SEBHA UNIVERSITY JOURNAL VOL.03 NO. 1 2024
DOI: 10.51984/SUCP.V3I1.3472

مجلة جامعة سبها
Sebha University Journal

Journal homepage: https://sebhau.edu.ly/journal/index.php/CAS

عزل وتعريف سلالتين من الفطريات المقاومة للزئبق *Aspergillus terreusus* و *Fusarium solani* من التربة

نجوى مصطفى شلش[1] و عبدالهادي علي البصير[2] و مسعودة عمر خليفة[2] و منصور فرج الداكل[3]

[1]قسم علم النبات، كلية العُلوم، جامعة سبها، ليبيا
[2]قسم الأحياء الدقيقة، كلية العُلوم، جامعة سبها، ليبيا
[3]قسم الكيمياء، كلية العُلوم، جامعة سبها، ليبيا

الملخص

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتعريف فطري *Aspergillus terreusus* و *Fusarium solani* وإختبار نموهما عند تراكيز مختلفة من معدن الزئبق، استخدم جهاز طيف الامتصاص الذري *Atomic absorption* في تقدير الزئبق قبل وبعد الحقن بالفطريات المعزولة حيث استخدمت عدة تراكيز من المعدن (25، 50، 100، 125، 150، 200 و 300 ملجرام في اللتر) حيث إستطاعت الفطريات المعزولة النمو عند التراكيز العالية (200 و 300 ملجرام في اللتر)، أظهرت النتائج انخفاض في معدل التراكيز المختبرة بعد الحقن والتحضين لمدة سبعة أيام على درجة حرارة 28°م إذ بلغت أعلى قيمة لامتصاص للزئبق عند التركيز 125 ملغم/لتر لفطر *F. solani* بعد فترة تحضين المذكورة. من خلال الدراسة تبين أن الفطريات المعزولة كانت متقاربة من حيث خفض تركيز المعدن قيد الدراسة ووفقاً لذلك فإن الدراسة الحالية تشير إلى أنه يمكن استخدام الفطريات المعزولة كعوامل معالجة بيولوجية للتربة الملوثة بمعدن الزئبق.

الكلمات المفتاحية:

المعادن الثقيلة
الزئبق
فطريات
التربة
معالجة حيوية

Isolation and identification of two strains of mercury resistant fungi *Aspergillus terreusus* and *Fusarium solani* from soil.

*Najwa Mustafa shalash[1], Abdulhadi Ali Albaser[2], Massoudah Omer khalifa[2] and Mansour Faraj Aldakil[3]

[1]Department of Plant science, faculty of science, Sebha university, Libya
[2]Department of Microbiology faculty of science, Sebha university, Libya
[3]Department of chemistry faculty of science, Sebha university, Libya

Keywords:

Heavy metlas
Mercury
Fungi
Soil
Bioremediation

ABSTRACT

The current study included isolating and identifying the fungi Aspergillus terreusus and Fusarium solani and testing their growth at different concentrations of mercury. An atomic absorption spectrometer was used to estimate mercury before and after inoculation with the isolated fungi. Several concentrations of the metal were used (25, 50, 100, 125, 150). 200 and 300 milligrams per liter) the isolated fungi were able to grow at high concentrations (200 and 300 milligrams per liter). The results showed a decrease in the rate of the tested concentrations after inoculation and incubation for seven days at a temperature of 28°C, as the highest value of mercury absorption was reached at a concentration of 125 mg/L for F. solani after the aforementioned incubation period. Through the study, it was found that the isolated fungi were similar in terms of reducing the concentration of the metal under study. Accordingly, the current study indicates that the isolated fungi can be used as biological treatment agents for soil polluted with mercury.

