Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

Biosynthesis of Copper Oxide Nanoparticles From Turmeric (*Curcuma longa*) and Their Effect on Aflatoxins Producing Fungi Isolated From Some Nuts and Dried Fruits

Eman Alaadin Ramadan Zubair Al-lawand

Ph.D. Thesis

In

Biology / Botany

Supervised By

Professor
Dr. Nadeem Ahmad Ramadan

Professor
Dr. Amjad Abdul-Hadi Mohammed

1444 A.H. **2023 A.D.**

Abstract

The current study aimed to morphological and molecular diagnosis of fungi contaminated eighteen different samples of nuts and dried fruits randomly selected from the markets of the Mosul and Dohuk, cities. With qualitative and quantitative detection of aflatoxin B1 (AFB1) was done by different methods. Also, control on the aflatoxin gene expression used turmeric plant extract and biosynthetic copper oxide nanoparticles.

This study showed the isolation of different genera of contaminated fungi such as *Alternaria sp., Penicillium sp., Aspergillus sp.* (*A. niger, A. flavus, A. fumigatus, A. tamarii, A. aculeatus, A. parasiticus, A. oryzae, A. japonicus*, and *A. ochraceus*) which is a very common fungus associated with food items. It was found that pistachios were the most contaminated with fungus, followed by black raisins, followed by belheisi, taffy raisins, yellow raisins, dried apricots and peanuts with shell. The most common fungi were *A. niger*, followed *A. flavus* and *A. fumigatus* with a frequency of 45.2%, 20.3%, and 13.9%, respectively.

To confirm the phenotypic diagnosis, the molecular diagnosis was made using polymerase chain reaction (PCR) used ITS1 and ITS4 primers. Species of *Aspergillus* fungus were selected and sent to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to showing the phylogenetic locations of the isolated *Aspergillus* strains were identical to the morphological diagnosis. According to these results, the study was able to register them as new seven strains at first time in the gene bank within the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

The results of detection of aflatoxin B1 levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high-performance liquid chromatography (HPLC) in samples of nuts and dried fruits showed that the ELISA method is faster compared to the HPLC method. And also the results of ELISA are more accurate than HPLC technique. Results of the ELISA technique confirmed that all tested samples were positive for Aflatoxin B1 content. The highest level of aflatoxin B1 was 13.64 µg/kg in the dried apricot sample, 13.58 µg/kg in the

peanuts with shell, and 12.90 µg/kg in the sunflower seed sample. The results of HPLC for all samples were positive for aflatoxin content. The highest levels of aflatoxin in the dried apricot sample amounted to 17.40 µg / kg, and for the peanut with shell sample 17.26 µg/kg and 16.95 µg / kg for the sunflower seed sample. All samples contained aflatoxin B1, and were within normal (20 µg/kg) according to the Food and Drug Administration (FDA).

With regard against resistance to aflatoxin-producing fungi, Copper oxide nanoparticles were prepared using aqueous extracts of turmeric plant and are characterized where the results of ultraviolet-visible (UV) spectrophotometry for each of the turmeric plant extract (Tur-extract) and turmeric-copper oxide nanoparticles (Tur-CuO-NPs) through the appearanced of the maximum absorption peak between 229 and 343.5 nm respectively. This indicates the formation of copper oxide nanoparticles. Also, scanning electron microscopy (SEM) showed that the particles were spherical in shape, single or aggregate, with an average size of 80.76 nm. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) analysis of the pure composite of Tur-CuO-NPs, and indicates a highly intense Cu main peak in an excellent and expected mode that corresponds to the standard mode for metallic copper oxide nanoparticles. The X-ray diffraction (XRD) technique determined the crystalline quality of the nanoparticles.

The results indicated the superiority of turmeric-copper oxide nanoparticles (Tur-CuO-NPs) than turmeric plant extract (Tur-extract) when used to fungal growth inhibition with 100% and 46.16% at 80% concentration against *A. flavus* and *A. parasiticus* respectively as compared to carbendazim 50% fungicide which recorded high inhibition value against fungi growth 100% at all concentrations used. One of the distinctive results is the ability of Tur-CuO-NPs and Tur-extract to inhibit the expression of gene responsible for the synthesis of aflatoxin B1 with (0.71, 0.17%) respectively against *Aspergillus flavus*. However, the effect of turmeric-copper oxides nanoparticles on the gene responsible for the synthesis of aflatoxin B1 were more than effected from turmeric plant extract compared with control sample *A. flavus* producing aflatoxin B1.

الخلاصة العربية

هدفت الدراسة الحالية الى التشخيص المظهري والجزيئي للفطريات الملوثة لثمانية عشر عينة أُختيرت عشوائيا من مختلف المكسرات والفواكهه المجففة من الاسواق المحلية لمدينتي الموصل ودهوك. كما قُدر المحتوى النوعي والكمي لسم اللافلاتوكسين B1، وكذلك محاولة التحكم على نشاط الجين المسؤول عن البناء الحيوي للسم بأستخدام الدقائق النانوية لأوكسيد النحاس المصنعة حيوياً من مستخلص نبات الكركم.

