carbonarius*, 14.09 ± 0.2 µg /mg, respectively.

The total amount of alkaloids in the extracts matched the biological activity, as the ethyl acetate extract gave the best results on all pathogenic microorganisms, followed by methanol and water. The best ethyl acetate extract was for the *A. niger1* isolate, with an MIC value of 1.9 mg/ml, and for the methanol for the *A. avenaceus* isolate grown on malt extract medium with an MIC value of 3.1 mg/ml, water for *A. avenaceus* isolated on agricultural waste media had an MIC value of 5.3 mg/ml. The greatest effect was for ethyl acetate and methanol extracts on *Escherichia coli* bacteria, where the MIC value reached 1.4 – 3.1 mg/ml, respectively.

The greatest inhibitory effect of the water extract was on *Staphylococcus aureus* bacteria with an MIC value of 4.3 mg/ml, and the best antifungal extract against *C. albicans* was for the *A. niger1* isolate with an MIC value of 2.9 mg/ml. We recommend an agricultural waste medium as a stimulating medium for the production of fungal alkaloids and the *Aspergillus* genus as a miniature biofactory that produces many promising compounds against pathogenic microorganisms.

Received :2023/10/29
Accepted:2024/01/03

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Keywords: Agricultural Wastes, *Aspergillus*, Alkaloids, Extracts, Minimum Inhibitory Concentration.

المقدمة

يعد جنس الأسبرجيلوس *Aspergillus* sp. من أكثر الأنواع الفطرية انتشاراً في جميع البيئات حيث يمتلك خصائص فيزيولوجية وإفرازية ومرونة بيئية تمكنه من الحياة الرمية أو المتطفلة على مجموعة واسعة من الركائز (Nyongesa *et al*.,2015)، كما يعد من أول الأجناس الفطرية المنماة على أوساط مركبة بغرض دراسة خصائصه الكيميائية الحيوية، حيث يستطيع هذا الجنس إنتاج مجموعة واسعة من المستقلبات الأولية والثانوية المتنوعة بنيوياً ووظيفياً مثل البروتينات والسكريات والأحماض العضوية والتربينوئيدات والقلويدات واللاكتونات والستيروئيدات والتي بدورها تحظى باهتمام واسع في مجتمع البحث العلمي وصناعة الأدوية كمركبات متعددة الفعالية (Yu *et al*., 2021)، كفعالية مضادة للجراثيم والفطريات والفيروسات والإلتهابات ومجال السرطانات، حيث أشارت نتائج تسلسل الحمض النووي لهذا الجنس أن التنوع الحيوي وخاصة للمستقلبات الثانوية خاصة أكبر بكثير مما هو مكتشف حتى الآن ولذلك ماتزال الأبحاث جارية لتحديد المزيد من هذه المركبات الكيميائية ذات النشاط الفعال حيوياً (Zang and Gao 2018).

يعمل وسط التنمية الفطري بشكل أساسي على تحفيز فطر الأسبرجيلوس لإنتاج كتلة حيوية ودعم نموه وتكاثره إلا أن العوامل البيئية ولاسيما تركيب الوسط والذي يعد عامل بيئي مهم بما يحويه من مركبات مغذية أوعناصر كيميائة أو رقم هيدروجيني يساهم بشكل كبير في توجيه الفطر نحو تركيب وإنتاج مستقلبات ثانوية ذات خصائص كمية ونوعية كيميائية خاصة من خلال تفعيل مورثات محددة (El-Enshasy 2007)، تعد المستقلبات الثانوية مركبات ذات جزيئات منخفضة الوزن الجزيئي (< 1000 دالتون) وغير ضرورية للمراحل الأولية في حياة الفطر (النمو – التكاثر – التنفس) وينتجها الفطر عن طريق الإستقلاب الغذائي الثانوي، تتنوع هذه المستقلبات في طبيعتها الكيميائية وشكلها الهيكلي بين مركبات ببتيدية غير ريبوزومية وبوليكيتيدية (polyketides) وتربينية وقلويدية (Carvajal 2018).

تعد القلويدات مركبات حلقية غير متجانسة تحتوي في تركيبها الأساسي على ذرات النيتروجين وعلى عناصر أخرى مثل الكبريت ونادراً البروم، الفوسفور أو الكلور، ويمكن أن تشمل مركبات معتدلة أو ضعيفة الحمضية بالإضافة إلى إحتوائها على زمر معتدلة أو حمضية ضعيفة، اكتشفت القلويدات واستعملت منذ 4000 عام كمركبات ذات خصائص علاجية وصيغت تسميتها ككلمة قلويد لأول مرة من قبل العالم الكيميائي Carl F. W. Meissner عام 1819 واشتق اسمها من الكلمة العربية (القالي) والتي تعبر عن النبات الذي تستخرج منه مادة الصودا. تقسم القلويدات إلى ثلاثة أقسام أساسية: القلويدات الحقيقية والأولية والكاذبة، ويندرج ضمنها مجموعة من أنماط القلويدات مثل قلويدات الإيزوكينولين والكينولين والإندول والبيبيريدين وغيرها (Dey *et al*., 2020).

الأهمية والأهداف

تكمن أهمية البحث في ضرورة العثور على بدائل صادية كيميائية من مصادر بيئية جديدة ذات أثر قوي على الأحياء الدقيقة الممرضة بعد امتلاك أغلب معزولاتها مقاومة للصادات الحيوية الحالية، بالإضافة إلى تمتع فطر الأسبرجيلوس بفعالية عالية على إنتاج مجموعة كبيرة من المستقلبات الثانوية الحيوية الفعالة حيوياً مثل القلويدات، لذلك يهدف البحث إلى:

1. تعيين المحتوى الكلي للقلويدات.
2. تحديد المذيب الأفضل في استخلاص القلويدات.
3. تحديد التركيز المثبط الأدنى لمجموعة من خلاصات أنواع الأسبرجيلوس باستعمال مذيبات مختلفة.

