

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية العلوم
قسم علوم الحياه

عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبذور الباقلاء المخزونة والكشف عن قابليتها على انتاج الافلاتو كسينات

بحث مقدم الى

كلية العلوم – قسم علوم الحياه

كجزء من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس

علوم – علوم حياه

من قبل الطالبة : - زينب حامد عبد السادة

بأشراف الدكتور

علي عبد الهادي ماهود

1437-1438 هجري / 2016-2017 ميلادي

((بسم الله الرحمن الرحيم))

((قل هل يستوي الذين يعلمون والذين لا يعلمون))

((صدق الله العظيم))

سوره الزمر (الایه ۹)

الاهداء :-

الى انسي عند وحدتي ودليلي عند شدتي من لم يلد ولم يولد ولم
يكن له كفؤا احد .

الى اعلام الله في ارضة وحججه على عبادة محمد وال محمد
((صل الله عليه واله وسلم))

الى نبع المحبة والحنان وحضن الامان من تزال بجنبها آهاتي
وتطيب نفسي وتحلو حياتي -----

الى من اوصلتني الى ما انا عليه الان (العزيزة الغالية والدتي)

الى من هم اغلى علي من نفسي (اخوتي واخواتي) وكل من احبني
وساعدني

اهدي اليهم ثمرة جهدي المتواضع-----

الشكر والتقدير :

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين واله الطيبين
الطاهرين

بعد الانتهاء من اعداد هذا البحث لا يسعني الا ان اتقدم بجزيل الشكر الى
أستاذي الفاضل

الدكتور : **علي عبد الهادي ماهود**

الذي تفضل بالأشراف على هذا البحث حيث قدم لي كل النصح والارشاد
طيلة فترة الاعداد

فله مني كل الشكر والتقدير

كما لا يفوتني ان اتقدم بجزيل الشكر لكل من ساهم معي وساعدني على
انجاز هذا البحث ليكون على اكمل وجه -----

مع خالص الود والمحبة

الباحث

الخلاصة :

شملت هذه الدراسة عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبذور الباقلاء المخزونة في الاسواق المحلية في مدينة الديوانية وكذلك الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج السموم الفطرية (الافلاتوكسينات) واطهرت النتائج عزل عدة انواع من الفطريات المرافقة لبذور الباقلاء وتم تشخيص ستة انواع منها وبنسب تردد مختلفة وهذه الانواع هي :

(As pergillus niger , A. flavus, Rhizopus stolonifer , pen cillium notatum , Alternaria alternata , Fusarium solani)

اذ وجد ان النسب المئوية لتردد الفطر (As pergillus niger) هي الاعلى في معاملة البذور غير المعقمة سطحيا بالمقارنة مع الفطريات الاخرى اذ بلغت نسبه 33.65% اما الفطر (A. flavus) فكانت النسبة المئوية لتردده هي الاعلى في معاملة البذور المعقمة سطحيا اذ بلغت 38.9% .

كما بينت النتائج قدرة الفطر (A. flavus) على وسط (P. D. A) و (C.E.A) على انتاج الافلاتوكسينات بصورة عالية

اما بالنسبة للفطر (P. notatum) فوجد ان له القدرة على انتاج الافلاتوكسينات بصورة معتدلة على وسط (C.E.A)

المقدمة :

يتعرض الانسان والحيوان على حد سواء لمخاطر السموم الفطرية ويعد الغذاء طريق رئيسي لذلك , ولم يكن النمو الفطري مشكلة صحية حتى اكتشفت السموم الفطرية (myco toxins) حيث اصبحت الفطريات في الغذاء تمثل خطرا كبيرا يهدد صحة المستهلك لما يسببه من مخاطر صحية تؤدي الى حدوث مضاعفات صحية خطيره (werny et al . 2004) .

