تأثير حامض الاستيك وبنزوات الصوديوم في نمو الفطر *Penicillium expansum* وانتاجه لسم الباتيولين

سمية نعيمة حوار، بتول زينل علي، هيفاء البير يوسف
قسم علوم الحياة–كلية التربية للعلوم الصرفة(ابن الهيثم)–جامعة بغداد
(07705443264) Sesame_97@yahoo.com

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية تأثير مادتين حافظتين للأغذية هي حامض الاستيك وبنزوات الصوديوم في نمو عزلة الفطر *Penicillium expansum* وانتاجها لسم الباتيولين. أظهرت النتائج فعالية حامض الاستيك في تثبيط نمو الفطر بنسبة 100% عند التراكيز 0.5 و 1% واظهر التركيز 0.1% خفضا لنمو الفطر بنسبه75% وخفضا لإنتاج سم الباتيولين بنسبة 84.33%. أمامعاملة الفطر ببنزوات الصوديوم فأظهر التركيز 0.03% تثبيطا كاملا لنمو الفطر بينما ثبطت التراكيز الأقل من ذلك 0.0003، 0.003% نمو الفطر بنسبة 58 و 82% على التوالي وادى التركيز 0.0003% الى خفض إنتاج سم الباتيولين بنسبة 48.97% وأدى التركيز 0.003% تثبيطا كاملا لإنتاج السم.

الكلمات المفتاحية: حامض الاستيك. بنزوات الصوديوم .الباتيولين.*P.expansum*.

Effect of Acetic Acid and Sodium Benzoate on Growth of *Penicillium expansum* and Patulin Production

Sumaiya N. Hawar, Batool Z. Ali, Hifaa A. Yousif
University of Baghdad, College of Education of Pure Science (Ibn Al-Haitham).
(07705443246)Sesame_97@yahoo.com

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the effect of two food preservatives acetic acid and sodium benzoate on growth of *Penicillium expansum* and patulin production. Results showed complete inhibition of growth at conc. 0.5 and 1% while 0.1% showed reduction of growth equal to 75% +and patulin reduction of 84.33%. whereas, treatment of the fungus with different concentrations of sodium benzoate showed complete inhibition of growth at conc. 0.03%, lower concentrations 0.0003 and 0.003% revealed reduction of growth arrived to 58 and 82% respectively and reduction of 48.97% patulin production at conc. 0.0003%, and no patulin was detected at conc. 0.003%.

Keywords: **Acetic acid, sodium benzoate, patulin, *P.expansum***

المقدمة

من المعروف إن أغلب التلفالذي يحصل للمنتجات الزراعية والغذائية ناتج عن نمو الفطريات فيها وخاصة الفواكه التي تكون أكثر حساسية لنمو الفطريات مقارنة بالبكتريا [1] وتعتبر هذه المشكلة مهمة جدا في الصناعات الغذائية بسبب الخسائر التي تسببها هذه الفطريات للمنتجات فضلا عن تأثيرها في القيمة الغذائية لها، كما انها قد تفرز مواد أبض أو سموم تؤثر في صحة الإنسان[2]. من هذه السموم هو سم الباتيولين والذي يفرز من قبلأنواع تعود لعدة أجناس، أشهرهاوأكثرهاإنتاجا هو النوع *Penicillium expansum* الذي يعتبر المنتج الرئيسي لهذا السم في الفواكه وعلى الأخص التفاح ومنتجاته ويعتبر هذا الفطر من فطريات الجروح التي تصيب المحاصيل مابعد الحصاد Post harvest fungus[3].

