SEBHA UNIVERSITY JOURNAL OF PURE & APPLIED SCIENCES VOL.22 NO. 1 2023
DOI: 10.51984/JOPAS.V22I1.2550

مجلة جامعة سبها للعلوم البحتة والتطبيقية
Sebha University Journal of Pure & Applied Sciences

Journal homepage: www.sebhau.edu.ly/journal/index.php/jopas

عزل والتعرف على الفطريات النامية على بعض عينات الأرزوالقمح المتداولة بالمحلات بمنطقة براك الشاطي – ليبيا

سارة احمد أبوكليش[1] و *جمال إبراهيم الزوي[1] و البشير محمد يحمد[2]

[1]قسم تقنية الأغذية - كلية علوم الاغذية – جامعة وادي الشاطي
[2]قسم المختبرات الطبية – كلية التقنية الطبية – جامعة وادي الشاطي

الملخص

يعتبر القمح والأرز من الأغذية شائعة الاستهلاك في ليبيا، وركزت هذه الدراسة على عزل الفطريات المحتمل نموها على هذه الأغذية مع التركيز على الفطريات المنتجة للسموم الفطرية كفطر *Aspergillus*. استعمل في هذه الدراسة عدد ثمانية عينات من الارز وثلاثة عينات من القمح والتي جمعت من السوق المحلي بمدينة براك – الشاطئ، ليبيا واتضح من خلال النتائج ان تلوث العينات بالفطريات كان مرتفع سواء قبل او بعد المعاملة بالمحلول الكلوريني تركيزه (2%). وبالرغم من ان عملية الغسيل قللت العدد الا ان الفطريات المنتجة للسموم الفطرية لازالت موجودة. عزلت 13 سلالة فطرية من العينات وتم التعرف عليها ظاهريا وعرفت على انها *Aspergillus niger, A. flavus, A. terreus, A. carbonarius, A. parasiticus, A. ochraceus, A.* terreus, *Mucor, Rhizopus and Cladosporium*. وكانت بيئة روز بنغال تليها بيئة اجار مستخلص الشعير واجار مستخلص البطاطس والدكستروز من أفضل البيئات الغذائية عزلا للفطريات المتواجدة بالعينات. واختيرت السلالات المتوقع انها تنتج السموم الفطرية اعتمادا على الشكل الظاهري ولون المستعمرات الفطرية واختبرت باستعمال ورق ترشيح مشبع بمحلول الامونيا تركيزه (20%) واتضح من خلال النتائج أنها تنتج الافلاتوكسينات والاوكراتوكسين واستدل على ذلك بتغير لون ورق الترشيح المشبع بالأمونيا الي اللون البرتقالي المحمر. وجود مثل هذه الفطريات في الأغذية يمثل خطرا على الصحة العامة نظرا لما تسببه من مخاطر قد تصل الي تكون الأورام السرطانية والفشل الكلوي.

الكلمات المفتاحية:

الارز
الافلاتوكسين
الاوكراتوكسين
القمح
الكلورين

Isolation and Identification of fungal genera growth on some Barley and rice samples retailed at Brack/Ashati supermarkets.

Sarah A Aboukaleesh[1] , *Jamal I. Elzwai[1], Albashir Mohamed Yhmad[2]

[1] Food Technology Department, Faculty of Food Science, - Wadi Ashati University, Libya.
[2]Department of Medical Laboratory Science, Faculty of Medical Technology -Wadi Ashati University, Libya.

Keywords:

Rice
Wheat
Aflatoxin
Ochratoxin
Chlorine

ABSTRACT

The Wheat, barley and rice are the mainly consumed cereals in Libya. This study aimed to isolate the fungal genera of these cereals with special focus on the mycotoxigenic fungi (*Aspergillus*) species. Samples type of rice (8 samples) and wheat (3 samples) were collected from the local market in Brack – Ashati, Libya Samples were found heavily contaminated with fungi either before or after surface sterilization with 2% chlorine solution, even though surface sterilization reduced the count but mycotoxigenic fungi still present. A total of 13 isolates were obtained and were identified through the morphological characters such as colony colour, mycelium diameter, spore size and colour and identified as *Aspergillus niger, A. flavus, A. terreus, A. carbonarius, A. parasiticus, A. ochraceus, A. terreus, Mucor, Rhizopus and Cladosporium.* Fungal isolates which suspected to produce mycotoxins were studied to investigate their ability to produce mycotoxins using ammonia solution (20%) and the results indicated aflatoxins and ochratoxin A production. The colour of the filter paper which hsa been

*Corresponding author:
E-mail addresses: j.elzwai@wau.edu.ly ,(A. M. Yhmad) a.yhmed@wau.edu.ly, (S. A. Aboukaleesh) s.boklish@wau.edu.ly
Article History : Received 26 April 2023 - Received in revised form 02 June 2023 - Accepted 30 June 2023

previously immersed in ammonia solution indicate the presence of these mycotoxins. Presence of such fungal genera in foods can cause a severe problem to the health such as cancer and kidney failure.

