تحديد الفطريات النامية على كسب القطن والسموم الناتجة عنها

عبد الرسول خضر البياتي صفاء زكريا بكر التكريتي
كلية الزراعة – جامعة تكريت

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة من اجل معرفة وتشخيص السموم المؤثرة في كسب القطن المخزونة في مخازن مصانع المنصور للزيوت النباتية في بيجي وقد أوضحت نتائج التحليل الميكروبي المتضمنة تشخيص وتنقية وعزل الفطريات المرافقة لكسب القطن أن الفطر A spergillus flavus كان يشكل السيادة ثم تلاه الفطر Alternaria و Penicillium و Fusarium . فيما أوضحت نتائج الكشف عن وجود الافلاتوكسين في مستخلص كسب القطن باستخدام طرق التحليل الكروناتوكرافية (صفائح الكروماتوكرافية الرقيقة) T.L.C (Thin Layer Chromatography) والاختبارات التاكيدية أن مستخلص كسبة القطن يحتوي على الافلاتوكسين B1 (Aflatoxin).

المقدمة

تعد السموم الفطرية Mycotoxins المنتجة من الفطريات التي تصيب النباتات من المشاكل الكبيرة التي كانت ولا تزال تؤدي إلى مرض وموت كثير من الباتات وبالتالي تواجه الزراعة بشكل عام والمواد المصنعة منها بشكل خاص، وقد تم التعرف وتحليل قسم كبير من هذه السموم ومنذ زمن بعيد ولحد الآن العمل جار على التعرف وتحليل المركبات الجديدة التي تتكون في النباتات بعد تعرضها للإصابة بالفطريات أو أي كائن حي آخر (Hoffman 1854, Boning 1836).

ومنذ ذلك التاريخ بدا العلماء يدرسون التغيرات التي تظهر على النباتات والأعراض المرضية واسباب ذلك حيث اتضح للعلماء بان هناك مواد فينولية تفرز من قبل النبات أو الفطر أو الاثنين معاً وهي مواد سامة على النبات وعلى الفطر، وقد تم دراسة صفات بعضها وذلك عن طريق الطول الموجي لها أو تحليلها عن طريق صفائح الكروموتوكرافي

تاريخ استلام البحث : ٢٠٠٤/٤/١٨

(ABBAS 1983, Onuorah). ويعد تلوث الأغذية والأعلاف بهذه المواد من اخطر واعقد أنواع التسمم الغذائي بمثل هذه المركبات، مما يزيد من أهمية هذه المواد هي خطورتها لان معظمها وجد ذو تأثير سرطاني على اغلب الأنظمة الحيوية (الهيتي 1992) كما ان معظم النباتات تفرز هذه المواد السامة التي تؤدي إلى قتل الفطريات المهاجمة للنباتات مما يؤدي بالتالي إلى موت الفطر وتخلص النبات منه وخاصة إذا كان النبات مقاوم لذلك الفطر(ABBAS 1983 البياتي 1995,2001) وقد تعاظم الاهتمام بمشكلة التلوث بالسموم الفطرية في الأغذية والأعلاف بعد اكتشاف سموم الافلاتوكسينات (Aflatoxins) في العقد السادس من هذا القرن (Glodblatt 1977) كما أظهرت الدراسات خطورة هذه الملوثات على صحة الإنسان والحيوان (Wogan 1970 Serk-hanssen 1966) كذلك لوحظ ان المركبات الفينولية المستخلصة من بعض الفطريات لها سمية أيضا على نفس الفطريات المستخلص منها تلك المركبات، وقد تم التعرف على عدد منها وفصلها بطرق كيمياوية (البياتي وصالح 1993) و(البياتي 1995).

احتلت الافلاتوكسينات قائمة السموم الفطرية بالأهمية كونها اشد المواد الطبيعية في تأثيراتها السرطانية، وقد وجد أن الدواجن اكثر الحيوانات عرضة لمشاكل التلوث بالسموم الفطرية لطبيعة تغذيتها على العلائق التي تشكل مكوناتها افضل الأوساط لنمو الفطريات وانتاج السموم (Smith واخرون 1971 و Hessltine 1976) وتهتم هذه الدراسة في إمكانية تحديد بعض السموم الفطرية التي تنتجها كسب القطن بعد إصابتها بالفطريات حيث لوحظ أن القطن له القدرة على إنتاج المركبات الفينولية السامة (الفايتو الكساين) وبعض المثبطات الحيوية بعد إصابته بالفطر Verticillium (Zaki 1972 , 1969 Bell) تهدف هذه الدراسة إلى:-

١- تشخيص الفطريات المرافقة لكسب القطن.

٢- الكشف عن وجود الافلاتوكسينات في مستخلص كسب القطن.