ان تلوث المنتجات الغذائية بسم الباتيولين يشكل خطرا كبيرا على صحة الانسان وخاصة الاطفال الذين يتناولون كميات كبيرة من عصير التفاح ومنتجاته الأخرى [4]، يؤثر سم الباتيولين في صحة الإنسان من خلال تأثيراته السمية المتعددة وكمادة مطفرة ومسرطنة ومشوهة للأجنة فضلا عن العديد من التأثيرات الخلوية الأخرى التي يسببها [5، 6، 7] لذلك فان تأثيراته السمية هذه تستدعي إيجاد وسائل للسيطرة على نمو الفطر المنتج أو إنتاجه او إزالته من المنتجات الملوثة به. هنالك العديد من الوسائل والتي تضم وسائل فيزيائية وكيميائية واحيائية. من الوسائل الكيميائية هي استخدام المواد الحافظة الغذائية، بالرغم من ان هنالك العديد من الضوابط والمحدوديات من قبل المنظمات المختصة التي تحد او تمنع استخدام المواد الحافظة في الأغذية لمنع نمو الإحياء المهجرية إلا ان الحاجة الماسة لبعض هذه المواد والتي هي في الأصل قليلة العدد كما إن قلة البحوث التي تهتم بالبدائل عن هذه المركبات في السنوات الحديثة مما دعى الباحثين الى إعادة تقييم المواد الحافظة القديمة والتي ثبت استخدامها الأمين لصحة الإنسان والحيوان لإعادة استخدامها بشكل سليم [8 ، 9]. من هذه المركبات هي كيميائية في الاصل مثل البروبيونات، السوربات والبنزوات فضلا عن ذلك تستخدم مواد حافظة طبيعية المنشأ ومنها الحوامض العضوية الضعيفة أو قصيرة السلسلة والزيوت الطيارة والمركبات الفينولية والتي جميعها تستخدم لحفظ العصائر والمشروبات إذ إن معظم هذه المواد قد ثبت سهولة طرحها من قبل الإنسان والحيوان ولا تترك أثرا ضارا أو أنها قليلة السمية كما إن بعضها يعتبر من المواد الامينة الاستعمال Generally recognized as safe(GRAS) كما هو الحال في حامض الاسيتك[10].

لذلك استهدفت الدراسة الحالية تقييم فعالية تراكيز مختلفة من بنزوات الصوديوم وحامض الاسيتيك في نمو الفطر *Penicillium expansum*المعزول من ثمار التفاح والمنتج لسم الباتيولين وتأثيرها في انتاج هذا السم.

المواد وطرائق العمل

– عزل الفطر *Penicillium expansum*

تم الحصول على عزلة منتجة لسم الباتيولين والتي تم عزلها من ثمار التفاح الأصفر واختبار قابليتها على إنتاج سم الباتيولين من قبل [11].

– تحضير سم الباتيولين القياسي

تم تحضير محلول السم القياسي للباتيولين وذلك باذابه1,3 ملغم من السم المتبلور النقي (Sigma) في 25 مل ميثانول ليكون تركيز محلول السم القياسي 52 جزء بالمليون ، حفظ السم في قنينة معتمة في المجمدة لحين الاستعمال.

– تأثير حامض الاستيك وبنزوات الصوديوم في نمو الفطر *P. expansum* وانتاج الباتيولين.

اتبعت طريقة [12] اذ تم اخذ قرصين بقطر 5 ملم من حافة مستعمرة الفطر النامية على وسط PDAوبعمر 5–7 أيام ونقلت الى دوارق زجاجية بحجم 250 مل احتوى كل دورق على حجم 50 مل من وسط PDBالمحور (وسط بطاطا دكستروز السائل المدعم بـ 52 / مايكرومولار / لتر من كلوريد المنغنيز ($MnCl_2.4H_2O$)[13]، اضيفت اليه تراكيز مختلفةمن حامض الاستيك (0.05 ، 0.1 ، 0.2%) ودوارق أخرىأضيفإليها بنزوات الصوديوم بتركيز (0.0003 ، 0.003 ، 0.03%) وبثلاث مكررات لكل معاملة مع السيطرة والتي تمثلت بتنمية الفطر في وسط PDA دون أضافه حامض الاستيك أو بنزوات الصوديوم ، حضنت الدوارق بدرجة حرارة 20 ± 2 °م لمدة 14يوم ، بعدها تم فصل خيوط الفطر النامي بالترشيح خلال أوراق الترشيح (Whatman no.1)، وأخذتأوراق الترشيح الحاوية على كتلة الخيوط الفطرية وجففت بالفرن الكهربائي بدرجة 70° م لحين ثبات الوزن ، وقدر الوزن الجاف للفطر للمعاملات المختلفة ومعاملة السيطرة وتم حساب النسبة المئوية للتثبيط بالاعتماد على المعادلة

