عزل الفطريات المرافقة لحاصل الذرة الصفراء والتحري عن سموم الأفلاتوكسين التي تنتجها

عبدالرضا طه سرحان سامي موسى أبو طبيخ

قسم علوم الحياة ـ كلية مدية العلم الجامعة ـ الكاظمية ـ بغداد

الملخص

استهدف البحث التعرف على الفطريات التي تصيب عرانيص وحبوب الذرة الصفراء في بعض المناطق التابعة لمحافظة بابل التي تشتهر بزراعة هذا المحصول، والتحري عن الأنواع الفطرية المنتجة لسموم الأفلاتوكسينات فيها. بينت النتائج وجود سبعة أنواع من الفطريات محمولة على البذور تعود الى ستة أجناس مختلفة هي:

Aspergillus , Alternaria , Fusarium , Penicillium , Rhizopus , Rhizoctonia

وكان أكثرها تواجدا" الجنس ***Aspergillus*** بنوعيه ***A. flavus*** و ***A. niger*** . اختبرت قدرة الفطرين ***A. flavus*** و ***A. niger*** على انتاج سموم الأفلاتوكسينات في الوسط الزرعي وفي البذور. أظهرت النتائج قدرة هذين الفطرين على انتاج نوعين من الافلاتوكسينات في البذور هما B1 و B2 وبكميات

تراوحت ما بين 6.31 و 12.56 نانوغرام / مل بالنسبة لـ B1 و 0.33 و 1.73 نانوغرام / مل بالنسبة لـ B2 . أكدت النتائج وجود هذين النوعين من الأفلاتوكسينات في عينات حبوب الذرة الصفراء

التي جمعت من مناطق مختلفة من محافظة بابل بكميات تراوحت بالنسبة لـ B1 ما بين 2.94 و 6.46 نانوغرام/ مل وبالنسبة لـ B2 ما بين 0.32 و 0.77 نانوغرام/ مل وذلك نتيجة لانتشار أنواع الفطر ***Aspergillus*** في الطبيعة وقدرتها على انتاج سموم الأفلاتوكسينات عند توفر الظروف المناسبة.

Isolation of Fungi Associated to Corn Seeds and Detection of Aflatoxins

A. R.T. Sarhan S. M. Abu - Tabigh

Department of biology, University College of Madenat Al-elem, Baghdad

Abstract

This research was done to isolate the fungi associated to corn seeds collected from different areas of Babylon Province and to detect the aflatoxins produced by fungi in media and in corn seeds. Results showed that seven species of seed borne fungi belong to six genera : *Alternaria, Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Rhizoctonia* and *Rhizopus*. The genus *Aspergillus* was the most frequent, productivity of *A.flavus* and *A.niger* to the aflatoxins in liquid media and in corn seeds were examined. It was found that ability of the two species to produce the aflatoxins B1 and B2 at concentration ranged from 6.31 to 12.56 for B1 and from 0.33 to 1.73 nanogram / ml for B2 . This result was proofed by the presence of the two aflatoxins in the corn seeds infected by *A.flavus* and *A.niger* at concentrations ranged from 2.94 to 6.46 for B1 and from 0.32 to 0.77 nanograms / ml.

المقدمة

تصاب الذرة الصفراء قبل الحصاد بمجموعة من فطريات الحقل ويمكن أن يستمر نشاطها اثناء اتلخزن عند توفر الظروف المناسبة للإصابة وبالخصوص المحتوى الرطوبي للحبوب أو الخزن في ظروف رطوبة نسبية عالية (1). أن أهم الفطريات الحقلية التي تصيب حاصل الذرة الصفراء في الحقل ويمكنها الاستمرار بالاصابة في المخازن هي: *Alternaria* , *Fusarium* *Helminthosporium* ,(2) . اضافة الى ذلك تتعرض الحبوب المخزونة تحت ظروف الخزن المختلفة للإصابة بعدد من الفطريات المخزنية التي تتبع عدد من الاجناس وتشمل :

Alternaria spp. , *Aspergillus* spp. , *Mucor* spp. , *Penicillium* spp. , *Rhizopus* spp.

