جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية – كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تقييم القدرة السمية لبعض الفطريات المرافقة لثمار التفاح والخوخ المحلية والمستوردة في مدينة الديوانية

بحث مقدم إلى مجلس قسم علوم الحياة / كلية العلوم

وهو من متطلبات نيل شهادة البكالوريوس / علوم الحياة

اعداد الطالبة

أسماء ناصر حسين

بإشراف

أ.م.د. عبد الأمير سمير سعدون

١٤٣٩ هـ

٢١٠٨ م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

﴿ن وَالْقَلَمِ وَمَا يَسْطُرُونَ (١) مَا أَنتَ بِنِعْمَةِ رَبِّكَ
بِمَجْنُونٍ (٢) وَإِنَّ لَكَ لَأَجْرًا غَيْرَ مَمْنُونٍ (٣) وَإِنَّكَ لَعَلَىٰ
خُلُقٍ عَظِيمٍ (٤) فَسَتُبْصِرُ وَيُبْصِرُونَ (٥)﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة القلم الآية (١ – ٥)

"الشكر والتقدير"

لابد لنا ونحن نخطو خطواتنا الأخيرة في الحياة الجامعية من وقفة نعود إلى أعوام قضيناها في رحاب الجامعة مع أساتذتنا الكرام الذين قدموا لنا الكثير باذلين بذلك جهودا كبيرة في بناء جيل الغد لتبعث الأمة من جديد. وقبل أن نمضي نقدم أسمى آيات الشكر والامتنان والتقدير والمحبة...

إلى الذين حملوا أقدس رسالة في الحياة ...

إلى والدتي التي لم ينقطع دعاؤها لي...

إلى رفيقات دربي طيلة الأربع سنوات...

إلى أُستاذي أ.م.د. **عبد الأمير سمير سعدون**...

وإلى طالب الدراسات العليا **غالب حسين عبيد**...

"الإهـــــــــداء"

إلـــى الذين كانوا عوناً لنا في بحثنا.... ونوراً يضيء الظلمة التي كانت تقف أحياناً في طريقنا...

إلـــى الذين قدموا لنا المساعدات والأفكار والمعلومات ربما دون أن يشعروا بدورهم بذلك... فلهم مني كل الشكر وأخص بالذكر :

أ.م.د. عبد الأمير سمير سعدون

وطالب الدراسات

غالب حسين عبيد

وإلـــى كـــل من علمني حرف واحد في هذه الكلية التي ستبقى محطة جميلة في ذاكرتي...

إلـــى من يسعـد قلبي بلقياها .... إلـــى سندي وملاذي وقوتي بعد الله...

"" أمـــي ""

إلـــى رمـــز الرجولـــة والتضحيـــة .... إلـــى من دفعني إلى العلم وبه ازدادُ افتخار...

"" أبـــــي ""

إلـــى من آنسني في دراستي ... إلـــى من زرع البسمة في شفاهي ... إلـــى مـــن هـــن أقرب إليَّ من روحي... تذكاراً وتقديراً

"" رفيـقـات دربـــي ""

الخلاصة Abstract:

تم عزل ٤ أنواع من الفطريات من ثمار التفاح والخوخ المحلية والمستوردة في محافظة الديوانية بعد زرع عينات من هذه الثمار على وسط زرعي هو الـ PDA حيث أن الفطريات التي تم الحصول عليها هي *Aspergillus niger , Alternaria natatum , Cladosporium SP , Penicillium notatum*

تم حساب عدد العزلات الفطرية لكل فطر من الفطريات أعلاه على الوسط الزرعي المستخدم حيث وجد أن فطر *Aspergillus niger* عدد عزلاته المتوفرة على المكررات الثلاث لكل عينة من ثمار التفاح الأحمر والاخضر والخوخ هو (١١) عزلة و فطر *Penicillium notatum* عدد عزلاته (١١٧) عزلة وفطر *Cladosporium SP.* (٣٢) عزلة و (٥٩) عزلة لفطر *Alternaria alternate*.

بعد ذلك تم اختبار القدرة السمية لهذه الفطريات بعد تنقيتها على وسط PDA حيث تم زرع هذه الفطريات على ٣ أوساط زرعية هي (PDA و CoA و YES) و ٣ درجات حرارية (٢٥ ، ٣٥ ، ٣٠) درجة مئوية ووجد ان هناك تباين في القدرة السمية للفطريات المختبرة وأكثرها سمية هو الفطر A.alternata على وسط PDA بدرجة ٢٥ درجة مئوية

الفصل الأول

المقدمة

ومراجعة المصادر

المقدمة Introduction

جميعنا يأكل الخضار والفواكه للفوائد التي تحتويها والطعم المميز للكثير منها ولكن لا يعلم أن بعضها يحمل سموم قاتلة، وهذه السموم تنتج بفعل الفطريات السامة التي تصيب هذه الثمار مثل التفاح والخوخ وتفرز بداخلها سموم فطرية. قد تصاب الثمار بالفطريات السامة أثناء حصادها أو خلال خزنها أو تسويقها، والسموم الفطرية: هي نواتج ايضية لفطريات العفن بالأغذية تسبب المرض أو الموت عندما يتناولها الإنسان أو الحيوان (جرجيس واخرون ، ١٩٩٣). وهناك عوامل تساعد على حدوث هذه الأعفان والفطريات للأضرار الميكانيكية التي تحدث لسطح الثمرة ، قطف الثمار خلال الطقس الرطب الممطر عنه في الجو البارد الجاف ، درجة الحرارة المرتفعة نسبياً في المخزن تأخذ الثمرة في الذهاب بها إلى المخزن أو المبردة تدريجياً أو المخزنة في أواخر الموسم أو التي تحفظ في درجة حرارة واطئة بعد نقلها من المخزن. كذلك الهواء الرطب الدافئ يساعد على تكشف لنمو الفطر السطحي عكس الهواء الجاف البارد الذي لا يساعد عل ظهور النمو السطحي للفطر حتى لو كانت الثمرة كلها متحللة (الزوبعي ، ٢٠٠٠). أبو هيلة (١٩٨٧)