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط \%} = \frac{\text{و}_1 - \text{و}_2}{\text{و}_1}$$

و1 = وزن الفطر في السيطرة

و2 = وزن الفطر في المعاملات المختلفة

اما الراشح المستحصل من عملية الترشيح أعلاه فاعيد ترشيحه بامراره خلال أوراق الترشيح الدقيقة Millipore filter (0.45) مايكروميتر لإزالة الابواغ ، ووضع في قمع الفصل واضيف اليه حجم مساوي له من مذيب الاثيل اسيتيت ، رج المزيج لمدة 10 دقائق ثم ترك ليستقر وتم فصل الطبقة العضوية في دورق منفصل ، وجففت بامرار المحلول خلال كبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4(10 غم). جمع الناتج واختزل حجمه الى ماقبل الجفاف باستخدام المبخر الدوار Rotary evaporatorبدرجة حرارة 48° م ثم اذيب المتبقي في حجم 2 مل من الايثانول وحفظ في المجمدة في قناني معتمة لحين الكشف عنه.أما عينات السيطره فتمت بتنميه الفطر في وسط PDA المحور وبدون اضافه اي

ماده وبنفس ظروفالتنميه المشار اليها سابقا واجريت عليها خطوات الاستخلاص نفسها.

– تعيين تركيز سم الباتيولين باستخدام جهاز HPLC

استخدم جهاز (Shimadzumode) HPLCوالموضحة مواصفاته في [11] لتعيين كمية السم المنتج من قبل العزلة المنتجة وتأثير المعاملات المختلفة في إنتاجه بالمقارنة مع السم القياسي وتم حساب التركيز بالاعتماد على :

تركيز السم(جزء بالمليون)= مساحة القيمة للعينة × تركيز السم القياس / مساحة القمة للسم القياسي

النتائج والمناقشة

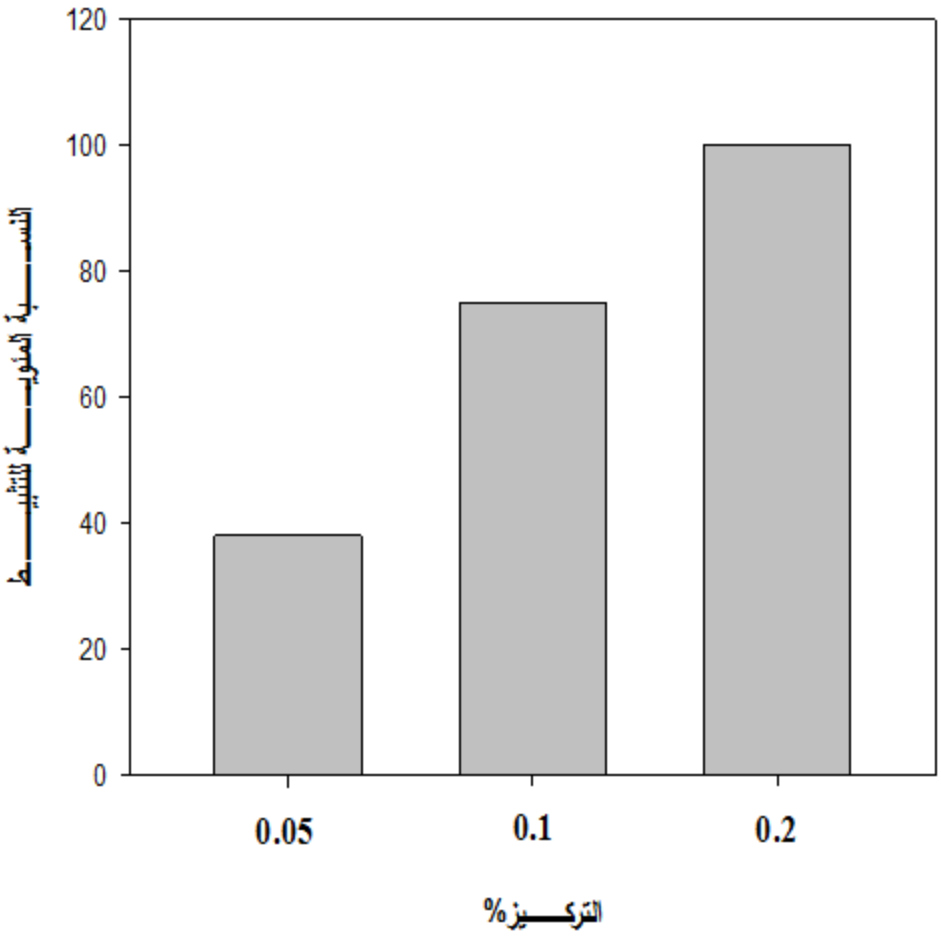
أظهرت نتائج معاملة عزلة الفطر *P.expansum* بتراكيز مختلفة من حامض الاستيك (0.05 ، 0.1 ، 2%) (شكل 1) الى حصول تثبيط تام لنمو الفطر بالتركيز 2% وادى التركيز 0.05% الى خفض لنمو الفطر وخفضا لإنتاج الباتيولين بنسبة 11%، اما التركيز 0.1% فادى الى خفض نمو الفطر بنسبة 75% كما اظهر التركيز كذلك خفضا لإنتاج الباتيولين بنسبة 84.33% (جدول 1). من المعروف ان حامض الاستيك والذي استخدم لسنوات طويلة في الصناعات الغذائية لمنع التلوث بالإحياء المجهرية وكمادة محمضة [14] وهو من الحوامض العضوية الضعيفة او قصيرة السلسلة اذ ان ميكانيكية عمله تعود الى الجزء الغير مفكك للجزيئة (Undissociated)وهو الفعل الأهم له من فعل التغير في قيمة الدالة الحامضية pHالذي يحصل بإضافة الحامض إذ يؤثر في حالته الغير المفككة في الغشاء الخلوي عن طريق التأثير في القوة الدافعة للبروتونات والتي يحتاجها لنقل مواد الأساس او التأيضات مما يؤدي إلى حصول ثقوب في الأغشية الخلوية وقتل الإحياء المجهرية وان هذه الفعالية تتناسب مع درجة عدم تفككه (Undissociated).