(3)، هذه الفطريات تنتشر بصورة واسعة في الهواء والتربة فتكون مصدرا" لتلوث المنتجات الزراعية كبذور المحاصيل المختلفة (4). تعد السموم الفطرية من المنتجات الأيضية الثانوية ذات الاوزان الجزيئية الواطئة المفرزة من مجموعة كبيرة من الفطريات على عدد من محاصيل الحبوب ومنها الذرة الصفراء مسببة خسائر اقتصادية كبيرة. لقد ازداد الاهتمام بالسموم الفطرية بعد أن ثبتت مخاطرها على صحة الانسان وحيواناته كمواد مسرطنة (5)، وأن أكثر أنواع السموم الفطرية أهمية هي الأفلاتوكسينات G2, G1, B2, B1 التي تنتجها أنواع تابعة للفطر *Aspergillus* (6 ، 7)، حيث ينتج النوع *A. flavus* B1 و B2 أما النوع *A. paraciticus* فينتج G2, G1, B2, B1 (8)، يمكن لهذه المركبات أن تدخل الى جسم الانسان بشكل مباشر وذلك أثر تناوله الحبوب والاغذية الملوثة بهذه المركبات واحيانا" اخرى تنتقل الى غذاء الانسان بشكل غير مباشر عند تناوله المنتجات الحيوانية (لحوم، بيض وحليب) مصدرها حيوانات سبق وأن تغذت على مواد علفية ملوثة بالسموم(9). أن بعض السموم الفطرية تتحول الى مركبات خطرة في جسم الام أو في الحيوانات تدر مع الحليب مثل الافلاتوكسينات B1 و B2 التي تتحول الى M1 و M2 أو ما تسمى بسموم الحليب، اضافة الى ذلك قد تتحول السموم الى مركبات أكثر خطورة نتيجة فعاليات البيض الحيوي في الكبد مثل تحول الافلاتوكسين نوع B1 الى الافلاتوكسيلول الأشد خطورة من الأفلاتوكسين (10). يمكن أن تحدث الاصابة بالفطريات التي تفرز هذه السموم قبل الحصاد أو أثناء خزن لمحصول ، من المعروف أن للجسم القابلية على استبقاء الافلاتوكسينات مما يؤدي الى تراكمها فيه حيث يعد الكبد العضو الرئيسي المتأثر بها كما أن الكلية من الأعضاء المتأثرة بسموم الافلاتوكسين (11). يهدف البحث الحالي الى عزل الفطريات المصاحبة لبذور الذرة الاصفراء والتحري عن سموم الأفلاتوكسين في الوسط الزرعي وفي البذور الملوثة بالفطريات.

المواد وطرق العمل

عينات بذور الذرة الصفراء:

جمعت عينات بذور الذرة الصفراء من مناطق مختلفة في محافظة بابل هي: الحلة ، المسيب ، المدحتية والقاسم. حيث اخذت العينات عشوائيا" من خمسة مواقع عشوائية في أماكن تجميع وخزن البذور بواقع 10 كغم من كل موقع. وضعت العينات في أكياس نايلون و نقلت الى المختبر، خلطت ثم قسمت الى عينات أصغر حجما" (5 كغم / عينة)، اخذت ثلاث عينات عشوائية لتمثل العينة النهائية التي اجريت عليها التجارب.

عزل وتشخيص الفطريات من البذور:

أخذت من كل عينة 100 بذرة للمكرر الواحد بواقع ثلاث مكررات، عقمت سطحيا"بغمرها في محلول هايبوكلورات الصوديوم(6% من محلول القاصر التجاري) لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات ثم جففت بورق ترشيح معقم ووزعت على أطباق بتري حاوية على وسط أكار البطاطا والدكستروز (PDA) المعقم والمدعم بالمضاد الحيوي ستربتومايسين (100 جزء بالمليون) بواقع عشرة بذور لكل طبق ثم حضنت الأطباق عند درجة حرارة 25° م لمدة سبعة أيام ، بعدها تم عزل الفطريات وحساب نسبة الاصابة بالفطريات في بذور المعاملات المختلفة. تم تنقية وتشخيص الفطريات المعزولة باتباع طريقة التنقية المتوالية للفطريات على نفس الوسط الزرعي ثم شخصت اعتمادا" على الصفات المظهرية (شكل وحجم ولون الأبواغ أو الكونيدات والحوامل الكونيدية) بالاستعانة بالمصادر المتخصصة (12، 13 ، 14 ، 15).