ذكرت العديد من الابحاث أن الفطريات السامة لا توجد فقط في الفواكه والثمار مثل التفاح والكمثرى والعنب والخوخ توجد في الحبوب أو البذور الزيتية أو البقوليات وكذلك في العصائر، وقد وجد أن الثمار المجففة تحتوي على تركيزات عالية من الأفلاتوكسين كما في ثمار المشمش والتين والأناناس وقد وجد في الجزر والبن الاخضر والكاكاو كذلك وجدت في اللحوم ومنتجاتها (سعيد ، ١٩٨٥) و(Domsch(1980

الفطريات من الكائنات الحية متباينة التغذية (heterotrophic organisms) وتنتشر في الطبيعة بصورة واسعة في معظم البيئات وتتغذى بطرق مختلفة فقد تكون مترممة (Drechisler , Duddington) أو متطفلة أو متكاملة المعيشة وقد تسبب عن طريق تغذيتها ضرر مباشر من خلال قتل الانسجة الحية أو غير مباشر من خلال افرازاتها التي تؤثر سلباً على الاحياء الأخرى. وتفرز بعض الفطريات سموم تسمى " سموم فطرية ".

والسموم الفطرية: هي نواتج أيضية ثانوية تنتجها بعض الفطريات القادرة جينياً على إنتاج السموم عندما تتوفر لها الظروف البيئية والغذائية المناسبة لإنتاج سمومها (نوار والناطور ، ١٩٨٠).

تعد السموم الفطرية من اقوى السموم المعروفة والتي تسبب أمراض خطيرة بتراكيز ضئيلة تصل إلى أقل من ١٠ جزء في المليون ويرجع السبب إلى أنها مقاومة للحرارة بدرجة يصعب اتلافها بواسطة المعاملات

الحرارية التقليدية المستخدمة في عمليات الطهي والسبب الثاني انها تنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر إلى الأغذية.

الفطريات المسؤولة عن انتاج اغلب السموم المهمة هي: *Aspergillus, Fusarium, Pencillium, and Alternaria*، وقد ينتج الفطر الواحد أكثر من سم واحد وغالبا يوجد أكثر من ٢٠٠ نوع من السموم الفطرية التي تسبب مخاطر صحية للإنسان والحيوان.

1. Aflatoxins , 2. Ochratoxins , 3. Fumonisins , 4. Trichothecene 5. Patulin , 6. Rubratoxin , 7. Citrinin , 8. Zearalenones 9. Ergot , (Asker, A.A. , 2004).

خصائص السموم الفطرية :

تتميز السموم الفطرية بأنها:

١. مركبات كيمياوية سامة تنتجها الفطريات .
٢. معظم السموم الفطرية مركبات هايدروكاربونية حلقية أو ذات سلاسل مفتوحة.
٣. وزن جزيئي منخفض يتراوح بين ١٠٠ – ٦٩٧ دالتون لذلك لا تحفز الجهاز المناعي أي لا تكون اجسام مضادة.
٤. نظراً لاختلاف تركيبها الكيمياوي فإنها تظهر تأثيرات حيوية مختلفة بعضها قد سبب تلف الانسجة ، كبح المناعة ، اضطرابات عصبية .
٥. تذوب بشكل جيد في المذيبات العضوية
٦. تقاوم الانجماد ودرجات الحرارة العالية كدرجة الغليان والبسترة.
٧. تقاوم التحلل خلال عمليات الهضم التي تحدث في الجهاز الهضمي للإنسان والحيوان.
٨. تختلف عن بعضها في درجة سميتها اعتمادا على تركيبها الكيمياوي وبنائها الجزيئي .
٩. اغلب السموم الفطرية عديمة الرائحة والطعم.
١٠. تدخل السموم للإنسان بعدة طرق:
   ١) عن طريق الفم من خلال استهلاكها مع الطعام.
   ٢) أو استنشاقها (استنشاق السموم الفطرية) عن طريق الجهاز التنفسي
   ٣) أو الاحتكاك المباشر مع الفطريات المنتجة للسموم

Fung , F . and R . Clark (2004)

إن تناول ثمار مصابة وملوثة بسموم الفطريات ينتج عنها امرض خطيرة للإنسان والحيوان، هذه السموم قد تكون:

١. مسببة للسرطان Carcinogenic
٢. مسببة لتشوهات الاجنة Teralogenic
٣. مسببة للارتعاش Tremorgenic
٤. مسببة للنزيف Hemorrhagic
٥. او تصيب الجلد Dermatitic
٦. بعضها يؤثر على الكبد Hepatotoxins
٧. بعضها يؤثر على الكلية Nephrotoxicosis
٨. بعضها يؤثر على الاعصاب Neurotoxicosis ،

*** كيف يظهر التسمم بالأفلاتوكسين**

في الواقع لا توجد عوارض نوعية للتسمم وهي تشمل:

١. انزعاج مستمر في المعدة

٢. نفخة في البطن

٣. فقدان الشهية في الاكل.

٤. معاناة من التقيوات المتكررة.

٥. قرقرة في البطن.

٦. حمى واحمرار الجلد والعينين.

٧. تورم البطن وتضخم الطحال.

٨. نزف من الجهاز الهضمي.

٩. اصابة بالغيبوبة. (2010) Kamaru Zamani

علاج السموم الفطرية:

ينصح الاطباء بأخذ جرعات داعمة من فيتامين " B " والبنسيليوم كونها تغير في التخفيف من عدة التسمم.