المقدمة

المعادن الثقيلة Heavy metals هي التي تزيد كثافتها عن 5 غم / سم^3، و يعزى التلوث المعدني للتربة والنباتات إلى نشاطات الإنسان الصناعية المتعددة من صهر للمعادن وطلائها وسائر الأعمال المعدنية الأخرى بالإضافة إلى صناعة الجلود ودباغتها، وذلك لما ينتج عنها من غازات ودخان وما يتسرب منها من

*Corresponding author.
E-mail addresses: na.zjer@sebhau.edu.ly ,(A.A.Albaser) abd.albaser@sebhau.edu.ly, (*M. O. khalifa*) mas.khalefah@sebhau.edu.ly , (M. F. Aldakil) mans.faraj@fsc.sebhau.edu.ly

Article History : Received 27 January 2024 - Received in revised form 13 May 2024 - Accepted 25 May 2024

كيماويات إلى الماء وما تُخلّفه من نفايات. يُعد تلوث المياه والتربة بالمعادن الثقيلة واحدة من أخطر المشاكل البيئية في العقود القليلة الماضية مما يتطلب تطوير تقنيات يمكنها إزالة أيونات المعادن الثقيلة السامة الموجودة في البيئات الملوثة. إن وجود المعادن الثقيلة له تأثيرات على صحة الإنسان فهي تؤثر سلباً على عملية التمثيل الغذائي وتعطيل عمل الخلايا مع حدوث طفرات وقد تكون سامة حتى عند مستويات منخفضة وقد تكون حادة مما يسبب التعرض لها حدوث سرطانات مختلفة [1]، سمية الزئبق تقلل من حجم السكان، وتفسد البروتين، وتعطل غشاء الخلية، وتمنع وظيفة الإنزيم. وهو سم عصبي يمكن أن يؤثر على الجهاز العصبي المركزي. إذا تم تجاوزه في التركيز، فإنه يمكن أن يسبب ألم في الصدر وضيق التنفس وحدوث تشوهات خلقية وتلف في خلايا المخ والجهاز العصبي[2]. نظرا لأن الأحياء المجهرية الهوائية واللاهوائية استخدمت كمعالجة حيوية للتخلص من المعادن الثقيلة ساهمت هذه الأحياء في عمليات إزالة التأثير السام للعديد من هذه العناصر حيث من المعروف أن العناصر الثقيلة لا يمكن التخلص منها بيولوجياً (غير قابلة للتحلل no degradation لكن يمكن تحويلها الى مركبات عضوية معقدة [3] طورت الكائنات الحية الدقيقة قابليتها لحماية نفسها من سمية العناصر الثقيلة؛ من خلال امتلاكها عدة ميكانيكيات مثل: الامتزاز أو الادمصاص Adsorption والامتصاص Uptake والأكسدة Oxidation والاختزال Reduction [1].

إن كفاءة الغزل الفطري في امتصاص المعادن ناتج من تركيب الجدار الخلوي للخيوط الفطرية، حيث يتكون من مجموعة من المركبات مثل polysaccharides والبروتين وهذا الاخير متكون من مجموعات ثانوية مثل: carboxyl و hydroxyl وكذلك يحتوي على الفوسفات ومجاميع من الاحماض الامينية وكل هذه المجاميع من المواد تعمل على الارتباط مع جزيئات العناصر الثقيلة [4].

تهدف الدراسة الحالية إلى عزل فطريات قادرة على النمو في وجود تراكيز مختلفة من معدن الزئبق ومدى تأثيرها عليه والتي قد تسمح بإستخدامها في المعالجة الحيوية للتخلص من هذا المعدن السام.

المواد وطرق العمل

جُمِعت عينات التربة من فناء كلية العلوم (جامعة سبها) بالقرب من القاطع A. من موقعين مختلفين ، الموقع الأول كان من تربة الريزوسفير لشجرة نبات الفيكس (*Ficus retusa*) والموقع الثاني ريزوسفير شجرة نبات النخيل (*Phoenix dactylifera* L.)، من كل موقع جمعت خمس عينات من التربة وذلك بواسطة ملعقة معقمة بحيث أخذت بشكل عشوائي ومن عمق يقارب 10 سم حوالي 5جم من التربة و نقلت إلى المختبر في أنابيب بلاستيكية معقمة وحفظت في الثلاجة عند 4°م إلى حين الاستخدام.

