

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة الفطر *Aspergillus Niger* المعزول من بذور فستق

الحقل

مقدم من قبل الطالب

وانث زیدان جابر

اشرافه

الأستاذ م.م. كريم خافل مصبح

الإهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

(قل اعملوا فسيري الله عملكم ورسوله والمؤمنون)

صدق الله العظيم

إلى من بلغ الرسالة وأدى الأمانة .. ونصح الأمة .. إلى نبي الرحمة
ونور العالمين

"سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم"

إلى من كلفه الله بالهبة والوقار .. إلى من علمني العطاء بدون
انتظار .. إلى من أحمل اسمه بكل افتخار .. أرجو من الله أن يمد في
عمرك لتري ثماراً قد حان قطافها بعد طول انتظار وستبقى كلماتك
نجوم أهدني بها اليوم وفي الغد وإلى الأبد ..

والذي العزيز

إلى ملاكي في الحياة .. إلى معني الحب وإلى معني العنان والتفاني
.. إلى بسم الحياة وسر الوجود إلى من كان دعائها سر نجاحي
وحنانها بلسم جراحي إلى أختي الحبايب

أمي الحبيبة

إلى من عرفت كيف أجدهم وعلموني أن لا أضيعهم ... أصدقائي

شكر...

أقدم بشكري الجزيل الى كل من وقفه معي في انجاز هذا
العمل

المتواضع، بداية بالأستاذ الموقر المشرف م.م "كريم خافل مهيج"
الذي تحمل عناء الاشراف والتوجيه لمسار هذه الدراسة....

وإلى كل من والدي الكريمين....

إلى اخوتي....

إلى أصدقائي....

وكل من ساهم في مساعدتي من قريب أو من بعيد

الخلاصة:

اجريت الدراسة في مختبرات مستشفى عقك العام والتي تناولت دراسة الفطر *Aspergillus niger* المعزول من بذور فستق الحقل على وسط صلب ,اثبتت نتائج هذه الدراسة ان لمستويات الرقم الهيدروجيني (pH) المختبرة في وسط زرعي سائل تأثيرا على نمو الفطر اذ ظهرت اعلى نمو للفطر *A.niger* (تم قياسه بجهاز PHmetar) عند الأس الهيدروجيني (6) اذ بلغت الكتلة الحيوية الجافه (0.35) وكان النمو 0.27 في حين لم يحدث اي نمو عند الأس الهيدروجين (3) بينت نتائج هذا الاختبار قدرت الفطر على النمو في المديات المختلفة من درجات الحرارة مع وجود اختلاف في كمية النمو اذ أظهر اعلى نمو عند درجة حراره 30م اذ بلغ 1.36غم في حين كان النمو في درجة الحرارة 20م و40م هي 0.23 غم و 0.28 غم كما تشير النتائج للفطر موضع الدراسة على النمو عند تراكيز الملح المختبرة ولكن بكميات مختلفة حيث ان نمو الفطر يزداد بزيادة تركيز الملح اذا كان اعلا نمو للفطر *A.niger* عند التركيز 30غم/لتر اذ بلغ 0.39 غم في حين كانت كمية النمو عند التركيزين (20,10) غم/لتر(0.16,0.14) غم وبينت النتائج على قدرة الفطر موضع الدراسة على النمو في اوساط زراعية مختلفة من حيث التركيب الكيميائي ولكن كثافة النمو تختلف من وسط الى اخر اذ يعتبر وسط PDB وسط ملائم لنمو الفطر *A.niger* حيث سجل اعلى كمية للنمو اذ بلغت 1.48غم في حين كان النمو على الوسطين (NB وYEP) على التوالي للفطر 0.33 و 0.18 غم .