الوقاية منه:

الطريق الافضل هو منع تشكل الفطريات التي تنتج سموم الافلاتوكسين وحماية الاغذية من التلوث بها.

لا يمكن تلافي تلوث الغذاء بسموم الافلاتوكسين حتى مع استخدام التقنيات العالية في التصنيع الغذائي لا تتوفر من الناحية العلمية اي طريقة يمكن الاعتماد عليها لمنع وصول هذه السموم الى الاغذية التي نتناولها لهذا سمحت ادارة الدواء والغذاء والامريكية بوجود السموم بنسب معينة لا يجب تجاوزها.

Klich و جماعته ٢٠٠٢

نبات التفاح *Pyrus malus*:

تعد فاكهة التفاح من أكثر أنواع الفواكه شعبية ويعتبر التفاح الفاكهة المفضلة للكثير من الباحثين عن اللياقة البدنية. هذه الفاكهة الرائعة واللذيذة تعد مصدراً غذائياً جيداً يعود على متناوليه بالفائدة والصحة الجيدة، تحتوي فاكهة التفاح على مضادات الاكسدة وهذا من شأنه أن يقلل من نسبة الامراض المحتمل الاصابة بها وهناك مقولة شهيرة يرددها الكثيرون " إن تفاحة واحدة باليوم تبقي الطبيب بعيداً

شجرة التفاح متوسطة الحجم وتنتمي لعائلة ورديات كانت بداياتها في كازاخستان في المناطق الجبلية الغنية بالمعادن ونجدها الآن في جميع انحاء المعمورة. تتميز هذه الفاكهة بأن شكلها يكون بيضاوي أو كمثري الشكل ولها عدة الوان بذورها غير صالحة للأكل!

قد تتعجب أن عرفنا أن بذورها تحتوي على مادة Cyanogenic التي تسبب مادة السيانيد السامة لذا ينصح بعدم أكل بذور التفاح.

بالإضافة الى الطعم اللذيذ الذي يتمتع به التفاح فإنه يمتاز بقلة محتواه من السعرات الحرارية. حيث تحتوي التفاحة متوسطة الحجم على ٩٥ سعرة حرارية. إذ يشكل الماء نسبة ٨٦% منه وفيما يلي توضيح لأهم العناصر الغذائية الموجودة في ١٠٠ غم من التفاح الطازج غير المقشر.

العنصر الغذائي	القيمة
الكربوهيدرات	١٣,٨ غم
البروتين	٠,٣ غم
الدهون	٠,٢ غم
الالياف	٢,٤ غم
اوميكا ٣	٠,٠١ غم
اوميكا ٣	٠,٠٤ غم

.Gavin Evans (2005)

فوائد التفاح

١. تقليل خطر الاصابة بالسكري
٢. تقليل خطر الاصابة بالسرطان
٣. الحفاظ على صحة الانسان
٤. تخفيف الوزن
٥. تقليل خطر الاصابة بالسكتات الدماغية والربو وتقليل حدوث التجاعيد وتحسين المزاج.
٦. تقليل خطر الاصابة بالزهايمر.

تتعرض ثمار التفاح للإصابة بالعديد من الآفات المختلفة في أثناء جنيها وتسويقها وخزنها منها التعفن الازرق والتعفن البني والابيض وغيرها. وتسبب هذه التعفنات في خفض قيمتها التسويقية حصل Beart وجماعته (٢٠٠٦) على العديد من العزلات من ثمار التفاح العائدة للفطريات المسببة لهذه التعفنات منها *A. Aspergillus niger, flavus, Rhizopus stolonifer, Pencillium expansum* وهذه الفطريات تنتج مركبات سامة في مختلف الاغذية تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins ومن أهم هذه السموم هي سموم الافلاتوكسين Aflatoxins التي تنتجها بعض الانواع التابعة لجنس Aspergillus وينتج عن تناول الاغذية الملوثة بهذه السموم العديد من الامراض لدى الانسان والحيوان مثل وذمة الاطراف السفلى وسرطان الكبد وتشوه الأجنة والطفرات الجينية وتنشيط عملية تكوين البروتينات (شتات ف ١٩٩٥)

نبات الخوخ *Prunus persica* :

البرقوق أو الخوخ او الشاهلوج ويدعى ايضاً البروميا هي شجرة ذات نواة من جنس الخوخ *Prunus* والبرقوق في المعجم الوسيط التابع لمجمع اللغة العربية هو شجر من الفصيلة الوردية ينمو في المناطق المعتدلة . ازهارها بيضاء وردية مختلفة الالوان. فاكهة الخوخ أو البرقوق هي احدى الفواكه الصيفية التي تنتشر في معظم أنحاء العالم وتتميز بلونها الوردي وبطعمها الحلو حيث يمكن ادخالها الى الحلويات والعصائر المختلفة بالإضافة الى ذلك فإنها تتميز باحتوائها على العديد من العناصر والفيتامينات المهمة مثل البوتاسيوم والفسفور والحديد والكبريت وغيرها.