وقد استخدم حامض الاستيك كمادة مبخرة لحفظ المحاصيل الغذائية من غزو الفطريات وبتركيز 2–4 ملغم / لتر لمدة 2 ساعة أوأكثر[15 ، 16 ، 17، 9]. كما أشار العالمان [18]إلى الفعالية العالية لحامض الاستيك مقارنة بعدد من الحوامض العضوية الأخرى والمواد الحافظة وبتركيز 1% في السيطرة على نمو الفطريات في المعجنات والمخللات ومنها الأنواع *AspergillusLuchuersis* ، *A. flavus* ، *Rhizopus stolonifer* ، *Mucor* sp. و *P. oxalicum*. كما أظهرت نتائج (19) الى ان تركيز 1% من حامض الاستيك ادى إلى اعلى فعالية تثبيط لنمو الفطر *R. stolonifer* على ثمار الشليك. إما معاملة الفطر بتراكيز مختلفة من بنزوات الصوديوم (شكل 2) فقد اظهر التركيز 0.03% تثبيطا كاملا للنمو بينما ثبطت التراكيز الاقل من ذلك 0.0003 و 0.003% نمو الفطر بنسبة 58% و 82% على التوالي. كما ادى التركيز 0.0003% الى

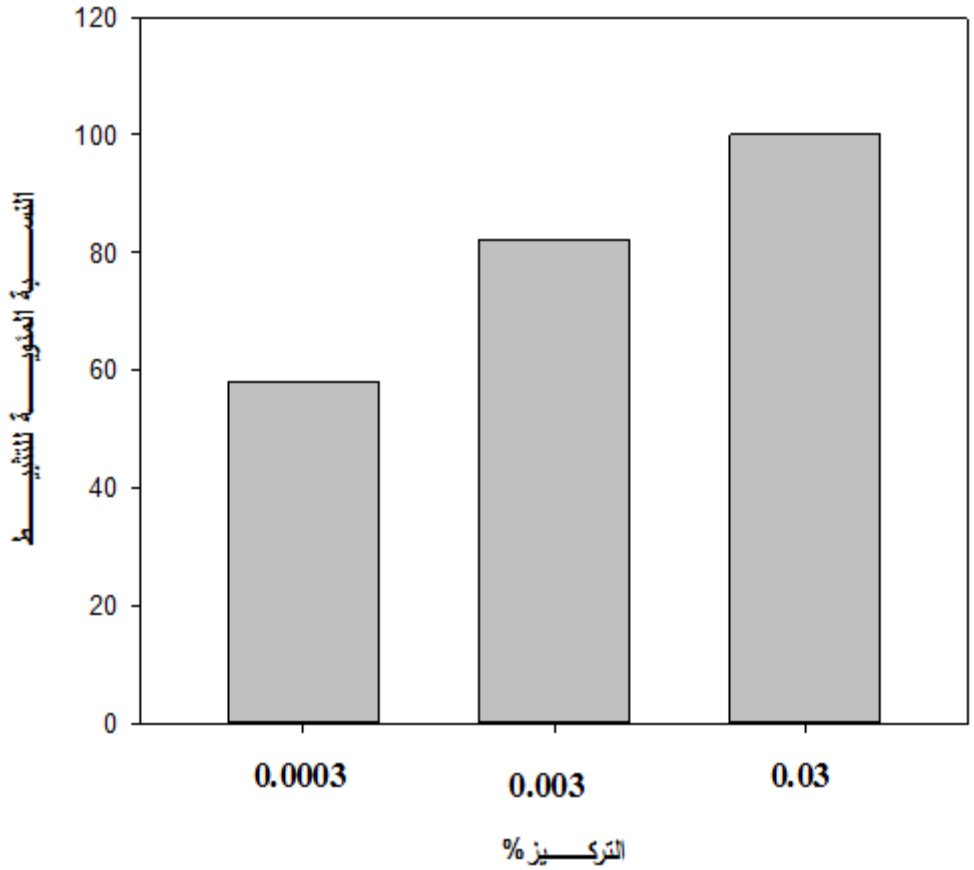
خفض انتاج سم الباتيولين بنسبة 48.97% ولم يظهر اي اثر للسم بمعاملة الفطر بالتركيز 0.003% (جدول 1 ، شكل 2).

من المعروف ان بنزوات الصوديوم كمادة حافظة غذائية تستخدم عادة في المنتجات التي تكون حامضية بطبيعتها وتكون اكثر فعالية في الأوساط التي يكون فيها pH≤4وتستخدم بتركيز 0.05-0.1% في عصائر الفاكهة والمخللات والاجبان وغيرها إذ أنها تؤدي الى تكوين حامض البنزويك حال ذوبانها بالماء الذي يعمل بدوره عمل الحوامض العضوية الضعيفة [20]، وبمقارنة النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة مع دراسات سابقة ومنها دراسة [21] والتي أظهرت ان بنزوات الصوديوم بتركيز 0.15% قد ثبطت نمو الفطر *P. citrinum*، *Alternariasolani*، *A. niger* ونمو الفطر *A. flavus* و*A.parasitcus*وانتاجهما لسم الافلاتوكسين ، كما أشارت الدراستين [22 و 23] الى ان التراكيز التي تستخدم في الولايات المتحدة من بنزوات الصوديوم تقع بين 0.03 و 0.1% لحفظ العصائر والمواد الغذائية، كذلك فقد ذكر [24] الى ان سوربات البوتاسيوم وبنزوات الصوديوم بتركيز 0.2 مولار هو الاكثر فعالية مقارنة باملاح عضوية اخرى في السيطرة على نمو *P. digitatum* و*P. italicum* المسببة لتعفن الحمضيات والتي ادت الى خفض نمو الفطرين بنسبة 70-80%. كذلك اشار العالم [12] والذي اظهر فعالية بنزوات الصوديوم في السيطرة على نمو الفطر *P.expansum*، اذ أدى التركيز 0.05% الى تحفيز نمو الفطر بينما التركيز 0.25% واعلى من ذلك فأظهرت خفضا للنمو بنسبة وصلت الى اكثر من 50%، كما ادى التركيز 0.1% الى خفض تركيز الباتيولين وصولا الى التركيز 0.25% والذي خفض انتاجه بنسبة 50% وادى التركيز 0.3% الى تثبيط كامل لنمو الفطر. اظهرت دراسة [25] الى فعالية بنزوات الصوديوم بتركيز 1000 مايكغم / مل والتي ادت الى تثبيط كامل لانبات ابواغ الفطر *Colletotrichumcapsici* وخفضا لاصابة ثمار الـ Capsicumبهذا الفطر بنسبة وصلت الى 82%، اما التركيز 200 مايكغم/مل فادى الى تثبيط نمو المايسيليوم. كذلك لم تظهر بنزوات الصوديوم بتركيز 0.02% و 0.04% اي تاثير في نمو الفطر *A. niger*بينما اظهر التركيز 0.1% اعلى فعالية تثبيط [10]. من الدراسات الاخرى التي اهتمت بالوسائل الكيميائية للسيطرة على انتاج الباتيولين غير المستخدمة في هذه الدراسة هي مابينه [26]اذ استخدما عدة مضافات غذائية منها بعض الزيوت الطيارة وسوربات البوتاسيوم