الدراسة المرجعية

ينتج فطر الأسبرجيلوس مجموعة واسعة من القلويدات والتي قد يزيد عددها عن 174 مركب وقد اكتشف منها 66 مركب ذو فعالية حيوية تتراوح بين فعالية مضادة للفيروسات والجراثيم والفطريات والسمية الخلوية ومضادات الأكسدة (Cai *et al*., 2015 Youssef and Ashour 2021;).

حيث عُزل المركب Fumiquinazoline C من فطر *A. fumigatus* وكان له تأثير مضاد لخلايا الخطوط السرطانية P388، HL60، A549 (Han *et al*.,2007)، وأبدى القلويد 6-Methoxyspirotryprostatin B أثر خفيف مقاوم للخط الخلوي السرطاني HL-60 (Zhang *et al*.,2008).

في بحث آخر عزل المركب Bisdethiobis (methylthio) gliotoxin – 6 وكان له فعالية في تقوية نمو جذور شتلات نبات الذرة (Afiyatullov *et al*., 2012)، كما أبدى المركب Fumigatoside E فعالية واضحة مضادة للجراثيم ومضاد لفطر *Fusarium oxysporum* (Limbadri *et al*., 2018).

وفي دراسة قام بها Zhu وأخرون عام (2011) عزل فيها القلويد Aspergicin من الخلاصة الميتانولية لجنس الأسبرجيلوس والذي أبدى فعالية عالية مضادة لمجموعة من الجراثيم موجبة وسالبة الغرام مثل S. aureus و*S. epidermidis* و*E.coli* وفطر *C. albicans*، وفي دراسة ثانية تمكن Chen وآخرون عام (2013) من عزل قلويد من النوع الأندولي Stephacidin A من خلاصة خلات الإتيل والذي أبدى فعالية عالية مضادة لجراثيم *S. epidermidis*، وفي دراسة أخرى قام بها Zhou وآخرون عام (2014) باستخلاص وعزل ثلاثة قلويدات من فطر الأسبرجيلوس ذات فعالية عالية على نوعين من جراثيم Vibrio، وهم مركب-3-(2-methylbut-3-en-2-yl)-2-oxoindolin-3-yl)methyl)-1-methyl-3,4-dihydrobenzo[e]-3-(1-hydroxy-3-

ومركب diazepine-2,5-dione ومركبCytochalasin Z17، كما تمكن Luo عام (2017) من عزل القلويدين Eleven diketopiperazine وfumiquinazoline G الذان كان لهما فعالية مضادة لعصيات السل، وأكدت دراسة قام بها Padhi وآخرون عام (2020) فعالية مركب Carbonarones A تجاه جراثيم *Dickeya solani* وفطريات .*Candida* sp.

المواد والطرائق:

1. جمع وتحضير المخلفات الزراعية:

جمعت بقايا المخلفات الزراعية من سوق الهال بدمشق (درنات البطاطا– سوق وأوراق نبات الفول– قشور ثمار البرتقال وغيرها)، بعد تنظيف المخلفات قُطِّعت إلى أجزاء صغيرة وجفّفت بالهواء بعيداً عن أشعة الشمس حتى ثبات الوزن، ثم طحنت العينات لتحويلها إلى مساحيق باستعمال خلاط كهربائي، ووضعت ضمن أكياس بلاستيكية نظيفة وجافة، وحفظت في درجة حرارة الغرفة في مكان جاف لحين الاستعمال.

2. تحضير وسط المخلفات العضوية وتنمية الأنواع المعزولة عليه:

حضر وسط المخلفات الزراعية Agricultural Wastes medium (AW) بإضافة 2غ من كل مسحوق نباتي لكل 500 مل من الماء المقطر وتم قياس درجة حموضة pH الوسط واستخلصت المغذيات بطريقة الحرارة مع الضغط العالي باستعمال جهاز الأوتوغلاف، رشح الوسط للتخلص من الأجزاء الصلبة باستعمال قطع شاش معقمة ومن ثم عقم مرة ثانية بالأوتوغلاف، زرعت أنواع فطر الأسبرجيلوس المعزولة في مختبرات الدراسات العليا لقسم علم الحياة النباتية *A. niger1*، *A. niger2* والمعزولين من منطقتين مختلفتين، *A. flavus*، *A. carbonarius*، *A. avenaceus* على وسط المخلفات الزراعية السائل وعلى وسط خلاصة الشعير السائل Malt Extract Broth

medium (MEB) بلقاح تركيزه مليون بوغة/مل، وحضنت الأنواع مدة 7 أيام بدرجة حرارة 25°±2 ضمن حاضنة هزازة (Christable *et al.*, 2016).

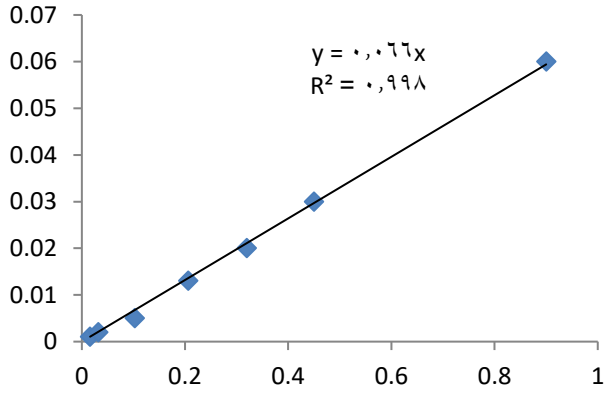
3. تحضير الخلاصات الفطرية للمعزولات المدروسة:

فصلت أفطورة الأنواع عن الأوساط بعد التنمية باستعمال قطع شاش معقمة وغسلت بالماء المقطر المعقم وجففت ضمن فرن حراري حتى ثبات الوزن. استعمل في تحضير الخلاصات لكل معزولة فطرية ثلاثة أنواع من المذيبات وهي الماء والميثانول وخلات الإتيل، وبلغ العدد النهائي للخلاصات 30 خلاصة، وكانت الطريقة وفق الآتي:

استعمل في عملية الاستخلاص طريقة التعريض للأمواج فوق الصوتية متبوعة بعملية النقع بالمذيب لزيادة كفاءة الاستخلاص حيث أخذ 3 غ من الأفطورة الجافة لكل معزولة فطرية وطحنت باستعمال الهاون وأضيف إليها 50 مل من المذيب واستخلصت ضمن حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية مدة ساعتين، عرضت العينات المستخلصة بالماء بشكل خاص لدرجة حرارة 70 مئوية مدة ساعتين للتأكد من القضاء على الأبواغ وعدم نموها ضمن سائل الإستخلاص، نقعت المعزولات المطحونة في الظلام على الهزازة بقيمة دوران بلغت 120 دورة/ دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة مدة 72 ساعة، رشحت بعد ذلك المذيبات الحاوية على الخلاصات الفطرية الخام وفصلت عن قطع الأفطورة بوساطة ورق ترشيح Filter paper بأبعاد ثقوب 0.33 ملم وبمساعدة مخلية هواء، كثفت الخلاصات باستعمال المبخر الدوار وجففت ضمن أوعية زجاجية موزونة ضمن الفرن الحراري oven بدرجة حرارة 40 م° حتى التأكد من ثبات الوزن. حسبت أوزان الخلاصات وحُفظت في المجمدة بدرجة حرارة −40 م°(Campos *et al.*, 2008).

4. تحديد المحتوى الكلي القلويدات:

أضيف 100 ميكروليتر من الخلاصة بتركيز 100 ملغ/مل إلى 1 مل من حمض كلور الماء 2 نظامي، غسلت بعدها العينة بمقدار 10 مل من مذيب الكلوروفورم ثلاث مرات، أخذت العينة وعدل الرقم الهيدروجيني لها باستعمال هيدروكسيد الصوديوم 1 نظامي، أضيف 5 مل من كاشف أخضر البروموكريزول Bromocresol Green (BCG) و5 مل من المحلول الموقي الفوسفاتي Phosphate Buffer ذو الرقم الهيدروجيني4.7، رجت العينة بشكل قوي ليتشكل معقد لوني ومن ثم استخلص المعقد بإضافة الكلوروفورم بالتدريج 1، 2، 3، و4 مل مع الرج الجيد للعينة بعد كل إضافة، تمم الحجم النهائي بالكلوروفورم لحجم معلوم وقيس على جهاز المطياف الضوئي بطول موجة 415 نانومتر، حسب تركيز القلويدات بالملغ/مل بإسقاط قيم الإمتصاصية على المنحني المعياري لمركب الأتروبين Atropine (الشكل 1) (El-Desouky 2022).



الشكل 1. المنحني المعياري لمركب الأتروبين (ملغ/مل)

5. دراسة الفعالية الحيوية للخلاصات الفطرية وحساب تركيز MIC باستعمال طريقة التمديد الدقيقة السائلة (The broth Microdilution method):

1- حضرت المحاليل الأم للخلاصات الفطرية بتركيز 100 ملغ/مل بحلها ضمن مذيب Dimethylsulfoxide (DMSO).

2- جهز اللقاح الجرثومي لمجموعة من الجراثيم الممرضة سلبية وإيجابية غرام (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa,* (*Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans*) وخميرة المبيضات البيض *Candida albicans* المعزولة والمنقاة في مشفى الأطفال بدمشق، وذلك بتحضير الممرض بتركيز 0.5 ماكفرلاند ضمن ماء فيزيولوجي ومن ثم نقل 1مل من اللقاح وإضافة 20 مل من الماء الفيزيولوجي للحصول على كثافة 5×10^6 خلية/مل.

3- درس التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC) للشاهد الإيجابي السفترياكسون Ceftriaxone على الجراثيم الممرضة والنستاتين Nystatin على المبيضات البيض (الشاهد الإيجابي) حيث طبقت مجموعة من التراكيز المتدرجة من 1 ملغ/مل وحتى 7.8 ميكروليتر/مل على الممرضات بتركيز 10^5 خلية/مل، وجرى التمديد باستعمال المرق المغذي Nutrient Broth.

3- طبقت التجربة ضمن صفيحة 96 بئر بحيث يكون حجم السائل ضمن البئر الواحد بسعة 100 ميكروليتر، حيث وضع في الصف العمودي الأول من جهة اليسار 100 ميكرولتر من وسط المرق المغذي من دون لقاح ولا معالجة.

2- وضع في الصف العمودي الثاني 15 ميكروليتر من تركيز المحلول الأم للصاد الحيوي (الشاهد الإيجابي) مع 75 ميكروليتر وسط مرق مغذي مع الأخذ بالحسبان عامل التمديد لنحصل على التركيز الأدنى القاتل وأضيف 10 ميكرولتر من اللقاح (الجرثومي أو الفطري) بتركيز 10^6 خلية /مل ليصبح تركيز اللقاح بعد التمديد 10^5 خلية/مل.

3- وضع في الصف العمودي الثالث 20 ميكروليتر من مذيب DMSO و70 ميكروليتر من وسط المرق المغذي و10 ميكروليتر من اللقاح (الشاهد السلبي).

4- عبئت باقي آبار الصفيحة ب80 ميكروليتر من وسط المرق المغذي.

5- طبق في الصف العمودي الرابع تركيز الخلاصات 100 ملغ/مل ليصبح التركيز بعد تمديد الخلاصة بوسط المرق المغذي 50 ملغ/مل بحجم كلي 200 ميكروليتر للبئر.

6-جرت بعدها عملية التمديد بين الآبار ليتناقص التركيز بالتدريج بين (50- 25- 12.5-6.25- 3.12 ملغ/مل) بواقع صفيين أفقيين لكل خلاصة وأضيف 10 ميكروليتر من اللقاح لكل الآبار.

7- أغلقت الصفيحة بإحكام بغطاء عقيم منعاً لتبخر الوسط وفقدان حجم السائل وحضنت بدرجة حرارة 35° ±2 بعد ربع ساعة من وضع اللقاح مدة 20 ساعة.