عزل الفطريات

عُزِلت الفطريات كما وصف من قبل [5]، بطريقة التخفيفات العشرية على الوسط الغذائي الصلب Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

تعريف الفطريات المعزولة

تم تشخيص الفطريات بالمعاينة الميكروسكوبية لتحديد المواصفات الخارجية للمستعمرة والصفات التركيبية للعزل الفطري والأعضاء التكاثرية.حيث استخدمت طريقتين لتعريف العزلات الفطرية، في كلا الطريقتين نميت العزلات أولاً على أطباق بترية محتوية وسط SDA، وحضنت على درجة 30°م ولمدة سبعة ايام. في الطريقة الاولى تم وضع ورقة ترشيح معقمة في طبق بتري وسكب عليها ماء مقطر ومعقم، ومن ثم وضع عليها شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة، ثم وضع على هذه الشريحة جزء من الوسط السالف الذكر والنامي عليه الفطر، وحضن الطبق بما يحتويه على درجة حرارة 28°م ولمدة 7 أيام، وبعد ذلك تم التعرف على الفطريات المعزولة بفحصها تحت المجهر حيث شخصت بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية [6، 7]. الطريقة الثانية فيها تم ملء عبوة ابرة التلقيح (Loop) بالأبواغ الفطرية، ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة، ثم اضيف لها قطرة من الكحول الإيثيلي (70%)، ثم صبغت بإضافة قطرة من محلول لاكتوفينول، وغطيت بغطاء الشريحة، ومن ثم فحصت تحت المجهر الضوئي.

درجة الحرارة المثلى للنمو

أجري هذا الاختبار في أطباق بتري تحتوي على الوسط المغذي الصلب Potato Dextrose Yeast extract Agar (PDY)، ثم حُضنت الأطباق في درجات حرارة مختلفة (20، 25، 30، 35، 40 و 45°م) لمدة سبعة أيام.

درجة الأس الهيدروجيني الأمثل للنمو

أجري هذا الاختبار في أطباق بتري تحتوي على الوسط المغذي الصلب (PYD)، بعد ضبط قيمة الأس الهيدروجيني عند درجات مختلفة من الحموضة تراوحت من 4 إلى 7.5، بواسطة حمض الهيدروكلوريك المخفف، مدة التحضين كانت مشابهة لاختبار درجة الحرارة المثلى إلا أن درجة التحضين كانت 28°م.

إختبار مدى تحمل الفطريات المعزولة لمعدن الزئبق

اختبر تحمل العزلات الفطرية للزئبق باستخدام الوسط الغذائي السائل (PDY) مضافاً إليه الزئبق عند تراكيز مختلفة (25، 50، 100، 125، 150، 200 و 300 ملجرام في اللتر) حيث نميت فطريات الدراسة في أنابيب إختبار تحوي الوسط المغذي (10 مل) والمضاف إليه التراكيز المذكورة كلا على حدة وبواقع ثلاث تكرارات وحضنت عند درجة 30°م لمدة سبعة أيام مع الرج (150 دورة في الدقيقة) مع الملاحظة اليومية لنمو العزلات وقيست الامتصاصية لعنصر الزئبق باستخدام جهاز الامتصاص الذري وسجلت الامتصاصية قبل الزرع وبعده.

جهاز الامتصاص الذري Atomic absorption

تم تعيين تركيز الزئبق باستخدام ثقنية مطياف الامتصاص الذري (AAS) مزوداً بتقنية اللهب ناتج من احتراق المزيج الغازي الهواء/الاسيتلين تحت ظروف الية متمثلة في طول موجي بلغ 253nm مصدره مصباح المهبط المجوف Hallow Cathode Lamp ومنحنى معايرة تم تحضيره من محلول قياسي من الزئبق تركيزه 1000mg/L.تم حساب النسبة المئوية للمعدن المتبقى في العينات المختبرة حسب المعادلة التالية:-

النسبة المئوية (%) للمعدن المتبقي=

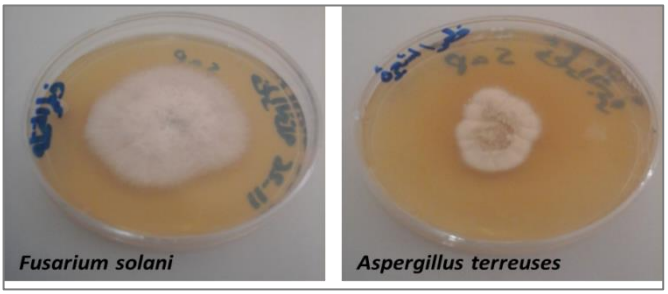
$$\frac{\text{تركيز المعدن بعد الزرع والتحضين}}{\text{تركيز المعدن قبل الزرع}} \times 100$$