ان السموم الفطرية تنتجها مجموعه من الفطريات وهي عبارة عن مركبات ايضية ثانوية (se con dary meta bolites) نشطة بايولوجياً

وهي سموم يخلو تركيبها الجزيئي من المكونات التي تدفع الجسم لتكوين اجسام مضادة لها واغلبها سام للإنسان والحيوان والنبات ويطلق على عمليات التسمم الناتجة عنها التسمم الفطري ((My cotxicosis)) (Taem , 1989)

تصل السموم الفطرية الى طعام الانسان والحيوان اما بصورة مباشرة عن طريق تلوث الغذاء بالفطريات المنتجة لهدم السموم حيث تشجع المادة الغذائية نمو الفطر سواء اثناء مراحل الانتاج المختلفة او اثناء نقلها او في فترة التخزين او قد يكون التلوث غير مباشر نتيجة تلوث مكونات المادة الغذائية بالسم الفطري ويكون ذلك بتغذية الانسان على منتجات حيوانية ناتجة من حيوانات سبق تغذيتها على اعلاف ملوثة بالسموم الفطرية وهو الاكثر خطورة ويمكن ان تنتج هذه السموم في الحقل قبل الحصاد او اثناء التخزين ونتيجة لنمو الفطريات فيها تقوم بعمليات التمثيل الغذائي وتنتج السموم الفطرية حيث يزداد معدل نموها بتوفير ظروف البيئة المناسبة مثل الرطوبة والحرارة وظروف التخزين الرديئة وكذلك حدوث اضرار ميكانيكية عند جنين المحصول او عند نقلها من مكان الى اخر (Fung ,2008)

ويوجد العديد من الاجناس الفطرية مثل .

(Alternaria sp , pencilium sp ,Aspergillus sp,Fusarium sp)

وغيرها من الفطريات التي لها القدرة على افراز سموم فطرية مختلفة ويعد فطر (Aspergillus sp) من اهم الفطريات اذ تنتج بعض أنواعه مثل (A. niger) وفطر (A. flavus) سموم فطرية وهي الافلاتوكسينات (Aflatoxines) والتي لها تأثيرات مرضية مسرطنة والقابلية على تحطيم الانسجة المختلفة وخصوصا الكبد وال كلية (Mori et al . 1998) وبالنظر لما تسببه السموم الفطرية من مخاطر عند وجودها في الاغذية فقد تم القيام بهذا البحث والذي يهدف الى عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبذور ألباقلاء المخزونة والتعرف علا مدى قابليتها على انتاج السموم الفطرية الافلاتوكسينات مختبريا .

وقد شملت خطة البحث ما يلي :-

1- جمع بذور ألباقلاء المخزونة من الاسواق المحلية وعزل وتشخيص الفطريات المرافقة لها على الوسط الغذائي .

(P.D.A) (Poteto Dextrose Agar)

2- الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج الافلاتوكسينات مختبريا على

الوسط الغذائي (P.D.A)

والوسط الغذائي (C.E.A) (Cocount Extract Agar)

اكار مستخلص جوز الهند

المواد وطرق العمل :-

جمع بذور ألباقلاء :-

تم جمع بذور ألباقلاء المستخدمة في هذا البحث من الاسواق المحلية اذ تم جمع ثلاث عينات عشوائية بواقع واحد كيلو غرام .

تحضير الاوساط الزرعية :

1 – وسط (P.D.A)

حضر هذا الوسط حسب مواصفات الشركة المصنعة بإذابة 39 غرام منه في 1000 مل من الماء المقطر في دورق زجاجي وضبط الاس الهيدروجيني عند 6.8 بعدها عقم الوسط بالوحدة بدرجة حرارة 121 م وبضغط 15 باوند \ نج ٢ لمدة 20 دقيقة

2- وسط (C.E.A)

حضر وسط اكار مستخلص جوز الهند وذلك بأخذ 100غم من جوز الهند المبروش والمتوفر تجاريا في الاسواق واطف اليه 300 مل من الماء المقطر ثم سخن المزيج لمدة 20 دقيقة وبعدها رشح بواسطة قطعة من الشاش ثم اضيف للراشح 1.5% اكار واكمل الحجم الى 300 مل باستخدام الماء المقطر وعقم بنفس ظروف التعقيم المذكورة سابقا

((Dianese & Lin , 1976))

عزل الفطريات المرافقة لبذور ألباقلاء :-

قسمت البذور الى مجموعتين الاولى عقت سطحيا باستخدام هايبيوكلورات الصوديوم بتركيز 1% لمدة ثلاث ايام ثم غسلت بماء مقطر ثلاث مرات وجففت .