استخلاص وتقدير سموم الافلاتوكسين.

لاستخلاص سموم الأفلاتوكسين من عينات بذور الذرة الصفراء الملوثة بالفطريات، اتبعت الطريقة الواردة في (16) المحورة من قبل الرجو (17) .

النتائج والمناقشة

يوضح جدول 1 نتائج عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبذور الذرة الصفراء التي شملت عدد من الاجناس والأنواع الفطرية تضمنت الجنس *Aspergillus* بنوعيه *A. flavus* و *A. niger* ، وكانت السيادة للنوع الأول حيث بلغت نسبة تواجده 65,3 % يليه النوع الثاني الذي بلغت نسبة تواجده 38, 6 % ، في حين جاء الفطر *Rhizopus stolonifer* بالمرتبة الثالثة حيث بلغت نسبته 27, 3 % ، ثم جاءت الفطريات الأخرى بنسب أقل وهي الفطر *Penicillium notatum* بنسبة 15, 6 % ، الفطر *Alternaria alternata* بنسبة 13, 6 % ، الفطر *Fusarium oxysporum* بنسبة 10, 0 % والفطر *Rhizoctonia solani* بنسبة 8, 2 % . ظهر أن عينة بذور الذرة من منطقة المدحتية أكثر العينات تلوثا" بهذه الفطريات.أن التباين في أعداد الأجناس والأنواع في المناطق المدروسة قد يعزى الى المصدر الذي أتت منه البذور ومدى تلوثها في الحقل أو اثناء النقل أو الخزن اضافة الى العوامل البيئية الخارجية من حرارة ورطوبة وتهوية كعوامل مساعدة في نمو وانتشار الأنواع المختلفة من الفطريات (18) . أن سيادة أنواع الجنس *Aspergillus* يعزى الى قابلية هذا الفطر على التكيف والنمو في مدى واسع من درجات الحرارة حيث يستطيع النمو والتكاثر بدرجات حرارة تتراوح بين 5 - 45 °م ، كما تؤكد الدراسات والبحوث على ارتفاع نسبة انتشار النوع *A. flavus* من 15% في موسم الشتاء الى أكثر من 70% عند ارتفاع درجات الحرارة في الصيف (19). لابد من الاشارة الأهمية وخطورة أنواع هذا الفطر وخاصة عند توفر الظروف المناسبة من الحرارة والرطوبة بسبب انتاجها سموم الأفلاتوكين الخطيرة، علما" بأن الخزن الرديء (وهو ما لوحظ من خلال الدراسة) يؤدي الى افراز تراكيز عالية من هذه السموم بالرغم من انتهاء فترة نمو الفطر (20).

يوضح جدول 2 نتائج التحليل والكشف عن سموم الأفلاتوكسين والتقديرات الكمية لكل من السموم B1 و B2 التي تنتجها الفطريات المعزولة من بذور الذرة الصفراء في الوسط الزرعي ، فكانت فطريات جميع المعاملات منتجة لسموم الأفلاتوكسين، حيث أعطت فطريات عينة بذور المدحتية أعلى تركيز لكل من الـ B1 والـ B2 (12, 56 و 1, 73 نانوغرام/مل على التوالي)، و أعطت فطريات عينة بذور المسيب أقل تركيز للـ B1 والـ B2 (2, 93 و 0, 19 نانوغرام/مل على التوالي).