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الإحصائي باستخدام برنامج spss بطريقة اختبار التباين(Analysis of variance test (ANOVA, باستخدام أقل فرق معنوي a=0.05

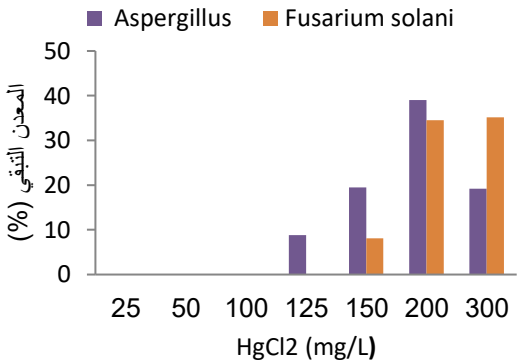
النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج العزل الحصول على نوعين من الفطريات ينتميان إلى طائفة "شعبة" الفطريات الأسكية Ascomycota هما *Aspergillus terreuses* و *Fusarium solani*، اعتمد التحديد الميكروبيولوجي على ملاحظة العديد من الخصائص المورفولوجية على الأوساط الغذائية (شكل1)، كنوع الميسليوم، والحامل الكونيدي، ونوع ولون الجراثيم والأجسام الثمرية، وتحديد لون المستعمرة وشكلها وملمسها (Moubasher, 1993; Pitt & Hocking, 1997). عزل فطر *A. terreuses* من تربة رايزوسفير شجرة الفيكس، بينما فطر *F. solani* فعزل من رايزوسفير شجرة النخلة، وكان النوع *A. terreuses* أكثر تواجداً وانتشاراً في منطقة الدراسة من النوع *F. solani*.



شكل (1) نمو الفطريات المعزولة على الوسط الغذائي الصلب SDA

أظهر الفحص الظاهري اليومي خلال فترة التحضين نمو الفطريات المعزولة ولوحظ زيادة يومية في كثافة النمو خاصة عند التراكيز (25-125 ملجرام في اللتر) وبدرجة أقل عند التراكيز(150- 300 ملجرام في اللتر) من المعدن وهذا ربما يرجع إلى انخفاض كمية الوسط الغذائي لأن حجم المعدن كان يمثل ثلاث أرباع من حجم العينة الكلي (7.5 مل) في حين أن حجم الوسط الغذائي فكان يمثل الربع (2.5 مل) ولا نعتقد أن السبب هو سمية الزئبق لوجود النمو فلو كانت السمية موجودة لما استطاع الفطر النمو عند هذا التركيز أو حتى عند نركيز أقل. بينت النتائج أن العزلات أكثر نمواً في درجات حرارة 25°م - 30°م حيث لوحظ أن عند درجة حرارة 30°م كانت الأمثل للنمو وهذه الدرجة مقاربة لدرجة الحرارة المثلى لنمو أغلب الفطريات 28°م وهذا ما أكدته النتائج المتحصل عليها من جهاز طيف الإمتصاص الذري الذي أظهر إنخفاضاً في كمية الزئبق المتبقى في العينة المحضنة عند 30°م (شكل2)



شكل2 النسبة المئوية لمعدن الزئبق المتبقي في الوسط الغذائي(PYD) بعد الحقن بالفطريات والتحضين على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام.

أما الأس الهيدروجين (pH) فبينت النتائج أن النسبة المثلى للامتصاص الحيوي كانت عند pH4 وهذا ربما يرجع لعمل أنزيم Mercuric reductase.