المقدمة:

الفسق نوع من المكسرات التي تعطي كمية كبيرة من السعرات الحرارية مثلها مثل اي نوع اخر من الكسرات نسبة الدهون فيها و يميز ثمرة الفسق أنها تحتوي على نسبة عالية من الأحماض الدهنية الاحادية غير المشبعة وهي بهذه الصفة تتفوق على بقية المكسرات الاخرى حيث يزيد عن 70% من الدهون (الزيوت) الكلية في الثمرة. كما ان الفسق يمتاز بارتفاع نسبة الحديد فيه وكذلك الكالسيوم والمغنسيوم والفسفور مقارنة بالمكسرات الأخرى، و تعتبر ثمار الفسق مصدرا " هاما" للفيتامينات مثل A1 وb1 وb2 وتحتوى البذور على زيت ثابت وبروتين وفيتامينات وفوسفور، ويدخل فى صناعة الحلوى، وتعصر البذور بدون تسخين فينتج الزيت حيث يستخدم بدلا من زيت الزيتون في صناعة المستحضرات الطبية مثل المراهم (El-gendy واخرون, 2003) . ويواجه الفسق مشاكل كثيرة اثناء الجني وبعد التسخين ونقله ومن أهم تلك المشاكل الإصابة بالفطريات اذ يعد الفطر *Aspergillus* من اهم الفطريات المعروفة بتأثيرها على العديد من المحاصيل الزراعية ومن ضمنها الفواكه والخضار وذلك لقدرتها على أنتاج مواد أيضا ثانوية ذات تأثيرات سامة ومسرطنة للإنسان والحيوان تدعى السموم الفطرية *Mycotoxins* وتشير معظم الدراسات إلى إن لهذه الفطريات القدرة على إنتاج أكثر من نوع من هذه السموم اثناء نموها (Abdel Hafez ,1981). فطر *Aspergillus* ينتج سموم *Aflatoxins* والمعروفة بقدرتها على إحداث أمراض كثيرة للإنسان والحيوان كسرطان الكبد وتورمات الأجهزة التناسلية والإجهاض والنزف الدموي. وعلى الرغم من النتائج السريعة والفعالة التي يمكن الحصول عليها نتيجة استخدام المبيدات الكيماوية في مكافحة الأمراض الفطرية إلا إن التوسع في استخدامها قد أدى إلى الإخلال بالتوازن البيئي مما ترتب عليه ظهور أمراض لم تكن معروفة سابقا وان بقايا الكثير منها يكون ساما للإنسان والحيوان لذا

برزت أهمية إعادة التوازن الحيوي بين الكائنات الدقيقة وتنشيط مجموعة كائنات حية (نبات , احياء مجهرية) بشكل عام أو خاص ضد مسبب واحد أو أكثر من مسببات الأمراض بما يعرف بالمقاومة الحيوية Biological Control ويرى اغلب الباحثين إن المبيدات الإحيائية والمستخلصات النباتية لا تقل كفاءة عن المبيدات الفطرية . وبالنظر لعدم توفر المواصفات المطلوبة لعملية الجني والنقل وعملية الخزن للفتق في مخازن ذات مواصفات فنية تؤمن عدم إصابة المحصول بالفطريات أجريت هذه الدراسة التي تهدف الى:

1- عزل وتشخيص الفطريات من بذور فتق الحقل.

2- دراسة تأثير كل من درجة الحرارة ودرجة الحموضة والملوحة في نمو الفطريات التي تظهر أعلى تردد في إصابة بذور الفتق.

المواد وطرق العمل:

1- عينات بذور فتق الحقل : جُلبت بذور فتق الحقل من محلات بيع الكرزات من اسواق محافظة الديوانية حيث تم انتقاء بذور الفتق من بين 7 عينات من الكرزات غير المملحة وبوزن 200 غم للعينة الواحدة .

2- تحضير الاوساط الزراعية

2-1: وسط اكار مستخلص البطاطا والدكستروز

تم تحضير الوسط وذلك بأخذ 200غم من البطاطا بعد غسلها وتقطيعها الى قطع صغيرة تم وضعها في اناء معدني ثم اضيف اليها لتر ماء مقطر وغلبيت لمدة 30 دقيقة وبعدها رشحت بوساطة قطعة شاش نظيفة واضيف الى الراشح 20غم/لتر من سكر الدكستروز ونفس الكمية من الاكار, وعقم الوسط بجهاز Autoclave لمدة 20دقيقة وحرارة 121م وتحت ضغط 1جو.

2-2: وسط مستخلص البطاطا والدكستروز

حضر بنفس الطريقة السابقة ولكن بدون اضافة الاكار الى الراشح.