لملاحظة تاثيرها في نمو الفطر *P. expansum* على ثمار التفاح وفي عصيره ، أظهرت النتائج ان تركيز 0.1% من زيت الدارسين و 0.5% سوربات البوتاسيوم قد خفضت نمو الفطر على سطح الثمار كما لم يظهر اي اثر للباتيولين في عصير التفاح الحاوي على 0.3% زيت الدارسين و 0.5% سوربات البوتاسيوم. وفي دراسة اخرى استخدم فيها فيتامينات B ، هيدروكلوريد الثايمين، هيدروكلوريد البايريدوكسين وبنتوثنات الكالسيوم والتي اظهرت جميعها خفضا معنويا لانتاج سم االباتيولين [27]. وكخلاصة النتائج يلاحظ حساسية عزلة الفطر *P. expansum* للمادتين الحافظتين المستخدمة وبتراكيز اقل مما هو مثبت في الدراسات الاخرى وذلك قد يعود الى اختلاف سلالة الفطر او اختلاف طرق الفصل والحضن وغيرها من الظروف التي تؤثر في النمو ومن ثم في انتاج السم.



شكل1: تاثير تراكيز مختلفة من حامض الاستيك في الوزن الجاف لفطر *P. expansum*. النامي في وسط PDA بدرجه حراره 20±2 °م لمده 14 يوم