المواد وطرق العمل

أولاً:- مسح الفطريات المرافقة لكسب القطن

تم اخذ (10) أكياس (سعة ١ كغم) من كسب القطن من مخازن مصانع المنصور بيجي بشكل عشوائي وكل كيس وضع فيه كسبة قطن من أعلى الكوم ووسطه واسفله واخذ (٢ كغم) من كسبة القطن من (١٠) أكياس بواقع ٢٠٠ غم من كل كيس وخلطت جيداً ثم أفرغت على لوح زجاجي كبير ومعقم وقسمت إلى أقسام متساوية كل قسم يزن ٥٠ غم واخذت ثلاثة أقسام عشوائية تمثل ثلاثة مكررات ومن كل قسم اخذ ١٠ غم ثم فصلت أغلفة البذور عن مكوناتها ووضعت في دورق زجاجي حجم ٢٥٠ مل ثم أضيف ٩٠ مل ماء مقطر معقم مع ٢٠ ملغم اكرومايسين ثم وضعت على زجاج كهربائي مدة ١٥ دقيقة وبهذا تم الحصول على أول تخفيف 10^{-1} ثم عملت منه التخافيف (10^{-2} ,10^{-2}) للمكررات الثلاثة بأخذ ١ مل واضيف ٩ مل من الماء المقطر المعقم ثم اخذ ٠,٥ مل من كل أنبوب وتمت زراعته على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز (PDA) (Agar Potato Dextrose) في أطباق زجاجية معقمة وكررت العملية ١٠ مرات لكل تركيز ووضعت الأطباق في الحاضنة على درجة حرارة ٢٥ – ١ ولمدة ٧ – ١٠ أيام. ثم تم تنقيه المزارع الفطرية واخذت منها عزلات وزرعت على أطباق (PDA) وحضنت على درجة حرارة (٢٥ – ١) ولمدة ٧-١٠ أيام ثم تم تشخيص الفطريات المرافقة اعتماداً على المناهج التصنيفية المتخصصة (1972, Barnett, Hunter, 1971 Booth).

استخدمت طريقة Joens (١٩٧٢) مع بعض التحوير وذلك بطحن ٧٠غم من كسبة القطن بمطحنة نوع WILEY MILL STANDARD MODEL NO3 ARTHER CO. ثم وضعت في دورق زجاجي حجم ٥٠٠ مل واضيف لها ١٥٠ مل من petroleum ether لغرض إزالة الدهون ووضع على جهاز الرجاج الكهربائي لمدة ١٥ دقيقة بعدها رشح الخليط خلال ورقة ترشيح (Whatman No1) واهمل الراشح ونشر الراسب على ورق نشاف وبعد تخفيف العينة وزن ٥٠ غم منها ووضعت في دورق حجم ٥٠٠ مل واضيف له ٢٥ مل ماء مقطر و ٢٥٠ مل من كلور فورم ووضع على الجهاز الرجاج الكهربائي لمدة ٣٠ دقيقة ثم رشح من خلال ورقة تشريح أهمل الراسب وتم الاحتفاظ بالراشح. حضر عمود فصل محمول على حامل ووضع قطعة من الطوف الزجاجي في قعر العمود وملئ ٣ / ٤ حجمه بالكلور فورم واضيف إلى العمود (٥ غم) من كبريتات الصوديوم اللامائية وتركت

لتستقر في القعر واضيف ١٠ غم من السليكا جيل gel 60 for column chromatography silica ثم أضيف إلى العمود ١٠ غم من كبريت الصوديوم اللامائية على سطح السليكا. ثم فتح صنبور العمود حتى وصل مستوى الكلور فورم إلى مستوى السطح العلوي لكبريتات الصوديوم اللامائية.

ولغرض تنظيف المستخلص نقل ٥٠ مل من الراشح إلى دورق حجمه ٢٥٠ مل واضيف إليه ١٠٠ مل هكسان ومزج الخليط جيداً.

نقل المزيج تباعاً إلى عمود الفصل مع فتح الصنبور لحين وصل مستوى المزيج إلى السطح العلوي لكبريتات الصوديوم اللامائية. ثم أضيف ١٠٠ مل ثنائي اثيل الأثير إلى العمود وفتح الصنبور حتى وصول مستوى السائل الى السطح العلوي لطبقة كبريتات الصوديوم اللامائية. ثم أضيف إلى العمود ١٥٠ مل من مزيج كلور فورم: ميثانول ٩٧ :٣ وجمع الراشح بالكامل ثم بخر المزيج حتى وصل الحجم إلى ٢٥ – ٣٠ مل ثم وضع في قناني زجاجية مجففة بالهواء الساخن وحفظت العينات في المجمدة لغرض الكشف عن وجود الافلاتوكسين B على صفائح الكروموتوغرافية الرقيقة TLC.