2-3: وسط مستخلص الخميرة

تم تحضير الوسط حسب طريقة Baink واخرون (1982) وذلك بأخذ 25غم من الوسط و اضافتها لكل 1000مل من الماء المقطر وعقم الوسط بالأسلوب نفسه في الفقرة السابقة .

2-4: وسط المرق المغذي: حضر حسب تعليمات الشركة المصنعة Himedia ذات المنشأة India وعقم الوسط بالأسلوب نفسه في الفقرة السابقة.

3- عزل الفطر *A.niger* من بذور فستق الحقل وتشخيصها : تم جلب عينات فستق الحقل وعقمت البذور للمحصول سطحيا بمحلول هايبيوكلوريت الصوديوم وبتركيز 2% ولمدة خمسة دقائق وغسلت بعدها بماء معقم ثم زرعت في اطباق بتري معقمة وحاوية على أكار البطاطا والدكستروز PDA مع اضافة 40 ملغ/لتر الامبيسيلين وذلك لمنع نمو البكتريا ،حيث وضعت خمسة بذور في كل طبق اربعة محيطية والخامسة في منتصف الطبق حضنت الاطباق بدرجة حراره 25 ± 2 م ولمدة سبعة ايام (Bullerman, 1981) بعد انتهاء مدة التحضين تم تنقية عزلات الفطر وذلك بنقل قرص من كل مستعمره باستخدام الناقب الفليني .على وسط PDA في طبق جديد وكررت العملية عدة مرات , شخصت عزلات الفطر اعتمادا" على الصفات التصنيفية التي وضعها (Ciegler, 1981) بعد انتهاء مدة الحضان تم حساب النسبة المئوية لظهور الفطر من خلال المعادلة التالية:-

عدد العينات التي ضهر فيها الفطر

$$\text{النسبة المئوية لظهور الفطر} = \frac{\text{عدد العينات الكلية}}{100} \times 100$$

عدد العينات الكلية

(1976,Anderegg)

3-1: حفظ عزلات الفطر المعزولة والمشخصة : نميت العزلات المشخصة في أنابيب حاوية كل منها على وسط PDA وبصورة مائلة وحضنت بدرجة حرارة 25 م° ولمدة سبعة ايام ثم حفظت في الثلاجة بدرجة 4 م° لحين استخدامها في التجارب اللاحقة.

3-2: أهمية الرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *A.niger*:

حضر الوسط PDA ثم وزرع الوسط على 18دورق حجم 250مل وبمعدل 100مل لكل دورق بعدها تم تعديل الرقم الهيدروجيني لستة دوارق منها الى رقم pH3 والستة الاخرى الرقم pH6 والستة الأخيرة الى الرقم pH9 بواسطة نترات الأمونيا NH4 وبعدها لقت الدوارق بأقراص قطرها 5 ملم من PDA المنمي عليه الفطر , هكذا لبقية المجموعات ثم حضنت بدرجة حرارة 25م° لمدة اسبوعين بعدها تم استخراج الغزل الفطري من كل دورق ولكل رقم هيدروجيني بواسطة ملقط معقم و وضعت على ورق ترشيح (Whatman No.4) ومن ثم تم غسلها بالماء المقطر لإزالة العوالق منها بعدها جففت بالفرن الكهربائي بدرجة حرارة 70م° لمدة 24 ساعة ثم وزنت بميزان حساس.

3-3: تأثير التراكيز المختلفة من ملح NaCl على نمو الفطر:

حضر الوسط PDA وزرع الوسط على 18دورق حجم 250مل وبمعدل 100مل لكل دورق وبعدها تم اضافة التركيز 3غم/لتر من الملح (Nacl) لستة دوارق منها والستة الأخرى بتركيز 5غم/لتر والستة الأخيرة وبتركيز 7 غم/لتر وبعدها لقت بأقراص قطرها 5 ملم من PDA المنمي عليه الفطر , وهكذا كررت العملية مع

باقي المجموعات ثم حضنت بدرجة 25 م° ولمدة اسبوعين بعدها تم استخراج الغزل الفطري من كل دورق وبنفس الطريقة الوارد بالفقرة 2-3.