اضرارها:

١. تؤدي الى الاسهال عند الافراط في تناولها.
٢. يمكن ان يؤدي الى حموضة المعدة . لاحتوائها على كمية كبيرة من الاحماض .
٣. تسبب فقدان الشهية نظراً لاحتوائها على الالياف بكمية كبيرة.
٤. تساعد على رفع كمية السكر بالجسم، بسبب احتوائها على كمية كبيرة من السكر

المزارع العربي (١٩٩٨)

فوائد الخوخ

١. تستخدم لانقاص الوزن ، نظرا لقدرتها الكبيرة على التخلص من الدهون المتراكمة في الجسم.
٢. تمد الجسم بالطاقة اللازمة
٣. تعزز عملية الايض بفعالية .
٤. تساعد على نمو الطفل نظرا لاحتوائها على فيتامين " أ " بكثرة.
٥. تقلل احتمالية الاصابة بمرض السرطان لاحتوائها على فيتامين " أ " وعنصر الفسفور تساعد على تكوين خلايا الدم الحمراء
٦. تحافظ على صحة الاسنان واللثة
٧. تقلل احتمالية اصابة الخلايا بالتلف
٨. تساعد على نمو خلايا وعظام الجنين
٩. تحد من احتمالية الاصابة بالانفلونزا والبرد وبالتالي فانه ينصح بتناول كأس من عصيرها يومياً
١٠. تحافظ على صحة القلب. كما تقلل احتمالية الاصابة بمرض تصلب الشرايين .
١١. تساعد على تثبيت الحمل.
١٢. تضبط دقات القلب.
١٣. تقلل احتمالية الاصابة بضمور العضلات .
١٤. تقلل احتمالية الاصابة بـــ الدوخة والدوران عند النساء الحوامل بسبب احتوائها على عنصر البوتاسيوم.
١٥. تحافظ على صحة الجهاز العصبي
١٦. تساعد على الشعور بالشبع
١٧. تخلص الجسم من الديدان والسموم المختلفة
١٨. تنشيط حركة الامعاء بفعالية.
١٩. تضبط بنية الكوليسترول الجيد بالجسم لاحتوائها على البوتاسيوم بكميات كبيرة .

(قاسم ، ع . عبد الوالي)

ان اصابة ثمار الخوخ بـ الفطريات سوف ينتج عنها عدة امراض تصيب هذه الثمار ومنها :

١. مرض التعفن البني Brown Rot

المسبب المرضي / الفطر *Sclerotinina fructicola*

المكافحة / جمع الثمار المصابة والعالقة على الاشجار او المتساقطة على الارض وحرقها خارج البستان

٢. مرض تجعد أوراق الخوخ Peach leaf curi

المسبب المرضي / الفطر *Taphrinic deformans*

المكافحة /

* رش الاشجار قبل ظهور الاوراق رشه سباتيه بمادة الكبريت المايكروني بنسبة ٤ غم/لتر ماء.

* جمع وازالة الاوراق والاغصان المصابة واتلافها.

٣. مرض الجرب في الخوخ Peach scap

المسبب المرضي / الفطر *Cladosporium carpophilum*

المكافحة / يجمع الثمار المصابة والعالقة على الاشجار أو المتساقطة على الارض وحرقها خارج البستان

(معلا ،ج . خليفة ، ١٩٩١)

٤. مرض البياض الدقيقي في الخوخ Peach Powdery Mildew

المسبب المرضي / الفطر*Sphaerotheca pannosa*

المكافحة / رش الاشجار المصابة بمادة الكبريت المايكروني بنسبة ٤ غم / لتر ماء أو رشها بأحد المبيدات (إسماعيل ١٩٨٨).

الفصل الثانـي

المواد وطرائق العمل

المواد وطرائق العمل :

١. المواد وطرائق العمل :

اسم الجهاز	الاستخدام
١. Wood	توفر ظروف معقمة عندما يتم صب الاوساط او زرع العينات
٢. Incubation	الحاضنة
٣. الموصدة Autocleave	لتعقيم الاوساط
٤. ميزان حساس	يوزن بها الوسط الزرعي
٥. مصدر لهب	ليتم تعقيم الـ

٢. الأدوات المستخدمة:

الاداة	الاسم العلمي
١. اطباق بتري بلاستيكية	Disposible Petri dishes
٢. اطباق بتري زجاجية	Glass Petri dishes
٣. الناقل الزرعي المختبري	Loop
٤. ورق ترشيح	Filter Papers
٥. دوارق حجمية مختلفة	Volumeetric Flask
٦. سلايد	Slide
٧. كفر سلايد	Cover Slide
٨. ماصة دقيقة	Micro Pipttes

٣. المواد المستخدمة:

١. مادة كيميائية هي :

استخدمت مادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١% لتعقيم الثمار (التفاح والخوخ) في حالة زرع العينات .

٢. ماء مقطر distal water المعقم

الوسط الزرعي المستخدم في الزرع

١. وسط Patatose Dextrose Agar (PDA)

طريقة تحضيره:

١. PDA الجاهز من الشركة يوزن منه 39 g بواسطة ميزان حساس ويذاب بـ Distal water (ماء مقطر معقم) في دورق زجاجي ويوضع في عنق الدورق قطعة من القطن ويلف بواسطة قطعة من الألمنيوم.
٢. يوضع في جهاز Autoclave بدرجة حرارة ١٢١مْ لمدة ١٥ دقيقة بعد انخفاض درجة الحرارة وبعد الانتهاء استخرج الدورق الزجاجي لكي يبرد حتى يصل لدرجة حرارة مسكه باليد.
٣. يضاف المضاد الحيوي Chloram Phenicol الذي يمنع نمو البكتيريا ، (كبسولة واحدة) لدورق بكاملة ويمزج جيداً (الشيخلي ١٩٦٨).

** ملاحظة : يكون الوسط اعلاه حوالي من (٤٠ – ٥٠) طبق .

بعد ذلك تبدأ عملية صب الوسط الزرعي في أطباق بتري معقمة وجافة. حيث تصب في الاطباق بشكل متساوي تحت ظروف تعقيم جيدة تترك الاطباق بعد ذلك لتقلب وحفظت بالثلاجة لحين استخدامها للزرع.