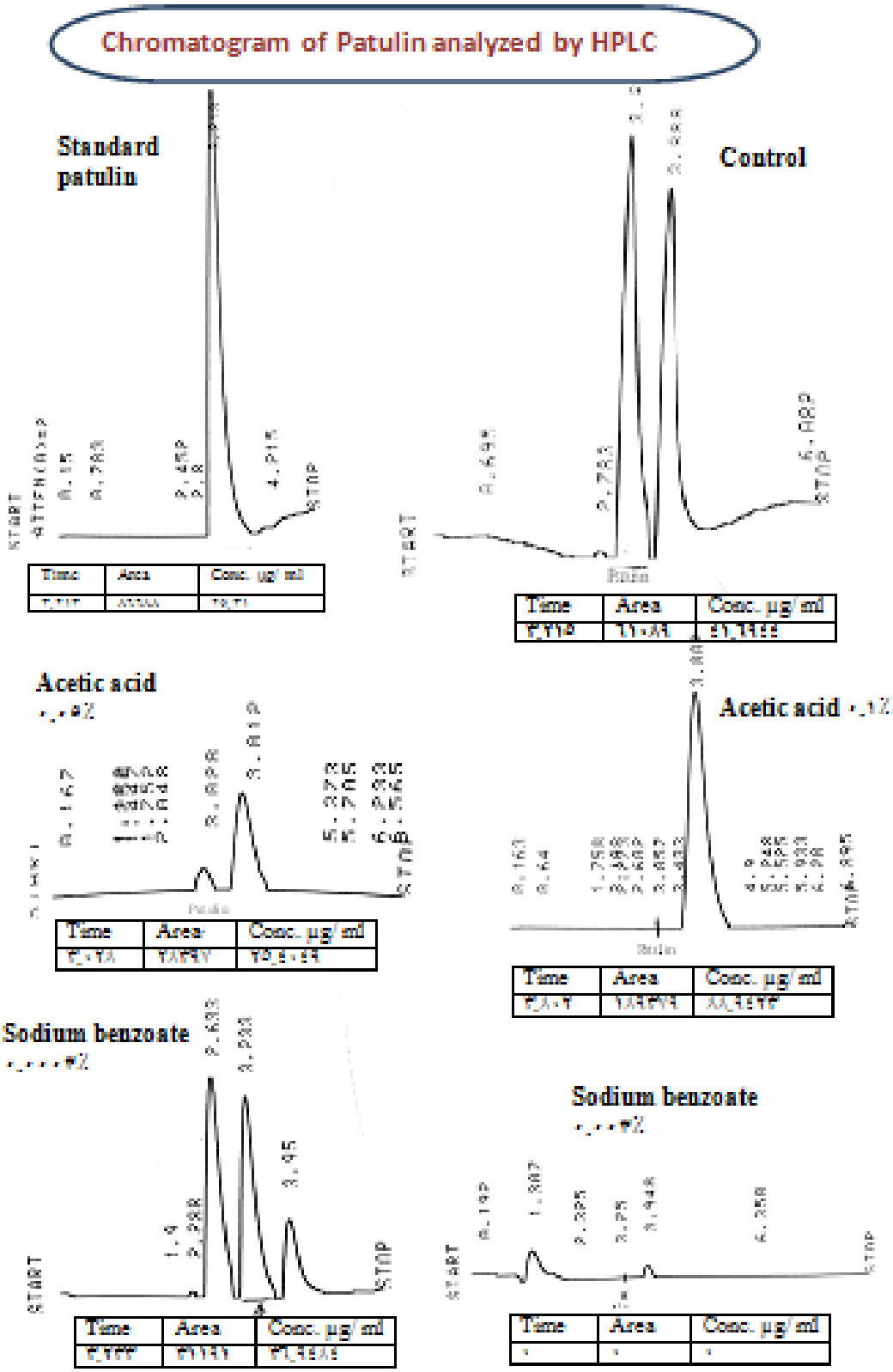


شكل2: تاثير تراكيز مختلفة من بنزوات الصوديوم في الوزن الجاف لفطر *P. expansum*. النامي في وسط PDA بدرجه حراره 20±2 °م لمده 14 يوم

جدول 1: تاثير المعاملة بحامض الاستيك وبنزوات الصوديوم في تركيز سم الباتيولين.

المعاملة	تركيز السم / جزء بالمليون	النسبة المئوية لتثبيط انتاج السم
Control	17.56	–
AA 0.05%	0.022	11
AA 0.1%	2.75	84.33
بنزوات الصوديوم 0.0003%	8.96	48.97

بنزوات الصوديوم 0.003%	0	100



References

1- Tournas, H. and Katsoudasi E. (2005). Mold and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. Int. J. Food Microbiol. **105**(1): 11-17.

2- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (1999). Fugi and food spoilage. Chapman and Hall, New York.

3-Lai, L.;Fuh, M. & Shih, C. (2000). Detection of mycotoxin patulin in apple juice. J. Food and Drug analysis : 8, 85-96.

4- Beretta, B.; Gaiaschi, A.; Galli, C. &Restani, P. (2000). Patulin in apple based foods: occurrence safety evaluation. Food Addit. Cont. 17(5): 399-406.

5- Mahfoud, R.; Maresca, M.; Garny, N. & Fantini, J. (2002). The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium mechanism of action of the toxin and effects of glutathione. Toxicol.and Appl. Pharmacol., 181 : 209-218.

6- Lehman, L.; Franz, U. & Metzler, M. (2003). Genotoxic potential of the mycotoxin patulin in cultured mammalian fibroblasts. Arch. Pharmacol. 367-372.

7- Schumacher, D.; Metzler, M. & Lehman, L. (2005). Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster v79 cells and its modulation by intracellular glutathione. Arch. Toxicol. 79: 110-121.