المقدمة

الحبوب ومشتقاتها تعتبر من الأغذية التي تستهلك بشكل يومي، وهذه الحبوب قد تكون عرضة للتلوث بالكائنات الحية الدقيقة عامة وبالفطريات وسمومها بشكل خاص والتي تعد من المشاكل التي تسعى المنظمات الدولية ومنظمة الصحة العالمية ومنظمة الأغذية والزراعة إلى وضع اللوائح والقوانين التي تنضم عملية تداول المنتجات الزراعية والمواد الغذائية. وقد اهتم الباحثون بدراسة وتحليل الملوثات الغذائية وتحديد كمياتها والأضرار والأمراض الناجمة عنها. مثل هذه الأمراض تسبب الخسائر الفادحة ليس للشخص المريض فقط بل تمتد لصناعة الغذاء والاقتصاد القومي، وتقدر الخسارة حوالي 4.8 -7.7 مليون دولار سنويا [1,2] حيث أدى إلى زيادة الاهتمام والوعي لدى المختصين في الملوثات وأضرارها وأنشئت هيئات تقوم بمراقبة سلامة الأغذية من الملوثات وسن القوانين التي تنظم ذلك [1].

تعتبر السموم الفطرية من أقوى السموم المعروفة والتي تسبب أمراضاً خطيرة بتركيزات ضئيلة تصل إلى أقل 10 جزء في البليون ويرجع السبب في قوتها إلى أنها مقاومة للحرارة بدرجة يصعب إتلافها بواسطة المعاملات الحرارية التقليدية المستخدمة في التصنيع والطهي والسبب الثاني أنها تنتشر بسرعة من مستعمرات الفطر إلى الأغذية. وتعرف السموم الفطرية بأنها ناتج أيضي ثانوي لبعض أنواع الفطريات السامه وهي مركبات مختلفة التركيب الكيماوي وقد ينتج الفطر الواحد أكثر من سم فطري وحالياً يوجد أكثر من 200 نوع من السموم الفطرية تسبب مشاكل صحية للإنسان والحيوان [3] تكمن المشكلة الحقيقة للسموم الفطرية في كونها ذات أوزان جزيئية منخفضه لا تحفز الجهاز المناعي لمعادلة سميتها فضلاً عن مقاومتها لدرجات الحرارة المستخدمة في طهي الغذاء [4] . تتسبب السموم الفطرية في إحداث الطفرات الوراثية مع إضعاف فعالية الجهاز المناعي والجهاز التناسلي وغيرها من الأمراض ولا يوجد في الوقت الحاضر منطقة خالية من التلوث بالسموم الفطرية وتأثيرها السلبي على صحة الأنسان [5]

و ازداد الاهتمام في الأونة الأخيرة بالسموم الفطرية لما تسببه من خسائر اقتصادية نتيجة سرعة انتشار الفطريات وسمومها في مختلف الأغذية والمحاصيل الزراعية وقد أشارت تقارير منظمة الصحة العالمية إلى أن ما لا يقل عن 25% من الأغذية في العالم ملوثة بالسموم الفطرية ومن أهم هذه السموم الفطرية التي توجد في الأغذية والأعلاف هي الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين، الزيرالينون، الفومونيزين، والديوكسي فالينول [7,6] وتنتج من قبل أنواع محددة لبعض الأجناس الفطرية أهمهم *Penicillium, Fusarium , Aspergillus,* بحيث تكون هذه الفطريات مسؤولة عن انتاج ثلتي هذه السموم عند نموها على أغذية أو أعلاف محتوية على مواد كربوهيدراتية، وقد تنمو هذه الفطريات على المحاصيل في الحقل أو تنمو على الأغذية والحبوب عند تخزينها تحت ظروف ملائمة من درجات الحرارة والرطوبة لنوها و إفراز للسموم [8 , 9] حيث يؤدي سوء التخزين للسلع الغذائية كالحبوب والبذور والفواكه المجففة والمكسرات والقهوة والكاكاو والتوابل والبقوليات وغيرها إلى إطلاق العديد من السموم الفطرية في الغذاء حيث يساعد على نمو المكروبات والجراثيم خاصة الفطريات التي تعمل على إفراز انزيمات هاضمة تحلل المواد الكربوهيدراتية والبروتينية للحبوب والثمار والأعلاف المخزنة مما يؤدي إلى إتلافها وافراز الفطريات للسموم الفطرية كنواتج تمثيل ثانوية لها بالتالي يكون المستهلك لهذه الأغذية معرضا للسموم الفطرية إما بطريقة مباشرة أو غير مباشرة [10]