يتضح من الشكل (2) أن جميع العينات أظهرت إنخفاضاً في الزئبق المتبقى عند جميع التراكيز المختبرة، حدثت فروق معنوية في التراكيز من 125- 300 ملجم/ لتر وهذه ذات دلالة إحصائية بين التراكيز عند الفطر الأول *Fusarium solani* والثاني *Aspergillus terreus* حيث كانت القيمة الاحتمالية (P-value<0.01) أقل من مستوي الدلالة وهذا يعني وجود فروق بين متوسطات التراكيز عند الفطر الأول والثاني لمعدن الزئبق (شكل 2) وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى استخدام سلالات *Aspergillus Sp, Fusarium sp* في إزالة المعادن الثقيلة وفحص قدرتها على التحمل في التربة [8،9،10]. يعتقد الكثير من الباحثين أن للفطريات إمكانات أكبر للمعالجة عن طريق نموها الغزير وزيادة الكتلة الحيوية ، والوصول الواسع النطاق في التربة. علاوة على ذلك ، فقد تم استخدام الفطريات على نطاق واسع في المعالجة الحيوية الصناعية تلوث التربة والمياه ، وتحديداً في إزالة الهيدروكربونات والمعادن الثقيلة [11،12] ووفقاً لذلك فإن الدراسة الحالية تشير إلى أنه يمكن استخدام الفطريات المعزولة كعوامل معالجة بيولوجية للتربة الملوثة بمعدن الزئبق. وبما أن التلوث بالمعادن الثقيلة كالزئبق وغيره يُعد من المشاكل البيئية الخطرة في كل دول العالم نظراً لعدم تحللها [13] عليه توصي الدراسة الحالية بإختبار نمو الفطريات المعزولة عند مستويات أعلى من معدن الزئبق وأيضاً إختبار نموها في وجود أنواع أخرى من المعادن الثقيلة.

المراجع

[1]- الطائي، إقبال عوفي والبيضاني، عباس حميد محمد والسعد، حامد طالب. 2015. تقيم تلوث رواسب هور العظيم بالعناصر الثقيلة محافظة ميسان جنوب العراق. *مجلة علوم ذي قار*، مج. 5، ع. 2، ص ص. 11-18.

[2]- BAHOBIL, A., BAYOUMI, R., ATTA, H. & EL-SEHRAWEY, M. J. I. J. C. M. A. S. 2017. Fungal biosorption for cadmium and mercury heavy metal ions isolated from some polluted localities in KSA. 6, 2138-2154.

[3]- GARBISU, C. & ALKORTA, I. J. B. T. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. 77, 229-236.

[4]- FOMINA, M. & GADD, G. M. J. B. T. 2014. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. 160, 3-14.

[5]- Clark, F. E. (1979). Agar plate method for total microbial count in method in soil analysis. Ayron Pp(1460-1466), Madison, Wisconsin., U.S.A.

[6]- Moubasher, A. H. (1993). Soil fungi in Qatar and other Arab countries. The scientific and applied research center. University of Qatar

[7]- Pitt, J. T. and hocking, A. D. (1997). Fungi and Food spoilage. Academic Press London, 405pp.

[8]- Gadd, G. M. (1992). Metals and microorganisms: a problem of definition. FEMS Microbiol Lett 100, 197- 204.

[9]- AL-GARNI, S., GHANEM, K. & BAHOBAIL, A. J. A. J. O. B. 2009. Biosorption characteristics of Aspergillus fumigatus in removal of cadmium from an aqueous solution. African Journal of Biotechnology, 8, 4163-4172.

[10]- BAHOBIL, A., BAYOUMI, R., ATTA, H. & EL-SEHRAWEY, M. J. I. J. C. M. A. S. 2017. Fungal biosorption for cadmium and mercury heavy metal ions isolated from some polluted localities in KSA. 6, 2138-2154

[11]- Potin, O., Rafin, C. and Veignie, E., 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *54*(1), pp.45-52

[12]- Gouda, S., Taha, A. (2023). 'Biosorption of Heavy Metals as a New Alternative Method for Wastewater Treatment: A Review', Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 27(2), pp. 135-153. doi: 10.21608/ejabf.2023.291671.

[13]- Taha, A.; Hussien, W. and Gouda, S. A. (2023). Bioremediation of Heavy Metals in Wastewaters: A Concise Review. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., 27(1): 143–166. https://doi.org/10.21608/ejabf.2023.284415