٢. وسط YESA Yeast Extract Sucrose Agar :

حضر هذا الوسط طبقا لما ورد في (١٩٩٩) Satiot , Machida وذلك بإضافة ٢٠ غرام من مستخلص الخميرة و٢٠٠ غم من السكروز و٢٠ غم من الأكار إلى ١٠٠٠ مل من الماء بعدها عقم الوسط بنفس ظروف التعقيم المذكورة سابقاً، بعد التعقيم بردت هذه الاوساط الزرعية واضيف اليها المضاد الحيوي بمقدار ٢٥ ملغم/لتر لتثبيط نمو البكتيريا في العينات المزروعة (Evans and Richardson, 1989).

٣. وسط أكار مستخلص جوز الهند CoCount Extract Agar (COA) :

حضر هذا الوسط طبقاً لما ورد في (١٩٩٩) Satiot , Machida كما يأتي:

– تم أخذ مقدار ١٠٠ غم من جوز الهند المبروش والمتوفر تجارياً في السوق واضيف اليه ٣٠٠ مل من الماء المقطر لنفس المزيج لمدة ٢٠ دقيقة بعدها رش المزيج بواسطة قطعة من الشاش ثم اضيف الراشح ١,٥% أكار واكمل الحجم الى ٣٠٠ مل باستخدام الماء المقطر وعقم بنفس ظروف التعقيم.

* تحضير العينات التي يتم زرعها على الوسط الزرعي PDA :

يتم تحضير العينات (التفاح والخوخ) من الأسواق التجارية ومن أماكن مختلفة لكل نوع منها.

– حيث جلبت ثمار التفاح ذات لون أصفر وثمار تفاح ذات لون أحمر من محلات مختلفة قسم منها يحتوي على خدوش ليست جيدة تماماً وقسم منها جيدة جداً وقسم منها ذات نوعية تحتوي على القليل من اعراض الاصابة بـالفطريات.

وضعت اجزاء من ثمرة التفاح ذات اللون الاصفر في دورق زجاجي و وضع لها هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١% وتترك لمدة ٢ – ٣ دقائق وبعد ذلك تغسل بالماء المعقم المقطر لمدة ٣ مرات تغسل وتسكب هذا الماء هكذا لمدة ثلاث مرات وبعد ذلك تنشف هذه الاجزاء بواسطة ورق نشاف.

نأخذ اجزاء من ثمرة التفاح ذات اللون الاصفر مع مراعاة ظروف التعقيم الجيدة باستخدام الاداة التي تقطع بها الثمرة وكذلك الظروف المحيطة ونضعها في دورق أو بيكر زجاجي نظيف وجاف.

ثم نأخذ اجزاء من ثمرة التفاح ذات اللون الاحمر ونضعها في بيكر زجاجي أو دورق حجمي ونضيف له هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١% تحت ظروف التعقيم الجيدة ونتركها لمدة ٢ – ٣ دقائق وبعد ذلك نسكب هايبوكلورات الصوديوم ونغسلها بماء معقم مقطر لثلاث مرات نضيف اليها الماء ونمزجها به ونسكبه هكذا لثلاث مرات بعد ذلك ننشف هذه العينة بواسطة ورق نشاف وتوضع هذه الاجزاء في بيكر زجاجي نظيف وجاف.

نأخذ اجزاء من ثمرة التفاح ذات اللون الأحمر تحت ظروف تعقيم جيدة تقطع منها اجزاء مع مراعاة ظروف التعقيم للأداة والظروف المحيطة التي نعمل بها وتوضع هذه الاجزاء غير المعقمة في دورق زجاجي نظيف ومعقم .

نأخذ اجزاء من ثمرة الخوخ التي جلبت من محلات مختلفة تحت ظروف تعقيم جيدة تقطع اجزاء منها وتوضع في دورق زجاجي نظيف ومعقم ويضاف لها هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١% وتترك لمدة ٢ – ٣ دقائق وبعد ذلك يسكب ويضاف لها ماء مقطر معقم يضاف ويرج ويسكب هكذا لـ ثلاث مرات. توضع في دورق زجاجي نظيف وجاف.

نأخذ اجزاء من ثمرة الخوخ المأخوذة من محلات مختلفة تحت ظروف تعقيم جيدة تقطع اجزاء منها بـ أداة معقمة وجافة وتوضع هذه العينات في دورق زجاجي نظيف وجاف.

اصبحت لدينا عينات جاهزة للزرع على وسط وهي :

- عينة تفاح اصفر معقم.
- عينة تفاح اصفر غير معقم.
- عينة تفاح احمر معقم.
- عينة تفاح احمر غير معقم.
- عينة خوخ معقم.
- عينة خوخ غير معقم.

حيث يتم زراعة العينات بأخذ قطع من العينة بواسطة الملقط المعقم والجاف و وضعه على الوسط حيث توضع قطعة في المركز و٤ قطع تقريبا على الجوانب أو ثلاثة بداخل Wood بظروف تعقيم جيدة حيث تعمل ٣ مكررات لكل عينة.

- تفاح اصفر غير معقم – ٣ مكررات.
- تفاح اصفر معقم – ٣ مكررات.
- تفاح احمر غير معقم – ٣ مكررات .
- تفاح احمر معقم – ٣ مكررات.
- خوخ غير معقم – ٣ مكررات.
- خوخ معقم – ٣ مكررات.

تحضن بدرجة حرارة (٢٤ ±) مْ لمدة ٧ أيام وملاحظة النمو.

بعد زراعة الفطريات على وسط PDA وحضنت الاطباق تم تشخيص الفطريات التي نمت على العينات المزروعة للتفاح والخوخ على وسط PDA.