المواد وطرق العمل

العينات المستهدفة في هذه الدراسة شملت 8 عينات من الارز (A, B, C, d, E, F, G, H) وثلاثة عينات من القمح (قمح صلب كريم، قمح صلب بني، قمح صلب سلمبو). حيث تم تجميع العينات من السوق المحلى بمدينة براك الشاطئ – ليبيا، جميع العينات معبأة في عبوات تحتوي على بطاقة تعريف تتضمن اسم المنتج وبلد المنشأ وتم نقل العينات إلى معمل الأحياء الدقيقة بكلية علوم الاغذية – جامعة وادي الشاطي لحين اجراء الاختبارات عليها.

الأوساط الزراعية التي استخدمت للدراسة:

استخدم في هذه الدراسة أربعة أوساط غذائية مخصصة لنمو الفطريات وهي بيئة اجار البطاطس والدكستروز (PDA)، بيئة اجار مستخلص الشعير (MEA)، بيئة اجار السابرود والدكستروز(SDA) وبيئة اجار روز بنغال كلورومفنكول (RBCA). جميع الاوساط مصنعة من قبل شركة (Oxoid, UK) وحضرت هذه الأوساط الغذائية تحت ظروف التعقيم تبعا للتعليمات الواردة من الشركة المصنعة لها.

عزل والتعرف على الفطريات المحتمل تواجدها على حبوب القمح والأرز:

الزراعة المباشرة تعتبر أحد أفضل الطرق العملية لعزل والتعرف على الفطريات التي تلوث الحبوب ومنتجاتها. تم استعمال طريقتين للمقارنة بينهما لعزل والتعرف على الفطريات الملوثة للعينات، حيث استخدم محلول كلوريني تركيزه (0.2%) تم تحضيره بالمعمل باستعمال الصوديوم هيبوكلوريت لغسل وتعقيم عينات الارز والقمح في محاولة لإزالة التلوث الخارجي للحبوب، ثم غسلت العينات بماء مقطر معقم (3مرات) مع الرج القوي للتأكد من إزالة المحلول الكلوريني وتركت إلى ان تجف تحت ظروف التعقيم [10] . نقلت 5 حبات من كل عينة و زرعت على الاوساط الغذائية المحضرة و المتصلبة و حضنت الاطباق على درجة حرارة 25 °م لمدة 5 ايام. كما تم زراعة العينات بدون تعقيم مباشرة على الاوساط الغذائية وحضنت تحت نفس الظروف السابقة [11]

التعرف على الفطريات المعزولة

اعيد زراعة الفطريات النامية على بيئة اجار السابرود لغرض تنميتها و عزلها في مزارع نقية و حضنت على 25 °م لمدة 5 أيام. بعد التحضين تم التعرف على الفطريات المعزولة ظاهريا وتحت المجهر حسب الطريقة الموضحة بواسطة [10,12]

الكشف عن انتاج السموم الفطرية بواسطة الفطريات المعزولة

تم الكشف عن مقدرة الفطريات المعزولة باستعمال محلول الأمونيا بتركيز 20% حسب ما ورد في [13] حيث غمرت اوراق الترشيح بالمحلول و وضعت في غطاء الطبق البتري المحتوي على العزلات الفطرية وحضنت الأطباق على

درجة 25°م لمدة 3 – 5 أيام و ملاحظة حدوث تغير في لون المستعمرات وفي ورقة الترشيح المشبعة بالأمونيا من اللون الشفاف إلى اللون البرتقالي أو الأحمر و هذا يعتبر دليل على قدرة العزلات على انتاج السموم.

النتائج والمناقشة

جدول (1) يوضح النسبة المئوية للتلوث لكل من العينات المعاملة والغير معاملة بالمحلول الكلوريني تركيزه (0.2 %)، ومن خلال الدراسة تبين وجود تلوث فطري عالي بالعينات قبل المعاملة بالمحلول الكلوريني. وبالرغم من ان عملية الغسيل للعينات قللت من نسب التلوث بها الا ان الفطريات المنتجة للسموم الفطرية لازالت موجودة في بعض العينات.