8- أضيف 20 ميكروليتر من مركب التترازوليوم 2,5-Diphenyl-3-tetrazolium chloride (TCC) لكل الآبار ومن ثم حضنت بدرجة حرارة 31° ±2 مدة ساعتين.

9- قرأت النتائج بالعين المجردة، حيث عد التركيز المثبط الأدنى أول بئر يتلون باللون القرمزي (Cockerill 2012).

6. الدراسة الإحصائية:

أجريت معظم التجارب بعمل ثلاثة مكررات للتجربة الواحدة على الأقل، واستعمل برنامج SPSS 22 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها. اعتمد اختبار تحليل التباين ثنائي الاتجاه Tow way analysis of variance (ANOVA) لدراسة الفروق المعنوية لكل من متوسط قيم القلويدات الكلية بين المعزولات الفطرية والأوساط المختبرة، ولدراسة الفروق المعنوية لكل من قيم التركيز المثبط الأدنى للخلاصات بين

المعزولات الفطرية والأوساط المختبرة على المعزولات الجرثومية ولتحديد مصدر هذه الفروق تم إجراء تحليل LSD للمقارنات البعدية، كما عُدت القيمة $P<0.05$ كقيمة يعتد بها إحصائياً بمستوى ثقة 95%.

النتائج والمناقشة:

1. المحتوى الكلي للقلويدات

أظهرت نتائج تحديد المحتوى الكلي للقلويدات ضمن الخلاصات الفطرية المحضرة تفوق مذيب خلات الإتيل في استخلاص أكبر كمية من القلويدات من المعزولات المستعملة يليه الميتانول 80% يليه الماء ويعود السبب إلى أن معظم أنواع القلويدات الفطرية قابلة للإنحلال ضمن المذيبات قليلة القطبية متل خلات الإتيل يليها الميتانول وهي قليلة الإنحلال بالماء (الجدول1)

(Yan *et al*., 2021; Youssef *et al*., 2021 .)

الجدول 1. تركيز المحتوى الكلي للقلويدات في خلاصات أنواع الأسبرجيلوس المزروعة على الوسطين المختبرين

الأنواع	وسط المخلفات الزراعية (مكغ/ملغ)			وسط خلاصة الشعير (مكغ/ملغ)		
	الماء	الميتانول	خلات الإتيل	الماء	الميتانول	خلات الإتيل
A. niger1	0.2 ± 1.35	0.3 ± 1.37	0.5 ± 30.73	0.1 ± 0.65	0.1 ± 0.72	0.2 ± 5.52
A. niger2	0.1 ± 0.51	0.2 ± 1.64	0.2 ± 8.24	0.09 ± 1.37	0.3 ± 3.44	0.3 ± 12.92
A. carbonarius	0.1 ± 1.04	0.5 ± 8.73	0.4 ± 14.32	0.05 ± 0.83	0.2 ± 2.07	0.2 ± 14.09
A. flavus	0.3 ± 1.23	0.2 ± 5.82	0.2 ± 5.91	0.06 ± 1.49	0.09 ± 1.88	0.1 ± 2.27
A. avenaceus	0.3 ± 1.04	0.1 ± 1.37	0.15 ± 8.46	0.05 ± 1.88	0.3 ± 5.61	0.3 ± 13.76
المتوسط	0.2 ± 1.034	0.26 ± 3.78	0.29 ± 13.5	0.14 ± 1.24	0.19 ± 2.74	0.22 ± 9.71

LSD بين أنواع الفطريات 0.5704، LSD بين أنواع المذيبات 0.441

أما عن نتائج تقدير أثر الأوساط المستعملة على قيمة القلويدات الكلية للأنواع الفطرية فقد أظهرت النتائج اختلاف الإنتاج بإختلاف المعزولة المنماة حيث فضلت معزولة *A. niger1* و*A. flavus* وسط المخلفات الزراعية وفضلت معزولة *A. niger2* و*A. avenaceus* وسط خلاصة الشعير بينما لم يتأثر إنتاج معزولة *A. carbonarius* بإختلاف الوسط ويمكن أن تعلل النتيجة لأسباب وراثية أو طفرات تعرضت لها المعزولة لتتأقلم ضمن الشروط البيئة التي كانت نامية فيها، أما عن مقارنة إنتاج القلويدات بين الأنواع فكان أكثر معزولة قادرة على إنتاج القلويدات على وسط المخلفات الزراعية وخلاصة الشعير بالترتيب تابعة للنوع *A. niger1* 30.73 ± 0.5 مكغ/ملغ والنوع *A. carbonarius* 14.09 ± 0.2 مكغ/ملغ، أما عن أضعف معزولة منتجة للقلويدات على الوسطين تابعة للنوع *A. flavus* بقيمة 5.91 ± 0.2− 2.27 ± 0.1 مكغ/ملغ (الجدول 1)، وبمقارنة أعلى تركيز للقلويدات في الخلاصة الميتانولية لدراستنا 0.873 ± 0.5 مكغ/ملغ (0.017 ملغ/مل) خالفت نتائجنا نتائج Shahid وآخرون عام 2018 والذي بلغ فيها أعلى قيمة للقلويدات الداخل خلوية لفطر الأسبرجيلوس في الخلاصة الميتانولية 1.33 ملغ/مل كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم القلويدات الكلية بين خلاصات المعزولات المنماة على الوسطين المختبرين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

2. الفعالية الحيوية للخلاصات الفطرية

بشكل عام تتضمن خلاصات الأسبرجيلوس العديد من المركبات الفعالة حيوياً والمضادة للجراثيم والفطريات الممرضة وقد توجه البحث للكشف عن دور القلويدات في هذه الفعالية والتي تعد مركبات نشطة ذات فعالية عالية مقاومة للجراثيم والفطريات (Yan *et al*., 2021) بلغت اختبارات مقارنة التركيز المثبط الأدنى بين خلاصات المعزولات المنماة على AW و M 75 اختبار لكل وسط (150 اختبار كلي) وتوافقت نتائج 67 اختبار مع نتائج المحتوى الكلي للقلويدات حيث زادت الفعالية الحيوية بزيادة كمية القلويدات الكلية في الخلاصة وتخالفت 8 اختبارات مع نتائجها حيث لم ترتبط فيها نتائج الفعالية الحيوية مع زيادة قيمة القلويدات ويمكن أن يعود سبب التخالف إلى وجود مركبات أخرى فينولية أو فلافونوئيدية أو ستيروئيدية ضمن الخلاصات ذات فعالية مضادة لها أثر موجه للنوع الجرثومي المختبر (Shah *et al*., 2022).