لقد أنتج النوع *A. flavus* الأفلاتوكسين بكميات متفاوتة، تراوحت مابين 6, 31 و 12, 56 نانوغرام/مل بالنسبة للـ B1 وتراوحت ما بين 0, 33 و 1, 73 نانوغرام/مل بالنسبة للـ B2 . في حين أنتج النوع *A. niger* المعزول من عينة بذور المسيب الـ B1 بكمية 2,93 نانوغرام/مل ، و المعزول من عينة بذور المدحتية بكمية 4, 22 نانوغرام/مل ، وانتج الـ B2 بكميات 21 ,0 و 0, 46 نانوغرام/مل في المعزول من عينتي الحلة والمدحتية على التوالي.

كما قدرت كمية ونوعية سموم الأفلاتوكسين التي تنتجها الفطريات في عينات البذور (جدول 3) فيظهر من النتائج أن عينة بذور المدحتية احتوت على أعلى كمية من الأفلاتوكسينات حيث كانت كمية الـ B1 و الـB2 6, 46 و 0,77 نانوغرام/مل على التوالي، في حين احتوت العينات الاخرى على كميات أقل من الأفلاتوكسينات. أن وجود سموم الأفلاتوكسين B1 و B2 يتوافق مع وجود أنواع الفطريات المنتجة لها والتابعة للجنس *Aspergillus* وأن B2 مرافقا" للـB1 في جميع العينات وأن معظم العزلات المنتجة للسم من نوع B2 يجب أن تكون منتجة للسم من نوع B1 أولا"، وهذا يتفق مع نتائج سابقة (21) أشارت الى أن النوعB1 يعتبر المادة الأساس لتكوين النوع B2 وأن تحول النوع B1 الى النوع B2 يتأثر بعدة عوامل من أهمها ارتفاع درجة الحرارة وزيادة حامضية الوسط الذي ينمو فيه الفطر.

جدول 1. يوضح أنواع الفطريات المعزولة من بذور الذرة الصفراء والنسبة المئوية لاصابة البذور.

نوع العينة	الفطريت المعزولة والنسبة المئوية لاصابة البذور بالفطريت						
	A.flavus	*A.niger*	*Al.alternata*	*F.oxysporum*	*P.notatum*	*R.stolonifer*	*Rh.solani*
الحلة	* 51, 5	20, 0	–	6, 4	14, 6	16, 0	4, 9
المسيب	41, 2	22, 4	6, 6	–	14, 8	13, 5	–
القاسم	48, 1	17, 7	14, 3	–	9, 4	12, 3	–
المدحتية	65, 3	38, 6	13, 7	10, 0	15, 5	21, 3	8, 2

* كل قيمة تمثل معدل ثلاث مكررات (كل مكرر 100 بذرة).

جدول 2. يوضح سموم الأفلاتوكسين وكمايتها المنتجة في الوسط الزرعي من قبل الفطر *A. flavus* والفطر *A. niger* .

نوع العينة	نوع الفطر	نوع الأفلاتوكسين وكميته (نانوغرام / مل)	
		B1	B2
الحلة	*A.flavus*	11, 20	0, 33
	A.niger	3, 88	0, 21
المسيب	*A.flavus*	6, 31	0, 50
	A.niger	2, 93	0, 25
القاسم	*A.flavus*	9, 67	0, 82
	A.niger	3, 15	0, 26
المدحتية	*A.flavus*	12, 56	1, 73
	A.niger	4, 27	0, 46

جدول 3 . يوضح سموم الأفلاتوكسين وكمياتها المنتجة في بذور الذرة الصفراء من قبل الفطر *A. flavus* والفطر *A. nige*.

نوع العينة	نوع الفطر	نوع الأفلاتوكسين وكميته (نانوغرام / مل)	
		B1	B2
الحلة	*A.flavus*	5, 22	0, 46
	A.niger	2, 15	0, 28
المسيب	*A.flavus*	3, 11	0, 32
	A.niger	2, 27	0, 21
القاسم	*A.flavus*	2, 94	0, 43
	A.niger	1, 67	0, 19
المدحتية	*A.flavus*	6, 48	0, 19
	A.niger	3, 18	0, 30

المصادر

1. سرحان، عبدالرضا طه و عبد الأمير سمير سعدون (2002). مسح الفطريات المصاحبة لبذور الذرة الصفراء المخزونة في العراق. مجلة جامعة بابل، المجل (7)، العدد (3): 1129 - 1135 .