وتمكنت الدراسة من تشخيص اجناس مختلفة من الفطريات الملوثة للعينات مثل *Alternaria* sp.، *Penicillium sp.*، و *Aspergillus spp.* (*A. niger*، *A. flavus*، *A.fumigatus*، *A. tamarii*، *A. aculeatus*، *A. parasiticus*، *A. oryzae*، *A. japonicas* و *A. ochraceus*) وهي من الفطريات الشائعة جدًا بتلوث المواد الغذائية. وكان أكثر تلوث فطري هو في عينة الفستق والزبيب الأسود يليه بلح السسي، الزبيب الطيفي، الزبيب الأصفر، المشمش المجفف ثم الفول السوداني بالقشرة. وكانت اكثر الأنواع الفطرية تكراراً هي *A. niger* يليها *A. flavus* و *A. fumigatus* بنسبة ظهور 45.2% و 20.3% و 13.9% على التوالي. بالإضافة إلى التأكيد المظهري، وأكدت نتائج التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction (PCR) ان جميع تسلسلات القواعد النيتروجينية للحمض النووي لسبع عزلات مختارة من أنواع *Aspergillus* والمنتجة للافلاتوكسين B1 عند إرسالها إلى المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية National Center for Biotechnology Information (NCBI) لإظهار مواقع النشوء والتطور لسلالات *Aspergillus* المعزولة كانت اغلبها مطابقة للتشخيص المظهري. واستنادا الى تلك النتائج تمكنت الدراسة من تسجيلها كسلالات جديدة ولاول مرة في بنك الجينات ضمن المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية.

وأعطت نتائج تقدير مستويات الأفلاتوكسين B1 في عينات الدراسة بواسطة تقنية المقايسة الامتصاصية المناعية للانزيم المرتبط The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) وتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High Performance Liquid Chromatography (HPLC) تباينا بينهما بالاعتماد على تباين العينات ونوع التقانة المستخدمة. ومن خلال تقانة ELISA كان أعلى مستوى من الأفلاتوكسين B1 (13.64 ميكروجرام / كجم) لعينة المشمش المجفف ثم (13.58 ميكروجرام / كجم) لعينة الفول السوداني مع القشرة و(12.90 ميكروجرام / كجم) لعينة بذور عباد الشمس. في حين كان أعلى مستوى من الأفلاتوكسين B1 بأستخدام نتائج تقانة HPLC (17.40 ميكروغرام / كغ) في عينة المشمش المجفف يليه (17.26 ميكروغرام / كغ) لعينة الفول السوداني مع القشرة و(16.95 ميكروغرام / كغ) لعينة بذور عباد الشمس. حيث كانت نسبة التلوث بالافلاتوكسين B1 ضمن المعدل الطبيعي المسموح بيه (20 µg/kg) وفقاً لمنظمة ادارة الغذاء والدواء العالمية Food and Drug Administration (FDA).

تم التطرق الى السيطرة على البناء الحيوي للافلاتوكسين B1 من قبل الفطريات المنتجة له، عن طريق التصنيع الحيوي للجسيمات النانوية لأوكسيد النحاس باستخدام المستخلصات المائية ل نبات الكركم.

اظهرت نتائج قياس الطيف المرئي فوق البنفسجي Ultraviolet-visible (UV) لكل من مستخلص نبات الكركم وجسيمات أوكسيد النحاس النانوية من خلال ظهور أقصى ذروة امتصاص بين (229 و 343.5) نانومتر على التوالي، وهذا يدل على تكوين جزيئات أوكسيد النحاس النانوية. كما أظهرت نتائج الفحص المجهري الإلكتروني Scanning electron microscopy (SEM) أن الجسيمات كانت كروية الشكل مفردة أو مجمعة بمعدل قطر بلغ 80.76 نانومتر. وتبين من خلال التحليل الطيفي للأشعة السينية المشتتة للطاقة من توليف نقي من Tur-CuO-NPs إلى ذروة رئيسية مكثفة للغاية للنحاس في وضع ممتاز ومتوافق مع الوضع القياسي لجسيمات أوكسيد النحاس النانوية المعدنية. وحددت تقنية(XRD) X- ray diffraction الجودة البلورية للجسيمات النانوية.

وأشارت نتائج السيطرة على نمو الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 إلى تفوق الجسيمات النانوية لأكاسيد النحاس النانوية (Tur-CuO-NPs) على مستخلص نبات الكركم (Tur-extract)، حيث كانت نسبة تثبيط النمو على الفطريات المنتجة للافلاتوكسين B1 *A. flavus* و *A. parasiticus* هي 100% و 46.16% على التوالي مقارنة مع تأثير المبيد الفطري كاربيندازيم 50% بنسبة تثبيط عالية تصل الى 100% في جميع التراكيز المستخدمة، وكذلك بالمقارنة مع العزلة القياسية (هي عزلة *A. flavus* النامية على الوسط الزرعي). وبينت النتائج قدرة الجسيمات النانوية لأكاسيد النحاس النانوية (Tur-CuO-NPs) و مستخلص نبات الكركم (Tur-extract) على تثبيط الجين المسؤول عن انتاج او تخليق الأفلاتوكسين B1 من خلال قياس نسبة التعبير الجيني للجين المسؤول عن تخليف الافلاتوكسين B1 اذ بلغ (0.17 ، 0.71 %) على التوالي. بذلك فإن تأثير جزيئات أكاسيد النحاس النانوية على الجين المسؤول عن تخليق الأفلاتوكسين B1 كان أكثر تأثيراً من مستخلص نبات الكركم و بالمقارنة مع العزلة القياسية *A. flavus* المنتجة للأفلاتوكسين B1.

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الموصل / كلية العلوم

قسم علوم الحياة

التصنيع الحيوي للدقائق النانوية لأوكسيد النحاس من نبات الكركم (*Curcuma longa*) وتأثيرها في الفطريات المنتجة للافلاتوكسينات المعزولة من بعض المكسرات والفواكه المجففة

إيمان علاء الدين رمضان زبير اللأوند

اطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم النبات

باشراف

الأستاذ	الأستاذ
الدكتور نديم احمد رمضان	الدكتور امجد عبد الهادي محمد

1444هـ 2023م