تم عزل 13 سلالة فطرية من العينات المدروسة وبعد اجراء المعاملة للكشف عن انتاج السموم الفطرية باستعمال ورق الترشيح المشبع بمحلول الامونيا (0.2%) [13] فقد وجد ان 10% من العزلات منتجة للسموم الفطرية و استدل على ذلك بالتغير في لون ورق الترشيح المشبع بالأمونيا و كذلك على سطح النمو، وتجدر الاشارة هنا الي ان جميع العينات ملوثة بالفطريات المنتجة للسموم و عزلت فطريات *Aspergillus flavus* , *A. parasiticus* المنتجة لسموم الافلاتوكسينات من عينات الارز (A–H–G–D) ومن عينات القمح (سلامبو– بني – كريم)، بينما الفطريات المنتجة لسم الاوكراتوكسين(*A. ochraceus* , *A. carbonarius*) فقد عزلت من عينات الارز (H-G–F–E–C–B) ومن عينات القمح (سلامبو– بني – كريم). ومن خلال ما تبين فأن نتائج هذه الدراسة تتفق مع دراسة اجراها [14]حيث لاحظ ان اهم الفطريات المنتجة للسموم تتبع الاجناس *Aspergillus, Penicillium,* وبعض الاجناس الفطرية الاخرى خلال تواجدها في الحقل او اثناء الحصاد والتخزين.

ان استخدام محلول كلوريني تركيزه (0.2%) لمدة دقيقتين لتطهير وتعقيم الحبوب يعتبر غير كافي وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة [16,15]حيث اتضح من النتائج المتحصل عليها بأن هذا التركيز غير كاف لتطهير وتعقيم الحبوب من النمو الفطري. وفي دراسة اخرى اجراها [17] والذي استعمل تركيز اعلى من المحلول الكلوريني ولفترة زمنية اطول لم تقلل او تقضي على الفطريات الملوثة للعينات. كما ان دراسة اخرى اجراها [16,18] لم تعطي نتائج جيدة لتطهير سطح الحبوب الملوثة بفطريات *A. flavus* , *A. parasiticus* بواسطة المحلول الكلوريني لمدة دقيقتين. ان استعمال تراكيز اعلى من المحلول الكلوريني ولفترة زمنية اطول لغرض تطهير وتعقيم سطح الحبوب والارز ربما يؤدي الي ظهور روائح غير مرغوبة وبالتالي يؤدي الي رفض المستهلك لهذه المنتجات وكذا الحيوان. في دراسة اجراها [14] استعمل فيها الغسيل بكحول الايثانول متبوعا بالغسيل بالمحلول الكلوريني لمدة دقيقتين وتحصل على نتائج مقبولة على عينات ملوثة بالفطريات ماعدا فطريات *A. flavus, A. parasiticus* والتي من المحتمل انها تحتاج لمعاملات ادق لإزالتها من سطح الحبوب. ومن الارجح ان استعمال الايثانول كمادة غسيل اولية لسبب انه يقوم بالحد من نشاط الجراثيم الفطرية وايضا ترطيب الحبوب ليسهل ازالة القشور وما تحتويه من نمو فطري عند اجراء عملية الشطف بالماء المقطر المعقم.

جدول (1) يوضح النسبة المئوية للتلوث لكل من العينات المعاملة والغير معاملة بالمحلول الكلوريني تركيزه (0.2%)

العينات / المعاملة	A		B		C		D		E		F		G		H		قمح صلب بني سويف		قمح صلب كريم		قمح طري سلمبو	
	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد	قبل	بعد
MEA	100	70	80	20	100	20	100	40	100	40	90	20	100	70	100	60	100	60	100	80	100	40
PDA	100	20	100	60	100	80	80	60	100	60	100	80	100	80	100	60	80	40	100	60	100	60
RBCA	100	20	80	60	100	80	80	40	40	20	80	60	100	80	100	80	100	20	100	60	100	80
SDA	80	20	100	86	100	80	80	40	40	20	80	60	100	80	100	80	100	20	100	60	100	80

MEA=Malt extract agar, PDA=Potato dextrose agar, RBCA=Rose Bengal chloramphenicol agar, SDA=Sabouraud dextrose agar

جدول رقم (2) يوضح الفطريات المعزولة والسموم المنتجة بواسطتها من عينات الأرزوالقمح.