حيث تم تشخيص الفطريات بأخذ عينة او جزء من الثمرة بـ Loop بعد تعقيمه بـ اللهب الى درجة الاحمرار بوضعه بزاوية ٤٥° هذه الاجراءات يجب ان تحدث بداخل Wood مع مراعات نظافة الادوات المستخدمة او المكان الذي يتم فيه زراعة الفطر.

يتم تبريد Loop على احد جوانب الطبق الزرعي الخالي من النمو ثم اخذ جزء من النمو للفطر ودفعه على سلايد الموضوع عليه مسبقاً قطرة من Lactophenol blue أو KOH ١٠% بواسطة ماصة دقيقة

مزج نمو الفطر مع Lactophenol blue ونضع Cover slide بصورة مائلة و وننزله بهدوء حتى لا تتشكل فقاعات تؤثر على رؤية العينة تحت المجهر (Ellis, 1994).

عند فحص العينات يتم فحصها بقوة X١٠ لانها توفر مساحة اكبر لرؤية العينة وعند القوة X٤٠ لرؤية التفاصيل الصغيرة للعينة.

* تشخيص الفطريات:

تم تشخيص الفطريات على اساس الصفات المظهرية والتشريحية حسب الطرق العلمية وحددت الاجناس والانواع اعتمادا على المفاتيح التصنيفية العالمية (ital , 1980).

حيث تم التشخيص على اساس الصفات المظهرية التي تشمل: لون المستعمرات ، درجة نموها ، على اساس مظهر النمو السطحي قد يكون: أملس ، خشن ، مستوي ، متعرج ، على اساس نهايات النمو : دائري، خطي، منتشر، لون النمو السطحي (Barnett , 1965).

كذلك على اساس الصفات التشريحية : حجم البوغ ، قطر الخيوط الفطرية ، قطر الحامل الكونيدي ، تفرعات الخيوط الفطرية ، تفرعات الحوامل الكونيدية ، شكل الابواغ قد تكون الابواغ: متجمعة أو متسلسلة واحدة تلو الأخرى، لون الابواغ ، لون الخيوط الفطرية (ميخائيل وبيدر).

بعد تشخيص الفطريات بدأت عملية تنقية الفطريات وذلك باستخدام وسط PDA حيث اخذت عينة وزرعت و حضنت الاطباق بدرجة حرارة (٢٤ ±) مْ لمدة ٧ أيام حيث نحصل على مزارع نقية للفطريات الاربعة نامية بشكل جيد. ومن ثم يتم حساب النسبة المئوية لتردد الفطريات

النسبة المئوية لتردد الفطريات =عدد عزلات الفطر \ العدد الكلي للعزلات × ١٠٠%

الكشف عن قدرة بعض أنواع الفطريات المعزولة على انتاج الافلاتوكسين

بعد تنمية الفطريات تبدأ عملية كشف القدرة السمية لهذه الفطريات

لغرض اختبار قدرة بعض الانواع الفطرية على انتاج الافلاتوكسين اتبعت طريقة (Satio and Malchida, 1999) باستخدام ٣ اوساط غذائية هي (PDA Patatose Dextrose Agar) و (YES Yeast Extract Sucrose) و(CoA Cocconu Agar) وثلاث درجات حرارية هي ٢٥ ، ٣٥ ، ٣٠ مْ وثلاث مكررات لكل نوع فطري.

حيث تم تلقيح الاوساط اعلاه بنقل جزء من مستعمرة الفطر النقية وحضنت الاطباق لمدة ٧ – ١٤ يوم تحت درجة حرارة ٢٥ مْ ثم قلبت الاطباق رأساً على عقب.

واضيف لكل طبق في الغطاء ٢,٠ مل أمونيا بتركيز ٢٥% ثم اعيد حضن الاطباق ومكرراتها تحت ثلاث درجات حرارية هي ٢٥ ، ٣٥ ، ٣٠ مْ وللأوساط الثلاثة لكل فطر وتم مراقبة الاطباق لكل يوم لملاحظة تغير لون قاعدة الوسط الغذائي المنمى عليه الفطر وتم تسجيل النتائج على اساس تغير لون المستعمرة الى اللون الاحمر والوردي والاصفر البرتقالي وبدرجات لونية مختلفة كدلالة على قابلية الفطر على انتاج الافلاتوكسين.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

النتائج والمناقشة :

اظهرت نتائج عزل الفطريات المرافقة لثمار التفاح والخوخ وجود أربعة أنواع فطرية كما في جدول (١) والصور (١،٢،٣،٤)

وهي Penicillium notatum و Aspergillus niger و Alternaria alternate و Cladosporium SP.

وبنسب تردد مختلفة وكان اكثر الفطريات تردداُ هو الفطر P.notatum وبتردد ١٦ % ويلية الفطر Cladosporium SP. بتردد ٩,٢ %

ثم الفطر A.alternata بتردد ٦,٤ % ثم A.niger بتردد ٣,٢ % على الثمار المختلفة

وهذه النتائج تتفق مع ما ذكرة

ميخائيل واخرون (١٩٨١) وجرجيس اخرون (١٩٩٣)