اما المجموعة الثانية فتضمنت بذور غسلت بماء مقطر معقم فقط وجففت . بعدها زرعت البذور في اطباق بتري حاوية على وسط غذائي (P.D.A) بواقع خمس بذور في كل طبق وبثلاث مكررات ودخنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 25م لمدة ثلاث الى اربع ايام , ومن ثم متابعة نمو الفطريات .

اذ فحصت الاطباق لمعرفة الفطريات النامية وبعد تشخيصها تم حساب المئوية لتردها من خلال المعادلة الاتية :-

$$\text{النسبة المئوية لتردد الفطر} = \frac{\text{عدد مستعمرات النوع الفطري}}{\text{العدد الكلي لمستعمرات الانواع الفطرية}} \times 100X$$

ومن ثم تم تنقية هذه العزلات على وسط غذائي (P.D.A)

تشخيص الفطريات المعزولة :-

بعد عملية عزل الفطريات المرافقة لبذور ألباقلاء جرت عملية تشخيصها الى مستوى النوع وذلك اعتمادا على المظهر الخارجي للمستعمرة مثل الشكل واللون وقطر المستعمرة وارتفاعها وايضا اعتمادا على الصفات المجهرية مثل شكل وحجم ولون وتركيب الحوامل والابواغ وفق الاسس التصنيفية المعتمدة الواردة في :-

(Barnett & Hunter ,1972, Domsch et al , 1980,

Moustafa,1982,mou basher & AL-subai,1987)

الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج الافلاتوكسينات مختبريا .

استخدمت في هذه الطريقة نوعين من الاوساط الغذائية (C.E.A ,P.D.A) لمعرفة مدى قابلية الفطريات على انتاج الافلاتوكسينات اذ تم تحضير اطباق حاوية على الاوساط الغذائية المذكورة اعلاه بعد تعقيمها بالموصدة ثم تم تلقيح الاوساط بالمستعمرات الفطرية من خلال نقل جزء من المستعمرة الى كل طبق باستخدام ناقل معقم بعد ذلك حضنت الاطباق الملقحة بالحاضنة بدرجة حرارة 25م لمدة تتراوح بين(4-7) ايام , ثم اخرجت الاطباق وقلبت رأسا على عقب ثم اضيف في وسط كل غطاء من الاطباق محلول الامونيا بتركيز 25% بواقع 0.2 مل لكل غطاء ثم اعيدت الى الحاضنة لمدة (4-7) بدرجة حرارة 25م وبثلاث مكررات لكل فطر . اما اطباق معاملة المقارنة فتركت من غير اي اضافة وتم مراقبة الاطباق خلال هذه الفترة لملاحظة تغيير لون قواعدها فاذا تغير لون قاعدة المستعمرة الى اللون الاحمر الوردي او الاصفر البرتقالي بدرجة لونية مختلفة فأن ذلك يدل على ان الفطر له القابلية على انتاج الافلاتوكسينات (Saito & Mmchida , 1999)

التحليل الإحصائي :-

لتحديد الفروق المعنوية عند مستوى اكمال 5% ثم اختبار الفروق بين المتوسطات بواسطة اختبار دنكن متعدد الحدود .