لعينات	A	B	C	D	E	F	G	H	قمح صلب بني سويف	قمح صلب كريم	قمح طري سلمبو
العزلات	*Aspergillus nidulans* *A. flavus*	*A. carbonarius* *A. fumigatus* *Rhizopus*	*A. carbonarius* , *A. ochreceus* *Mucor*	*A. flavus* *Cladosporium* spp.	*Rhizopus* *A. carbonarius*	*A. carbonarius* *Mucor* *Rhizopus*	*A. ochraceus,* *A. carbonarius,* *A. parasiticus*	*A. terreus* *A. carbonarius,* *A. flavus*	*A. carbonarius* *A. parasiticus* *Mucor* *Ochraceus*	*A. carbonarius* *A. flavus* *Rhizopus*	*A. carbonarius* *A. flavus* *A. niger*
انتاج السم	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
باستعمال ورق	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
الامونيا		-	-			-	+	+	-	-	+

المراجع:

[1]- **Gilbert, J. (1984).** Analysis of food contamination. Elsvier *App.Sci.Pups*.,London

[2]- **Zakrzewski, S. F (1991).** Principle of environ mental toxicology. ACS professional reference book, Washington, DC,1.

[3]- **وهبة، ناهد محمد؛ النسر، نفين عبدالغني(2010).** السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها والخطر والوقاية. مجلة أسيوط للدراسات البيئية، العدد الرابع والثلاثون، أسيوط، مصر.

[4]- **Ciegter, A; Burmeister, H. R. and Vesonder, R. F. (2011).** Poisonous fungi: Mycotoxin and mycotoxicosis in fungi pathogenic for human and animal. Part B. Pathogenicity and Detection: 1" (D.H .Howard and L.F. Howard eds.). pp. 413-469.

[5]- **Verma, R.J. (2004).** Aflatoxin cause DNA damage. Int. J. Hum. Genetic 4:231-236.1

[6]- **Perczak, A., Golinski, P., Marcin Bryla, M. and Waskiewicz, A. (2018).** The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arh Hig Rada Toksikol*.69:32-45

[7]- **Vasanthi, S. and Bhat, R. V. (1998**). Mycotoxins in food – occurrence, health and economic significance and food control measures. *Indian. J. Med. Res.*,108:212-224.

[8]- **Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Ahmed W. and Khan, A. (2008).** Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored Wheat grains in to aflatoxinogenic and non –aflatoxinogenic. *Pakistan Journal of Botany*,40:2177-219

[9]- **السروي، (2009).** التلوث البيئي الطبيعية المصدر – التأثيرات – المكافحة والتحكم. المكتبة الدار العالمية، القاهرة.

[10]- **Samson, R., Hokstra, E. S., Frisvad, J. C. and Filteenborg, O. (2002).** Methods for detection and isolation in food-born fungi Introduction to food fungi 6th Ed. Centraalbureau voor schimmel cultures, Baarn pp76-77.

[11]- **Samson, R., Houbraken, J., Thrane,U., Frisvad, J., C. and Andersen, B. (2010).** Food and Indoor Fungi CBS-KNAW Fungal Biodiversity centre, Utreach , The Netherlands.

[12]- **Pitt, J. I., Hocking, A. D., Samson, R. A. and King, A. D. (1997).** Recommended methods for mycological examination of foods, 1992. In: R.A. Samson *et al.* (editors), Modem Methods in Food Mycology, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 365-368.

[13]- **Saito, M. and S. Machida (1999).** A rapid identification and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience*,40:205-208.

[14]- **Elzwai, J. I., Aidoo, K. E., Candlish, A. G. (2005).** Mycroflora and occurrence of ochratoxin A in cereals of North African origin. Poster presented in the conference on Reducing Impact of Mycotoxins in tropical Agriculture with Emphasis on Health and Trade in Africa. Accra, Ghana, 13-16 September 2005.

[15]- **Andrews, S. (1986).** Optimisation of conditions for the surface disinfection of sorghum and sultanas using solutions. In: A.D King,

[16]- **Frisvad, J. C., Kristensen, A. B. and Filtenborg, O., Frisvad, J. C., Thrane, U. (1986).** Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102.

[17]- **Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (1992). Fungi and** food spoilage. Blackie Academic and professional. London.

[18]- **Sauer, D. B., and Burroughd, R. (198**6). Disinfection of seed surface with sodium hypochlorite. *Phytopathology*,76:745-749.