أما عن نتائج الفعالية الحيوية فقد بلغ التركيز المثبط الأدنى للصاد الحيوي الإيجابي على جراثيم *E.coli* 500 ميكروغرام/مل وهو تركيز مرتفع بالمقارنة مرجعياً مع نفس الصاد حيث بلغ مجال التركيز المثبط الأدنى 0.03– 0.12 مكغ/مل، أما عن نتائج التركيز المثبط الأدنى للصاد الحيوي الإيجابي على جراثيم *p. eriginosa* فقد بلغ التركيز 65 مكغ/مل وهو تركيز مرتفع للضعف عن مجال تركيز الصاد مرجعياً والذي بلغ 8–32 مكغ/مل، أما فيما يخص الجراثيم موجبة الغرام فقد بلغ التركيز المثبط الأدنى للصاد الحيوي لجراثيم *S. aureus* و*S. Mutants* 16 مكغ/مل وبمقارنتها مع النتائج مرجعياً بلغ مجال التركيز المثبط الأدنى 1–8 مكغ/مل لجراثيم *S. aureus* و16–32 مكغ/مل للمعزولات متوسطة المقاومة لمجموعة جراثيم .sp *streptococcus*، ويمكن أن يعود السبب في مقاومة المعزولات للصاد الحيوي وارتفاع التركيز المثبط الأدنى لكونها جراثيم معزولة من مشفى الأطفال بدمشق ومعرضة للعديد من المواد المطهرة والصادات الحيوية مما أكسبها صفة المقاومة (https://www.accessdata.fda.gov).

أما عن نتائج الفعالية الحيوية للخلاصات فقد كانت نتائج خلاصة خلات الإتيل للأنواع جميعها هي الأفضل من بين الخلاصات على جميع الأحياء الممرضة وذلك لكون خلات الإتيل مذيب نصف قطبي يستطيع أن يستخلص مجموعة واسعة من المركبات القطبية واللاقطبية ذات الفعالية الحيوية المضادة للأحياء الممرضة والتي تتوافق معه قطبياً مثل Polyketon و Terbenens و Steroids والقلويدات من النوع Isoquinoline و Indole و Steroidal (Zhang *et al*., 2018) وتوافقت نتائج ارتفاع الفعالية الحيوية مع نتائج ارتفاع قيمة القلويدات الكلية في هذه الخلاصة، كان التأثير الأقوى لمجمل خلاصات المعزولات على الجراثيم سالبة الغرام *E. coli* و*p. eriginosa* بمجال تركيز بلغ 1.4، 1.4–2.7 ملغ/مل على التتالي، يليها الجراثيم إيجابية الغرام *S. aureus* و*S. Mutants* بمجال تركيز 1.4 – 7.5، 3.7 – 7.5 ملغ/مل على التتالي (الجدول 2)، توافقت نتائجنا مع نتائج دراسة أجراها Pinheiro وآخرون عام 2013 حيث تفوق التأثير المضاد للقلويدات الستيروئيدية المعزول من الخلاصات على الجراثيم المدروسة يليها خلاصة خلات الإتيل والميتانول، وبشكل عام كان التأثير الأكبر للخلاصات والمركبات المعزولة على الجراثيم سلبية الغرام عن موجبة الغرام (Pinheiro *et al*., 2013) وتوافقت نتائجنا مع نتائج (Abdel-Wareth *et al*., 2023) في زيادة حساسية جرثوم *E. coli* عن جرثوم *S. aureus* لخلاصات خلات الإتيل لأنواع الأسبرجيلوس المختبرة، بينما أظهرت جرثوم *p. eriginosa* مقاومة عالية نسبياً مقارنة بباقي الجراثيم، وتوافقت نتائجنا مع نتائج (Rodrigues *et al*., 2022)، ويمكن تفسير اختلاف نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات السابقة إلى اختلاف النوع الفطري المدروس واختلاف المعزولات الجرثومية المدروسة، وأما عن نتائج أفضل خلاصة في التأثير فكانت تابعة للنوع *A.niger1* المنماة على الوسطين بقيمة MIC بلغت 1.9 ملغ/مل ويمكن أن يعود السبب إلى قدرة هذا النوع على إنتاج كمية كبيرة ومتنوعة من المستقلبات الثانوية ذات الفعالية الحيوية (Zhang *et al*., 2018; Yu *et al*., 2021) وهذا يتوافق أيضاً مع ارتفاع نتائج القلويدات الكلية لخلاصات هذه المعزولة

(الجدول 2). كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم الفعالية الحيوية للجراثيم بين خلاصات المعزولات المنماة على الوسطين المختبرين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الجدول 2. التركيز المثبط الأدنى لخلاصات خلات الإتيل لأنواع الأسبرجيلوس النامية على الوسطين المختبرين (ملغ/مل)

Ceftriaxone	*A. avenaceus*		*A. flavus*		*A. carbonarius*		*A. niger2*		*A. niger1*		الأنواع
	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	الوسط
مكغ/مل	13.76 ± 0.3	8.46 ± 0.15	2.27 ± 0.1	± 5.91 0.2	14.09 ± 0.2	14.3 ± 2 0.4	12.9 ± 2 0.3	8.24 ± 0.2	5.52 ± 0.2	30.7 ± 3 0.5	القلويدات مكغ/ملغ
500	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	*E. coli*
65	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	1.4	1.4	1.4	1.4	*P. eriginosa*
16	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	3.7	3.7	3.7	3.7	*S. mutants*
16	1.4	3.7	3.7	7.5	3.7	3.7	3.7	1.4	1.4	1.4	*S. aureus*