((الراوي وخلف الله , 2000))

النتائج والمناقشة :

عزل وتشخيص الفطريات

تم عزل عدة انواع من الفطريات المرافقة لبذور ألباقلاء المخزونة في الاسواق المحلية وتم تشخيص ستة انواع منها وهذه الانواع هي :-

(Aspergillus niger , A . flavus , Rhizopus stolonifer,
Pencillium notatum,Alternaria alternate, Fusarium solani)

وتبين من النتائج في الجدول (1) وجود بعض الفروق المعنوية في النسب المئوية لتردد الفطريات التي تم تشخيصها في معاملي البذور الغير معقمة سطحيا والمعقمة سطحيا اذ وجد ان النسبة المئوية لتردد الفطر (Aspergillus niger) هي الاعلى في معاملة البذور الغير معقمة سطحيا بالمقارنة مع الفطريات الاخرى اذ بلغت 33.65% وهذا يتفق مع ما وجدته (Asevdo et al , 1994) في ان الفطر المذكور (A.niger) من الفطريات المعزولة من البذور بنسب عالية . اما الفطر (Aspergillus flavus) فكانت النسبة المئوية لتردده هي الاعلى في معاملة البذور المعقمة سطحيا بالمقارنة مع الفطريات المعزولة الاخرى اذ بلغت 38.9% كما وجد ان النسبة المئوية لتردد الفطر (Rhizopus stoloifer) وقد بلغت 22.06 % في معاملة البذور الغير معقمة سطحيا وأختفى هذا الفطر في معاملة البذور المعقمة سطحيا ويعزى السبب الى كون الفطر من الفطريات

المحمولة على الغلاف الخارجي للبذور التي لا ترافق البذور من الداخل والتي لا تصيب جنين البذرة .

الجدول (1) النسب المئوية لتردد الفطريات في بذور ألباقلاء .

نسبة تردد الفطريات (%)		الفطريات المعزولة
بذور باقلاء معقمة سطحيا	بذور باقلاء غير معقمة سطحيا	
28.12 b	% 33.65 a	<u>A.niger</u>
38.90 a	% 16.33 c	<u>A. flavus</u>
	22.06 b	<u>Rh.stolonifer</u>
8.33 d	11.53 d	<u>P.notatum</u>
18.85 c	11.53 d	<u>Al.alternata</u>
6.14 e	4.85 e	<u>F.solani</u>

. تمثل النتائج الموضحة في الجدول معدل ثلاث مكررات

. المعدلات التي تحمل نفس الحرف لا تختلف معنويا في ما بينها للمقارنات العمودية

حسب اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمال 5%

الكشف عن قابلية الفطريات المعزولة على انتاج الافلاتو كسينات مختبريا .

تم اختيار قابلية الفطريات المعزولة من بذور ألباقلاء على انتاج السموم الفطرية الافلاتوكسينات اذ استخدم محلول الامونيا 25% باعتباره كاشف عن هذه القابلية اذ بمجرد ملامسته سطح الفطرية لبخار الامونيا فأن تغير لون قاعدتها الى الاحمر الوردي أو الاصفر البرتقالي وبدرجة متباينة اعتمادا على كمية الافلاتوكسين المنتج دليل على قابلية الفطر على انتاج هذه السموم (Sato & Machida , 1999)

وتبين من النتائج الموضحة في الجدول (2) قدرة الفطر (A . flavus) على وسط (C.E.A , P.D.A) على انتاج الافلاتوكسينات بصورة عالية اذ اصبح اللون احمر وردي غامق واصفر برتقالي غامق على التوالي عند تنمية الفطر

اما بالنسبة للفطر (P.notatum) فوجد له القدرة على انتاج الافلاتوكسينات بصورة معتدلة على وسط (C.E.A)

ويعزى سبب اختلاف قدرة الفطريات في انتاج الفلاتوكسينات حسب الاوساط المستخدمة اي طبيعة المواد التي يتكون منها الوسط التي تساعد على انتاج الفلاتوكسين .