8- Palou, L.; Smilanick, J.L. & Crisosto, C.H. (2009). Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major post harvest diseases of stone fruits. J. Food Prot. **72**(5): 1037-1046.

9- Sholberg, P. (2009). Control of postharvest decay by fumigation with acetic acid or plant volatile compounds, fresh produce 3 (special issue 1) Global science books. 80-86.

10- Heydaryinia, A.; Veissi, M. &Sadadi, A. (2011). A comparative study of the effects of the two preservatives, sodium benzoate and potassium sorbate on *Aspergillus niger* and *Penicillium notatum*. Int. J. High Risk Behav. 4(4): 1-8.

11- Hawar, S.N. (2012). Activity of some probiotic bacteria against the mycotoxin patulin produced by *Penicillium expansum* isolated from apple fruits. College of Education for pure science/Ibn Al-Haitham.University of Baghdad. PhD. thesis 145 pp.

12- Larous, L.; Hendel, N; Abood, J.K. & Ghoul, M. (2007). The growth and production of patulin mycotoxin by *Penicillium expansum* on apple fruits and its control by the use of propionic acid and sodium benzoate. Arab. J. Pl. Prot. 25(1) : 125-128.

13- Kurtzman, D. M. A. & Blackburn, J.A. (2005). Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. Int. J. Food Microbiol. 98: 241-248.

14- Doores, S. (1993). Organic acids. In: Davidson, P.M. and Branen, A.L. (Eds). Antimicrobials in foods (2nd Edn). Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 95-136.

15- Seaton, W.H. (1993). Acetic acid. In: Agreda, V.H. and Zoller, J.R. (Eds). Acetic acid and derivatives. Moral Dekker, Inc., New York, pp. 73-100.

16- Sholberg, P.L. &Gaunce, A.P. (1996). Fumigation of stone fruits with acetic acid to control postharvest decay.Crop. Prot. 15, 681-686.

17- Liu, W. T.;Chu,C. L. & Zhou , T. (2002).Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. Hort Science. **37**: 151-156.

18- Pundir, R.K. and Jain, P. (2010). Screening for antifungal activity of commercially available chemical food preservatives. Inter. J. Pharm. Sci. Review and Research. 5(2): 25-27.

19- Yarahmadi, M.; Safael, Z. & Azizi, M. (2014). Study the effect of chitosan, vanillin, and acetic acid on fungal disease control of *Rhizopus stolonifer* fruits in vitro and in vivo. Eur. J. Experimental Biol. 4(3).219-225.

20- Theron, M.M. &Lues, J.F.R. (2010). Organic acids and food preservation. CRC Press: 51-95.

21- Rusul , G. and Marth E.H. (1987). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of sodium benzoate or potassium sorbate at different initial pH values. J. Food Prot. 50: 820-825.

22- Foegeding, P.M. &Busta, F.F. (1991). Chemical food preservation. In: Block, S.S. (ed.), Disinfection, sterilization and preservation. Philadeliphia, Lea &Febiger, 809-811.

23- Russell, A. D.; Hugo, W.B.&Aylifd, G.S.J. (1999). Principles and practice of disinfections, preservatives, and sterilization (3rded) M.K. Black Well science. 485-503.

24- Palou, L.;Usall, J.; Smilanick, J.L.; Aguillar, M.J. & Vinas, I. (2002). Evaluation of food additives and low toxicity compounds as alternative chemicals for the control of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* on citrus fruits. Pest. Management Science. **58**(5): 459-466.

25- Ajith, P.S. and Lakshmidevi, N. (2011). Effect of sodium and potassium salts on *Colletotrichumcapasici*incitant of anthracnose on bell pepper. J. Agr. Technol. 7(2): 423-430.

26- Ryu, D. and Holt, D. L. (1993). Growth inhibition of *Penicillium expansum* by several commonly used food ingredients. J. Food Prot.**56**(10): 862-867.

27- Yazici, S. &Veioglu, Y.S. (2002). Effect of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, and calcium D-pantothenate on the patulin content of apple juice content rate.Nahrung/Food. 43(4) : 256-257.