LSD بين أنواع الفطريات 0.143، LSD بين أنواع المذيبات 0.127

تلا خلاصة خلات الإتيل في التأثير على الأحياء الممرضة خلاصة الميتانول ويمكن أن يعود السبب إلى قدرتها على حل المستقلبات الثانوية الفعالة السابقة بكفاءة متوسطة أقل من خلات الإتيل وبترتيب تأثير مشابه على الأحياء الممرضة، حيث كان التأثير الأكبر على الجراثيم سالبة الغرام بمجال تركيز بلغ 3.1، 3.1 – 6.2 ملغ/مل للجراثيم *E. coli* و*P. eriginosa* يليها الجراثيم إيجابية الغرام بمجال تركيز 3.12 – 6.2، 3.12 – 12.5 ملغ/مل للجراثيم *S. mutants* و*S. aureus* (الجدول 3)، اختلفت نتائجنا عن نتائج دراسة قام بها (Fawzy *et al*., 2011) للخلاصة الميتانولية لنوعين من فطر الأسبرجيلوس على مجموعة من الأحياء الدقيقة الممرضة حيث كان التأثير الأقوى للخلاصة على جرثوم *S. aureus* يليها جرثوم *E. coli* ويمكن أن يعود اختلاف التأثير إلى اختلاف معزولات الأحياء الدقيقة الممرضة المدروسة، وكانت أفضل خلاصة تابعة للمعزولة *A. avenaceus* المنماة على وسط خلاصة الشعير بقيمة MIC بلغت3.1 ملغ/مل (الجدول 3)، كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم الفعالية الحيوية للجراثيم بين خلاصات المعزولات المنماة على الوسطين المختبرين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الجدول 3. التركيز المثبط الأدنى لخلاصات الميتانول لأنواع الأسبرجيلوس النامية على الوسطين المختبرين (ملغ/مل)

Ceftriaxone	*A. avenaceus*		*A. flavus*		*A. carbonarius*		*A. niger2*		*A. niger1*		الأنواع
	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	الوسط
مكغ/مل	5.61 ± 0.3	1.37 ± 0.1	± 1.88 0.09	5.82 ± 0.2	2.07 ± 0.2	8.73 ± 0.5	3.44 ± 0.3	1.64 ± 0.2	0.72 ± 0.1	1.37 ± 0.3	القلويدات مكغ/ملغ
500	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	*E. coli*
65	6.2	6.2	6.2	3.12	6.2	3.12	6.2	3.12	3.12	6.2	*P. eriginosa*
16	3.12	6.2	12.5	6.2	12.5	3.12	6.2	6.2	6.2	6.2	*S. mutants*
16	3.12	6.2	6.2	12.5	12.5	6.2	12.5	12.5	12.5	6.2	*S. aureus*

LSD بين أنواع الفطريات 0.016، LSD بين أنواع المذيبات 0.015

أما عن نتائج الخلاصة المائية فقد أبدت فعالية حيوية مضادة جيدة نسبياً ولكنها كانت الأخفض من بين الخلاصات ويمكن أن يفسر ذلك إلى قدرتها المنخفضة على حل المستقلبات الثانوية اللا قطبية الفعالة حيوياً لكنها أيضاً احتفظت بقدرتها على حل المستقلبات الفينولية والفلافونوئيدية والقلويدات البيريدينية والمركبات الببتيدية الفعالة حيوياً والتي تعد مركبات مضادة هامة جيدة الإنحلال بالماء (Shah *et al*., 2022; Tawfik *et al*.,2022)، ويلاحظ انعكاس طيف التأثير لدى الخلاصة المائية حيث زادت فعالية الخلاصات على الجراثيم إيجابية الغرام وقلت الفعالية على السلبية منها، حيث بلغ مجال تركيز الفعالية 3.12 – 6.2، 3.12– 12.5 ملغ/مل للجراثيم *S. aureus* و*S. mutants* على التتالي، يليها الجراثيم سلبية الغرام بمجال تركيز 7.5 – 15 ملغ/مل للجراثيم *E. coli* و*P. Eriginosa* (الجدول 4)، توافقت نتائجنا في زيادة حساسية الجراثيم إيجابية الغرام عن الجراثيم سلبية الغرام للخلاصة المائية مع دراسة قام بها (Mahboubi *et al*., 2015) حيث أثرت خلاصات الرمان المائية في دراسته على الجراثيم إيجابية الغرام وذلك لإحتواء الخلاصة المائية عموماً على تركيز عالي من الفلافونوئيدات، وكانت أفضل خلاصة مائية تابعة للمعزولة *A. avenaceus* على وسط المخلفات الزراعية بقيمة MIC 5.3 ملغ/مل (الجدول 4)، كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم الفعالية الحيوية للجراثيم بين خلاصات المعزولات المنماة على الوسطين المختبرين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الجدول 4. التركيز المثبط الأدنى لخلاصات الماء لأنواع الأسبرجيلوس النامية على الوسطين المختبرين (ملغ/مل)

Ceftria xone	*A. avenaceus*		*A. flavus*		*A. carbonarius*		*A. niger2*		*A. niger1*		الأنواع
	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	الوسط
مكغ/مل	± 1.88 0.05	1.04 0.3 ±	± 1.49 0.06	1.23 0.3 ±	± 0.83 0.05	1.04 0.1 ±	± 1.37 0.09	0.51 0.1 ±	0.65 0.1 ±	1.35 0.2 ±	القلويدات مكغ/ملغ
500	15	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	7.5	*E. coli*
65	7.5	7.5	15	15	7.5	15	7.5	15	7.5	7.5	*P. eriginosa*
16	3.12	3.12	12.5	6.2	6.2	6.2	3.12	12.5	6.2	6.2	*S. mutants*
16	3.12	3.12	3.12	6.2	6.2	3.12	3.12	3.12	6.25	6.25	*S. aureus*