النتائج والمناقشة

1- الفطريات المعزولة من بذور فستق الحقل:

تم عزل نوع واحد تابع للجنس *Aspergillus* و تم الحصول على (7) عزلة من الفطر *A.niger* وبتردد بلغ 73.2% كونه يعتبر الفطريات الرمية ذات الانتشار الواسع في الترب المختلفة (2001,Abd-AL Hussain) حيث له القدرة على تحمل الجفاف ومدى واسع من الشد الرطوبي وهذا ما أكدته دراسة Abdel-Sater و Al-bader (2001) اذ تمكن Imshenetskii واخرون (1983) من عزل كونيديات الفطر حتى من طبقة Mesospher الميزوسفير التي تصل فيها درجات الحرارة إلى حد الانجماد فضلا عن ذلك فقد وجد أن لأبواغ الفطر A. Niger القدرة على تحمل درجات الحرارة المرتفعة تصل الى 50 م° (Baink واخرون, 1982), وفي دراسة لـ (Abdel Hafez - 1981) حول الفطريات المتحملة للملوحة في الترب الصحراوية وجد ان اكثر الاجناس تحملا كانت منها *Aspergillus* مما يدل على قدرته على تحمل الجفاف وقدرة على النمو في الترب الفقيرة بالمادة العضوية .

2-اهمية الرقم الهيدروجيني في نمو الفطر *A.niger*

ان الرقم الهيدروجيني يلعب دور مهم في نمو الكائنات الحية المجهرية ومنها
الفطريات حيث وجد ان معظم الفطريات تنمو بمدى من الرقم الهيدروجيني يتراوح
بين 3-9 في حين الرقم الهيدروجيني الامثل ينحصر بين pH6-pH5 ، يؤثر
الأس الهيدروجيني كثيرا في عملية نفاذية الايونات عبر الغشاء الخلوي للكائنات
الحية ومنها الفطريات حيث اوضحت نتائج الابحاث العلمية ان افضل حالة لنفاذية
الايونات الموجبة والسالبة عبر الغشاء البلازمي للفطريات يحدث عند الرقم
الهيدروجيني الواقع بين (5.5-6) اما اذا زاد الأس الهيدروجيني عن هذا
المستوى فتحدث زيادة في نفاذية الايونات الموجبة على حساب كمية الايونات
السالبة والعكس صحيح مما يخلق حالة من عدم التوازن في كميات الايونات النافذة
عبر الغشاء الخلوي وبالتالي ضعف نمو الفطر كما ان الأس الهيدروجيني يؤثر
على جاهزية العناصر المعدنية التي يحتاجها الفطر حيث ان الفطريات تستغل
العناصر المعدنية بصورتها الايونية وهذه الصورة تتوفر عندما يكون الأس
الهيدروجيني دون 7 اما اذا كان الرقم الهيدروجيني اكبر من ذلك فتشكل العناصر
المعدنية معقدات مع مركبات اخرى وبالتالي لا تكون جاهزة للفطر كعناصر
المغنيسيوم والكارصين والفسفور.

الجدول(1) تأثير الرقم الهيدروجيني في معدل وزن الغزل الفطري(غم) للفطر عند

قيم pH المختلفة على وسط P.D.B

المعدل لمستوى pH	معدل الوزن الجاف (غم) للفطر	الرقم الهيدروجيني
	A.niger	
0	0	3
0.27	0.35	6
0.29	0.21	9
	0.18	المعدل لنوع الفطر

3- تأثير درجات الحرارة المختلفة على نمو الفطر

بينت نتائج هذا الاختبار قدرة الفطر على النمو في المديات المختلفة من درجات الحرارة مع وجود اختلاف في كمية النمو اذ ظهر اعلى نمو للفطر عند درجة الحرارة 30 م° اذ بلغ 1.36 غم في حين كانت كثافة النمو للفطر عند درجة الحرارة 20 م° ودرجة 40 م° هي 0.23 و0.28 غم على التوالي . وهذه النتائج

تتفق مع العديد من الدراسات التي اكدت على قدرة الفطر موضع الدراسة على النمو في مديات مختلفة من درجات الحرارة. وقدرة الفطر *Aspergillus* على تحمل درجات الحرارة العالية 30-40 م° ومستويات مختلفة من الرطوبة (Ciegler, 1981).