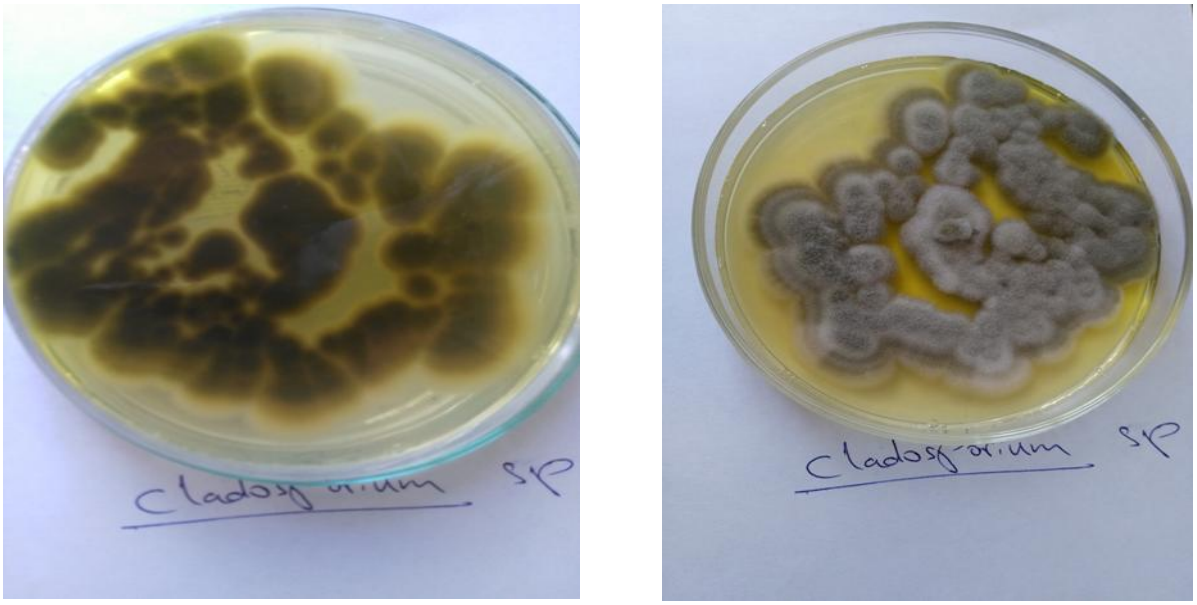
جدول رقم (١) يوضح عدد عزلات كل فطر وتردد الفطريات المتواجدة على ثمار التفاح والخوخ.

العينة	الفطر	عدد العزلات	النسبة المئوية لتردد الفطر
تفاح احمر غير معقم	*Pencillium natatum*	٣٧	١٦
	Aspergillus nige	٣	١,٤
	Alternaria alternata	١٣	٦,٤
تفاح احمر معقم	*Pencillium natatum*	١٧	٨
	Aspergillus niger	١	٠,٥
	Cladosporium	١٢	٦,٢
	Alternaria alternata	١٠	٥,٢
تفاح اصفر غير معقم	*Alternaria alternata*	١٣	٦,١
	Pencillium natatum	٣٩	٨,١
تفاح اصفر معقم	*Alternaria alternata*	١٠	٥,١
	Pencillium natatum	١٩	٩,١
	Cladosporium	٢٠	٩,٢
خوخ غير معقم	*Alternaria alternata*	١٣	٦
	Aspergillus niger	٧	٣,٢
خوخ معقم	*Pencillium natatum*	٥	٢,٣

صورة رقم (١) توضح نمو فطر *Aspergillus niger*

صورة رقم (٢) توضح نمو فطر *pencillum notatum*

صورة رقم (٣) توضح نمو فطر *Alternaria alternata*



صورة رقم (٤) توضح نمو فطر *Cladosporium sp.*

فحص السمية للفطريات :

بعد عزل وتشخيص الفطريات وتنقيتها حيث تم تنقية (٤) انواع من الفطريات تم اجراء فحص السمية لها لمعرفة قدرة هذه الفطريات على انتاج السموم الفطرية أو عدم انتاجها حيث تبين من خلال الجدول رقم (١) ان اضعف الفطريات سميةً هو *Aspergillus niger* واشدها في افراز السموم هو *Alternaria alternarate* وهذه موافق لما ذكره (عبود ، ٢٠٠٦).

ومن خلال الجدول الذي يوضح القدرة السمية الذي تم الحصول عليه من خلال ملاحظة لون الوسط الزرعي وجد أن الفطريات *Aspergillus niger , Cladosporium , Pencillium notatum* في وسط (CoA) لا تنتج سموم فطرية في ٣ درجات حرارية (٢٥ ، ٣٠ ، ٣٥) درجة سليزية وذلك لعدم توفر الظروف الملائمة لها كما ذكر إبراهيم واخرون (١٩٩٨)

أما الفطر *Alternaria alternata* هو الوحيد الذي انتج سموم فطرية على وسط (CoA) في درجة حرارة (25Cº) بحيث كان لون الوسط احمر وردي معتدل (++) وفي وسط (30Cº) كان لونه احمر وردي فاتح (+) أما في درجة حرارة (35Cº) لم ينتج السموم الفطرية لعدم توفر الظروف الملائمة له. أما في وسط (YES) لم ينتج سموم فطرية سوى في درجة حرارة (25Cº) حيث كان لون الوسط احمر وردي فاتح (+)

حيث يبين الجدول رقم (2) ان فطر *Alternaria alternata* في وسط PDA ثابت السموم الفطرية قوية حيث كان لون الوسط الزرعي احمر وردي غامق في درجة حرارة () (+++) أما في درجة حرارة (30Cº) كان لون الوسط احمر وردي فاتح (+) أما في درجة حرارة (35Cº) لم ينتج السموم الفطرية لعدم توفر الظروف الملائمة كما ذكرة نوار والناطور (١٩٨٩).