LSD بين أنواع الفطريات 0.032، LSD بين أنواع المذيبات 0.091

أما عن نتائج التركيز المثبط الأدنى للصاد الحيوي Nystatin على فطر *C. Albicans* فقد بلغ التركيز 9.2 مكغ/مل وهو تركيز أعلى بقليل من مجال التركيز المثبط الأدنى المرجعي 4–8 مكغ/مل، وهذا يدل أيضاً على مقاومة المعزولة نتيجة لعزلها من مشفى الأطفال بدمشق (Gunderson *et al*., 2000)، أما عن نتائج تأثير الخلاصات على الفطر فقد أعطت خلاصة خلات الإتيل التأثير الأقوى بتركيز أدنى مثبط 2.5 ملغ/مل، يليها خلاصة الميتانول ومن ثم خلاصة الماء بمجال تركيز أدنى مثبط 3.1 – 12.5، 3.2 – 12.5 ملغ/مل على التتالي (الجدول 5)، بشكل عام ترافقت زيادة الفعالية في الخلاصات مع الزيادة في تركيز القلويدات مع وجود استثناءات لبعض خلاصات الأنواع حيث زادت فعالية الخلاصة المائية للنوع *A. avenaceus* على الخلاصة الميتانولية ويمكن أن يعود السبب إلى امتلاك هذا النوع مجموعة مركبات منحلة بالماء ذات فعالية مضادة للفطريات، وكانت أفضل خلاصة مضادة لفطر *C. albicans* تابعة للمعزولة *A. niger1* بقيمة MIC بلغت 2.9 ملغ/مل (الجدول 5)، ومما يدعم نتائج الفعالية العالية للخلاصات على فطر *C. albicans* تأكيد الدراسات المرجعية احتواء هذه الخلاصات على مركبات مضادة للفطريات مثل مركب Naptho-γ-pyrones (Nielsen *et al*., 2009) ومركبات asperfumoid وfumigaclavine C وfumitremorgin C وhelvolic acid وphyscion (Liu *et al*., 2004) ومركب

Avenaciolide (Clark *et al*., 2014)، كما أظهرت الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات قيم الفعالية الحيوية لفطر *C. albicans* بين خلاصات المعزولات المنماة على الوسطين المختبرين بدالة إحصائية أقل من 0.05.

الجدول 5. التركيز المثبط الأدنى لخلاصات أنواع الأسبرجيلوس النامية على الوسطين المختبرين ضد فطر *C. albicans* (ملغ/مل)

Nystatin	*A. avenaceus*		*A. flavus*		*A. carbonarius*		*A. niger2*		*A. niger1*		الأنواع
مكغ/مل	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	M	AW	الوسط
9.2	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	خلات الإتيل
	12.5	12.5	7.5	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	7.5	3.1	ميتانول
	3.2	3.2	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	12.5	3.2	ماء

LSD بين أنواع الفطريات 0.032، LSD بين أنواع المذيبات 0.033

الاستنتاجات

1- تفوق مذيب خلات الإتيل في استخلاص القلويدات.

2- أعطت المعزولة *A. niger1* أعلى إنتاج للقلويدات على وسط المخلفات الزراعية بقيمة 30.73 ± 0.5 مكغ/ملغ.

3- أعطت المعزولة *A. carbonarius* أعلى إنتاج للقلويدات على وسط خلاصة الشعير بقيمة 14.09 ± 0.2 مكغ/ملغ.

4- أظهرت خلاصة خلات الإتيل أفضل النتائج على جميع الأحياء الدقيقة الممرضة المدروسة يليها خلاصة الميتانول فالماء.

5- أبدت خلاصات خلات الإتيل والميتانول التأثير الأكبر على جرثوم *E. coli* حيث بلغت قيمة MIC 1.4 – 3.1 ملغ/مل على الترتيب.

6- أبدت خلاصة الماء التأثير الأكبر على جرثوم *S. aureus* بقيمة MIC بلغت 4.3 ملغ/مل.

المراجع

1. Abdel-Wareth, M. T. A., Ali, E. A. M., El-Shazly, M. A. (2023). Biological Activity and GC-MS/MS Analysis of Extracts of Endophytic Fungi Isolated from *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 10(1), 895-909 .
2. Afiyatullov, S., Chaikina, E., Kraskovskaya, N., Anisimov, M. (2012). Effect of alkaloids from the marine-derived strain of the fungus *Aspergillus fumigatus* Fresen. *On the root growth of corn (Zea mays L.) Seedlings. Agrochemistry*, *7*, 39-42.
3. Cai, S ،.Sun, S., Peng, J., Kong, X., Zhou, H., Zhu, T., Li, D. (2015). Okaramines S–U, three new indole diketopiperazine alkaloids from *Aspergillus taichungensis* ZHN-7-07. *Tetrahedron*, *71*(22), 3715-3719 .
4. Campos, F. F., Rosa, L. H., Cota, B. B., Caligiorne, R. B., Rabello, A. L., Alves, T. M., Zani, C. L. (2008). Leishmanicidal metabolites from Cochliobolus sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Negl Trop Dis*, *2*(12), e348. doi: 10.1371/journal.pntd.0000348
5. Carvajal-Campos, A. (2018). *Characterization of Aspergillus section Flavi: molecular markers as tools to unmask cryptic species.* Université Paul Sabatier-Toulouse III.
6. Chen, M., Shao, C.-L., Fu, X.-M., Xu, R.-F., Zheng, J.-J., Zhao, D.-L., Wang, C-.Y. (2013). Bioactive indole alkaloids and phenyl ether derivatives from a marine-derived *Aspergillus* sp. fungus. *Journal of natural products*, *76*(4), 547-553 .
7. Christabel, O., Dorcas, E., Elizabeth, U. Suitability of food crop wastes in the formulation of laboratory media used for the cultivation of soil fungi. *International Journal of Food Science and Microbiology*. Vol. 4 (3), pp. 137-141.
8. Clark, T. N., Bishop, A. I., McLaughlin, M., Calhoun, L. A., Johnson, J. A., Gray, C. A. (2014). Isolation of (–)–avenaciolide as the antifungal and antimycobacterial constituent of a Seimatosporium sp. endophyte from the medicinal plant Hypericum perforatum. *Natural product communications*, 9(10), 1934578X1400901022 .
9. Cockerill, F. R. (2012). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *Clinical and Laboratory Standards Institute.*Vol 35 No. 2.
10. Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). *Recent advances in natural products analysis. Elsevier*. pp. 505-567.
11. El-Desouky, T. A. (2022). Protect peanut kernels from *Aspergillus* spp and their mycotoxins during storage by aqueous extract of carob pulp. *Discover Food*, 2(1), 25 .
12. El-Enshasy, H. A. (2007). Filamentous fungal cultures–process characteristics, products, and applications. *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, 225-261.
13. Fawzy, G. A., Al-Taweel, A. M., Melake, N. A. (2011). In vitro antimicrobial and anti-tumor activities of intracellular and extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. columinaris. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 980 .
14. Gunderson, S. M., Hoffman, H., Ernst, E. J., Pfaller, M. A., Klepser, M. E. (2000). In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *44*(10), 2887-2890.
15. Han, X. Y. X. X. X., Xu, X. Y., & Cui, C. B. (2007). Alkaloidal compounds produced by a marine-derived fungus, *Aspergillus fumigatus* H1-04, and their antitumor activities. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 17(4), 232.