الجدول (2) تأثير درجات الحرارة المختلفة في معدل وزن الغزل الفطري (غم) للفطر, على وسط P.D.B

معدل الوزن الجاف (غم) عند درجات الحرارة			الفطر
(م)			
40	30	20	A. niger
0.28	1.36	0.23	

4- تأثير التراكيز الملحية المختلفة لمالح NaCl على نمو الفطر *A.niger*.

تشير النتائج الموضحة في الجدول (3) على قدرة الفطر موضع الدراسة على النمو عند تراكيز الملح المختبرة ولكن بكميات مختلفة كما تبين النتائج اعلاه ان نمو الفطرين يزداد بزيادة تركيز الملح حيث كان اعلى نمو للفطر عند التركيز (30) غم/لتر اذ بلغ (0.37,0.38) غم/لتر على التوالي , فيمما كان النمو عند التركيزين (20,10) غم/لتر (0.16 و 0.26) غم/لتر على التوالي . وهذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات التي اكدت على قدرة الفطر موضع الدراسة

على تحمل تراكيز ملحية عالية في الاوساط الزراعية تتراوح بين (10-30) %
(Radwan واخرون 1984). كما ذكر Luard و Griffin (1981) ان للفطر
A niger وانواع أخرى من جنس *Aspergillus* القدرة على تحمل الظروف البيئية
المختلفة مثل الجفاف والملوحة والحرارة.

الجدول (3) تأثير التراكيز المختلفة من الملح (NaCl) في معدل وزن الغزل
الفطري (غم) للفطر على وسط P.D.B ودرجة حراره (25±2) م .

المعدل لتركيز الملح	معدل الوزن الجاف(غم) للفطر	تراكيز الملح NaCl غم / لتر
	A.niger	
0.15	0.16	10
0.24	0.26	15
0.38	0.39	20
	0.27	المعدل لنوع الفطر

5-تأثير نوع الوسط الزراعي على نمو الفطرين *A.niger*:

بينت النتائج الموضحة في الجدول على قدرة الفطر موضع الدراسة على النمو في اوساط مختلفة من حيث التركيب الكيميائي ولكن كثافة النمو تختلف من وسط لآخر، اذ يعتبر الوسط PDB وسط ملائم لنمو الفطرين حيث سجل الفطر *A.niger* اعلى كمية للنمو فيه اذ بلغة (1.48و1.43)غم على التوالي في حين كان نمو الفطر في الوسطين YEB و NB على التوالي للفطر *A.niger* (0.33و0.18)غم.

معدل الوزن الجاف للفطر	الوسط الزراعي
A.niger	
1.48	PDB
0.33	YEB
0.18	NB
0.66	المعدل لنوع الفطر

المصادر

- 1- Abd-Al Hussain. M.M (2001). A study opportunistic fungal correlated with otitis media AL-Qadisiya.
- 2- Barnett, H.L. and Hunter B.B.(1972). Illustrated genera of imperfect fungi Burgess publ .Co., Minnesota. Theard .ed.
- 3- Abdel Hafez , S.I.I. (1981) . Halophilic fungi of desert soils in Saudi Arabia .
Mycopathologia 80 : 914
- 4- Abdel-Sater, M. A. 2001. Antagonistic interaction between fungal pathogen and leaf surface fungi of Pakistan Journal of Biological Sciences 4(7):838-842.
- 5- Anderegg ,R .J.; Biemann ,K. ; Buechi ,G. And Cushman , M.(1976) . Malformin C , a new metabolite of *Aspergillus niger* . Journal of the American Chemical Society ,98:365-370 .
- 6- Baink , S. & Dey , B.K. (1982) . Availabal phosphate content of an alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphate – solubilizing micro organisms . plant & soil , 69: 353 – 364.
- 7- Bullerman,L.B.(1981). Public health significant moulds and mycotoxin in fermented dairy products.J.Dairy Sci.64:2439-2452.

8- Ciegler, A. B.; vesconder, H. R. and Hesseettine, C. W. (1981). Mycotoxins and N- nitoso compound: Environmental risks Applied of Microbiology. 1:1-51.