2. حسين ،حليمة زغير (2000). استعمال اليوريا في مقاومة فطريات ما بعد الجني وسمومها على الذرة الصفراء المخزونة. أطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد.

3. Wicklow, D.T. 1999 . Influence of *Aspergillus flavus* strain on aflatoxin and Bright greenish yellow florescence of corn kernels. Plant Disease. 83: 1146 – 1148.

4.Truksess, M. Leonardstoloff and Mislivec, P. 1988 . Effect of temperature, water activity and other toxigenic mold species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production on corn, pintobeans and soybeans. Food Protection. 51(5): 361 – 363.

5 . الهيتي، أياد عبدالواحد (1992). السموم الفطرية المفهوم العام. وزارة التعليم العالي واالبحث العلمي، جامعة بغداد ، ص20 .

6. Diener, U.L., Cole, R.J., Saders, T.H., Payne, G.A., Lee,L.S. and Klick,M.A. 1987 . Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Ann. Rev. Phytopath. 25: 249 – 270.

7. Kuhn, D.M. and ghannoum, M.A. 2003 . Indoor mold. toxigenic fungi and *Stachybotrys chartarum* infection disease perspective. Clinical Microbiology Reviews. 16: 144 – 172.

8. Orum, T. V., Bigelow, D.U., Cotty, P.J. and Nelson,M.R. 1999 . Using predication based on geostatistics monitor trends in *Aspergillus flavus* strain composition. Phytopathology. 89: 761 – 769.

9. Rustom, Y.S. Ismail . 1997 . Aflatoxin in food and feed : occurrence legislation and inactivation by physical methods. Food Chemistry. Vol. 59, No.1, pp. 57 – 67.

10. Burge, H.A. 2001 . Fungi: toxic killers or unavoidable nuisances. Ann. Of Allergy. 87(3): 52 – 56.

11.Miller, J.D. and Trenholm, H.L. 1994 . Mycotoxins in grain compounds other than aflatoxins. St. Minnesota, USA. Pp.552.

12. Rapper,K.B. and Fennel, D.L. 1966. The genus *Aspergillus.* The Williams and Wilking Co. Battimore. Pp.686.

13. Booth,C. 1971 .The genus *Fusarium*. Common Wealth Mycological Institute, Kew Surrey , England. Pp.237.

14. Ellis,M.B.1971. Dematiuceous hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute, Kew Surrey , England. Pp.403.

15. Pitt,J.I. and Hocking,A.D. 1985 . Fungi and Food spoilage. Academic Press, Sydney,Australia.pp.416.

16.Thomas,F.,Eppley,R.M. and Trucksess,M.W. 1975 . Rapid screening method for aflatoxins and zeralenone in corn J. AOCA. 58(1):114 – 116.

17. الرجو، مها أكرم محمد على (1991). دراسة للفطريات الممرضة والمنتجة للافلاتوكسينات المصاحبة لبذور فول الصويا. رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل.

18. Agarwal,V.K. and Sinclair, J.D. 1987 . Principles of seed pathology. 2nd ed. Lewis Publisher, CRC Press Inc.pp.539.

19.Sinago, S.M.1989 . Controlled atmosphere storage to reduce microflora *(Aspergillus* sp.) and aflatoxin production in maize. Bangkok (Thailand). Pp.61.

20.Viquez,O.M., Elena Castel – Perz, M.,Shelby,R.A. and Brown,G. 1994 . Aflatoxin contamination in corn samples due to environmental conditions, aflatoxin – producing strains and nutrient in grain. Agric. Food Chem. 42: 2551 – 2556.

21. Cleveland, T.E. 1989 . Conversion of Dihydro – o – methylsterigmatatocstin to aflatoxin B2 by *Aspergillus parasiticus*. Archives of Environmental contamination and toxicology. 18: 429 – 433.