16. Https://www.accessdata.fda.gov, 12/5/2023.
17. Limbadri, S., Luo, X., Lin, X., Liao, S., Wang, J., Zhou, X., Liu, Y. (2018). Bioactive novel indole alkaloids and steroids from deep sea-derived fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012. *Molecules, 23*(9), 2379.
18. Liu, J., Song, Y., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z., Zou, W ،.Tan, R. (2004). *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in Cynodon dactylon as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *Journal of biotechnology, 114*(3), 279-287 .
19. Luo, X., Zhou, X., Lin, X., Qin, X., Zhang, T., Wang, J., Tian, Y. (2017). Antituberculosis compounds from a deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. *Natural product research, 31*(16), 1958-1962 .
20. Mahboubi, A., Asgarpanah, J., Sadaghiyani, P. N., Faizi, M. (2015). Total phenolic and flavonoid content and antibacterial activity of *Punica granatum* L. var. pleniflora flowers (Golnar) against bacterial strains causing foodborne diseases. *BMC complementary and alternative medicine, 15*(1), 1-7 .
21. Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O،. Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395*, 1225-1242 .
22. Nyongesa, B. W., Okoth, S., Ayugi, V. (2015). Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi County, Kenya. *Advances in Microbiology, 5*(04), 205.
23. Overy, D., Correa, H., Roullier, C., Chi, W.-C., Pang, K.-L., Rateb, M., Bills, G .(2017) .Does osmotic stress affect natural product expression in fungi? *Marine drugs, 15*(8), 254 .
24. Padhi, S., Masi, M., Panda, S. K., Luyten, W., Cimmino, A., Tayung, K., Evidente, A. (2020). Antimicrobial secondary metabolites of an endolichenic *Aspergillus niger* isolated from lichen thallus of *Parmotrema ravum*. *Natural product research, 34*(18), 2573-2580 .
25. Pinheiro, E. A. A., Carvalho, J. M., dos Santos, D. C. P., Feitosa, A. d. O., Marinho, P. S. B., Guilhon, G. M. S. P., Marinho, A. M. d. R .(2013) .Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant Bauhinia guianensis. *Natural product research, 27*(18), 1633-1638 .
26. Rodrigues, J. C., Lima da Silva, W., Ribeiro da Silva, D., Maia ،C. R., Santos Goiabeira, C. V., Figueiredo Chagas, H. D., Nunez, C. V. (2022). Antimicrobial activity of *Aspergillus* sp. from the Amazon Biome: Isolation of kojic acid. *International Journal of Microbiology,* 2022.
27. Shah, Z. A., Khan, K., Rashid, H .U., Shah, T., Jaremko, M., Iqbal, Z. (2022). Insights into metabolic and pharmacological profiling of *Aspergillus ficuum* through bioinformatics and experimental techniques. *BMC microbiology, 22*(1), 295 .
28. Tawfik, E., Alqurashi, M., Aloufi, S., Alyamani ،A., Baz, L., Fayad, E. (2022). Characterization of Mutant *Aspergillus niger* and the Impact on Certain Plants. *Sustainability, 14*(3), 1936 .
29. Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., Li, M. (2021). Research progress on antibacterial activities and mechanisms of natural alkaloids: A review. *Antibiotics, 10*(3), 318 .
30. Youssef, F. S., Alshammari, E., Ashour, M. L. (2021). Bioactive alkaloids from genus *Aspergillus: Mechanistic* interpretation of their antimicrobial and potential SARS-CoV-2 inhibitory activity using molecular modelling. *International journal of molecular sciences, 22*(4), 1866 .
31. Yu, R., Liu, J., Wang, Y., Wang, H., Zhang, H. (2021). *Aspergillus niger* as a secondary metabolite factory. *Frontiers in Chemistry, 9*, 701022 .

32. Zhang, M., Wang, W. L., Fang, Y. C., Zhu, T. J., Gu, Q. Q., Zhu, W. M. (2008). Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. *Journal of natural products*, *71*(6), 985-989.
33. Zhang, X., Li ،Z., & Gao, J. (2018). Chemistry and biology of secondary metabolites from *Aspergillus* genus. *The Natural Products Journal*, *8*(4), 275-304 .
34. Zhou, Y., Debbab, A., Wray, V., Lin, W., Schulz, B., Trepos, R., Aly, A. H. (2014). Marine bacterial inhibitors from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Tetrahedron Letters*, *55*(17), 2789-2792 .
35. Zhu, F., Chen, G., Chen, X., Huang, M., & Wan, X. (2011). Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chemistry of Natural Compounds*, *47*, 767-769 .