تتميز السموم الفطرية بأنها تنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر الى الاغذية لذلك فإن ازالة الاجزاء المصابة بالفطر من الاغذية كما يفعل الكثير من الناس لا يؤدي الى التخلص الكامل من السموم الفطرية المتكونة في هذه الاغذية ولذلك يجب تجنب نمو الفطر على هذه الاغذية (سعيد ، ١٩٨٥)

جدول رقم (2) يوضح الفطريات وقابليتها على انتاج الافلاتوكسين

الفطر	وسط YES درجة الحرارة(c^o)			وسط PDA درجة الحرارة(c^o)			وسط COA درجة الحرارة(c^o)		
	٢٥	٣٠	٣٥	٢٥	٣٠	٣٥	٢٥	٣٠	٣٥
Pencillum notatum	++	++	–	++	++	–	–	–	–
Cladosporium	+	+	–	++	+	–	–	–	–
Alternaria alternata	+	–	–	+++	+	–	++	+	–
Aspergillus niger	*	**	–	**	**	–	–	–	–

احمر وردي فاتح + ، **احمر وردي معتدل ++** ، **احمر وردي غامق +++**

احمر برتقالي فاتح * ، **احمر برتقالي معتدل **** ، **احمر برتقالي غامق *****

عدم القابلية على انتاج السموم –

المصادر

المصادر العربية

١. إبراهيم ، إسماعيل خليل واخرون ، ١٩٩٨ . السموم الفطرية اثارها ومخاطرها ، دار الكتب والوثائق ببغداد الطبعة الأولى

٢. أبو هيلة ، عبد الله بن ناصر ، ١٩٨٧ اساسيات علم الفطريات كلية العلوم ، جامعة سعود ، المملكة العربية السعودية

٣. إسماعيل ، عبد اللطيف سالم ، ١٩٨٨ . أسس علم الامراض النباتية . جامعة البصرة ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، جمهورية العراق

٤. الشكري ، ١٩٩١ ، اساسيات الفطريات وامراضها النباتية . مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر جامعة بغداد وزارة التعليم العالي والبحث العلمي جمهورية العراق

٥. الشيخلي ، جودة سامي ١٩٦٨ . الميكروبيولوجي العام والتطبيقي . مطبعة المعارف بغداد كلية الزراعة ، جامعة بغداد

٦. الزوبعي ، إسماعيل احمد إسماعيل ، ٢٠٠٠ ، تحديد مصادر العدوى الأولية وبعض الظروف المهيئة لإصابة البطاطا بانواع من الجنس Fusarium ومقاومته احيائياً ، رسالة ماجستير كلية الزراعة جامعة القادسية

٧. المزارع العربي ١٩٨٨ ، مجلة زرتعية العدد الثاني عشر ، تشرين الثاني شركة المواد الزراعية ، مقدادي

٨. جرجيس ، ميسر مجيد ورقيب عاكف العاني واياد عبد الواحد الهيتي (١٩٩٣) امراض النبات مطبعة دار الحكمة بغداد صفحة ٥٦٩

٩. شتات ف ١٩٩٥ بساتين التفاحيات واللوزيات والعنب والزيتون ، المركز الوطني للبحوث الزراعية ونقل التكنولوجيا

١٠. سعيد كامل كزار (١٩٨٥) وجود الافلاتوكسين والزيراليون في بعض الحبوب ومنتجاتها الغذائية في بعض المحافظات العراقية المجلة العراقية للعلوم الزراعية (زانكو) المجلد ٢: ١٦٥-١٧٧

١١. عبود ميثاق ستار (٢٠٠٦) الفعالية السمية والانزيمية للفطريات والخمائر الانتهازية المعزولة في عينات سريرية من مستشفى الناصرية العام . رسالة ماجستير كلية العلوم ، جامعة ذي قار

١٢. معلا ، ج . خليفة ، ط . طريبين ، ع . حلوة ، ع . الحسين ، ممدوح . ١٩٩١ ، الآفات الزراعية وطرق مقاومتها . المطبعة الجديدة دمشق

١٣.مطلوب ، عدنان ناصر وعز الدين سلطان محمد وكريم صالح عبدول (١٩٨٩) انتاج الخضروات ج٢ مديرية دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل – العراق صفحة ٣١٧

١٤.ميخائيل ، سمير حسني وعبد المجيد طرابية وعبد الجواد الزرري (١٩٨١) امراض البساتين والخضر مطبعة جامعة الموصل . العراق صفحة ٢٨١

١٥. نوار ، مصطفى ، الناطور ، رشاد (١٩٨٩) المايكوتوكسينات والتسمم المايكوتوكسيني في الانسان والحيوان ، ج١، ط١. الجامعة الأردنية ، عمان

المصادر الاجنبية .

1. Baert. K. , kamala , A , De Meulenear , B , Huybrechts , I , De Henanw , Devligehere , F . (2006) Exposure Assessment of patulin in aplle Juice for Flwmish young Children
2. Bowen , A , Davidson , F , Keatch , R , Gadd , G(2002) Effect of nutrient availability on hyphal maturalim and topographical seneing in aspergillus niger mycoscience , lolumet 48.p. 145-151
3. Domsch , K , H . Gams , W , and Anderson , T . H (1980). Compendium of soil fungi (vol.I) Academic press of Harcot Brace Javanovich publishers london
4. Fung , F and R . Clark . 2004 . Health effects of my cotoxius toxicological overview Jousnal of toxicology , 42:217 – 243
5. Gravin Evans (Tuesday , Augustg , 35) 2005 First ban rankles new Zealand – Australian apple growers say risk of disease justifies barriers
6. Ramaruzamani . 2010 , Evalnation of tru detection techhiqnes of boxigenic Aspergilus I solates African Jousnal of Biotechnology , 9: 7654 – 7659
7. Klich , M . A . 2002 . Identification of common Aspergillus species ponsen and looiyen wageningen the nether lauds 116 pp
8. Sakhare P. S, harm , S.D.D R ; Kalorey ; D . ; warke S.R Bhandarkar , AG and kurkure , N . V (2007) effect of toxirak polyherbal feed supplement during induced

10. Satio , M and Machida S , (1999) Arapid identification method for aglatoxin producing strains of Aspergillus flavus and A parasiticus by ammonicl vapor, Myco .