وهذه النتائج تتفق مع ما وجده عبود(2006)الذي درس تأثير الاوساط الغذائية المختلفة على قابلية الفطر على انتاج الفلاتوكسينات ووجد ان فقط الفطريات التي لها القدرة على انتاج الفلاتوكسينات اعطت كشف موجب ودرجات متفاوتة عند استخدام وسط (C.E.A., P.D.A)

اما العزلات التي اعطت كشف سالب في انتاج الافلاتوكسينات قد يكون السبب الى تأين مكونات الوسط الغذائي او يعود لعدم قدرتها على انتاج مثل هذه المواد او انها تنتجها بكميات ضئيلة جدا لذا يجب استخدام طرق اكثر حساسية .

جدول رقم (2) الكشف عن قابلي الفطريات على انتاج الافلاتوكسينات مختبريا :

C.E.A	P.D.A	نوع الوسط
		الانواع الفطرية
*	*	<u>A .niger</u>
***	+++	<u>A .flavus</u>
—	—	<u>Rhi . stoloni fer</u>
**	—	<u>P.notatum</u>
*	*	<u>AL.alternata</u>
*	—	<u>F. solani</u>

قابلية الفطر على انتاج الافلاتوكسينات قليلة

+ احمر وردي فاتح

* اصفر برتقالي فاتح

قابلية الفطر على انتاج الافلاتوكسينات معتدلة

++ احمر وردي معتدل

** اصفر برتقالي معتدل

قابلية الفطر على انتاج الافلاتوكسينات عالية

+++ احمر وردي غامق

*** اصفر برتقالي غامق

عدم قابلية الفطر على انتاج الافلاتوكسينات

—

المصادر:-

1- عبود , ميثاق ستار . (2006) دراسة بعض الجوانب البايولوجية للفطريات والخمائر الانتهازية المعزولة في عينات سريرية من مستشفى الناصرية العام – محافظة ذي قار – رسالة ماجستير/ كلية التربية / جامعة | ذي قار .

2- الراوي, خاشع محمود , خلف الله , عبد العزيز محمد (2000) تصميم وتحليل التجارب الزراعية . الطبعة الثانية . دار الكتب للطباعة والنشر. جامعة الموصل .

3- Asevedo, I .G.; Gambale ,W.; Correa,B.; Paula, C.R.; Almeida, R.M.& Souza , V.M.(1990).mycoflora and afltoxicogenic species of Aspergillus Spp. Isoiated from stores maize . Revista microbiologia., 25: 46-50

4- Barnett, H. L. & Huuter , B .B (1972). Illustrated of imperfect fung . Burgess publ . co ., Minnesota .

ed 3rd

5- Dianese , J.C & LIN ,M.T (1976). Acoconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by Aspergillus spp . phytopathology . , 66 :1416- 1418.

6- Domsch , K. H. ; Gams , W . & Anderson , T.H(1980) compendium of soil fungi . Academic prees . , London , NEW york , Toronto , Sydney , San Francisco , VOL . 1.

7- Fung , F.R.(2008) Heaith effects of mycotoxins : atoxicological over view Toxicol . Clin-42:217-234.

8- Mori , T. ; Yamada , K . ; Irie, S .; Ochimi, K . ; cuda ,k. ;ogyri T. and Ichinoe, M. (1989) . Systemic aspergillosis caused by an aflatoxin producing strain A . flavus . *Mycol – 36*: 107- 112.

9- Moubasher , A. H. & Al-subai, a. t. (1987) Soil fungi in state of Qatar university of Qatar

10- Moustafa , A.F. (1982). Taxonomic studies on the fungi of Kuwait . *Aspergilli. J. Uni. Kuwait (sci).*, 9..245-260.

11- Saito , M & Machida ,s .(1999) . A rapid identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus* and *Flavus* and *A. parasiticus* by Ammonia Vapor . *Mycoscience* ., 40:205-208.

12- Taem, R. (1998). General aspects of mycotoxin In : Hodogaix, Malsumoto . M. (eds). *Mycotoxin*.

13 -Werny J.H; Phillips ,T.D . ; Jack ,P.E . ; Ctiles ,J.K. ; Jone G.M.,D.(2004).Human aflatoxicosis in developing countries . a review of toxicology , exposure , potential health consequences and interventions. *Am . J. Clin Nutr* .80 .. 1106-1122