ثالثاً:- الكشف عن وجود الافلاتوكسين في المستخلص

أ- الكشف عن وجود الافلاتوكسين باستخدام صفائح TCL:-

لغرض الكشف عن وجود الافلاتوكسين في مستخلص كسبة القطن فقد سحبّ ١ مايكروليتر من القناني الزجاجية التي تحتوي على المستخلص المتبقي باستعمال أنابيب دقيقة Macrocaps وضعت بشكل بقع Spots على صفائح الكروماتوغرافية الرقيقة TLC (Thin Layer Chromatography) جاهزة الطلاء بالسليكاجيل the Aluminium sheets silica get 60 f259 قياس ٢٠ × ٢٠ سم بين بقعة وأخرى ١,٥ سم إلى جهة اليمين ووضع الافلاتوكسين القياسي بتركيز ٥ ملغم / كغم على الجهة اليسرى من الصفيحة وتركت لحين الجفاف ثم وضعت في نظام محلول الفصل كلور فورم: ميثانول ٩٧ : ٣ وبعد إكمال الفصل تم فحص الألواح تحت الأشعة فوق البنفسجية وتم مطابقة سرعة الجريان R_f ولون التألق وشدته مع المادة القياسية للافلاتوكسين B1(البياتي وصالح ١٩٩٣).

ب- الاختبارات التاكيدية لوجود الافلاتوكسين B1:-

١- الطريقة الكيمياوية:

اتبعت طريقة Romer (١٩٧٣) المتضمنة رش الصفيحة الحاوية على البقع بخليط من حامض الكبريتيك والميثانول (٢٠ : ٨٠) بواسطة رشاش زجاجي دقيق Atomizer ثم

وضعت الصفيحة في الفرن الكهربائي على درجة حرارة ١٢٠ م لمدة ٥ دقائق ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية لملاحظة تغير لون البقعة المتباينة من الأزرق إلى الأصفر دليلا لوجود المادة نفسها.

٢- الاختبار ثنائي الاتجاه:

تم الاختبار بوضع بقعة واحدة من المستخلص المراد التأكد من وجود الافلاتوكسين في اسفل الصفيحة الكروماتوغرافية الرقيقة من جهة اليسار واضيف لها السم القياسي (الافلاتوكسين B1) ثم وضعت الصفيحة في حوض فصل حاو على نظام فصل ملون من كلور فورم : ميثانول ٩٧ : ٣ بعد الفصل أعيدت الصفيحة مرة أخرى إلى حوض فصل ثاني مكون من كلور فورم : بنزين : ماء (٤٦ : ٣٥ : ١٩) بعد تدويرها ٩٠ درجة عن وضعها الأول في منطقة الفصل Origin حيث جرى فصل آخر عن طريق تغيير اتجاه حركة البقعة للتأكد من عدم تجزا البقعة عن السم القياسي (Cocker واخرون , ١٩٨٤).

النتائج والمناقشة

شخص بعد تحضين المزارع الفطرية لكسب القطن أنواع كثيرة من الفطريات على الكسب ومنها , Penicllium , Alternaria , Fusrium , Aspergillus ولوحظ أن اغلب المستعمرات كانت على نموات من Aspergillus حيث كانت السيادة لهذه الفطر في معظم المستعمرات المزروعة، وهذا قد يعود إلى أن هذا الجنس Aspergillus له القدرة على النمو في أوساط ذات رطوبة جيدة عند الحصاد وخزن الكسب لغرض تصنيعها (Jelinek واخرون ١٩٩٨) ، (العزاوي ١٩٧٧) و الورشان (١٩٩٩). ومن خلال الدراسات الكثيرة فان أي تداخل ميكروبي من الفطريات والنباتات يؤدي إلى تكون مواد فينولية سامة مختلفة التركيب ومختلفة في الأطوال الموجية أو مختلفة في سرعة جريانها على ألواح الفصل الكروماتوكرافي (البياتي وصالح ١٩٩٣). كما أن سمية هذه المركبات أيضا تختلف في درجة سميتها حسب نوع الفطر أو نوع النبات أو نوع الجزء النباتي (جذور أو ساق أو أوراق) البياتي (١٩٩٥).

في هذه الدراسة وبعد ان تم استخلاص كسب القطن المصابة بالفطر A . flavus بالطريقة المارة الذكر تم وضع قطرات من المحلول المستخلص من كسب القطن وقطرات من المحلول القياسي الافلاتوكسين على شكل بقع spot على صفائح الفصل الكروماتوكرافي

T.L.C وذلك للتأكد من وجود هذه المواد السامة في كسب القطن مقارنة مع المحلول القياسي الافلاتوكسين B1 وذلك استناداً إلى سرعة الجريان R_f والى الألوان الماثلة لألوان المحلول القياسي (الورشان ١٩٩٩) ومن الطريقة الكيماوية والاختبار ثنائي الاتجاه (Rome 1973) و (Cocker واخرون ١٩٨٤) بين أن للفطر A. flavus القدرة على إنتاج الافلاتوكسينات في كسب القطن ((موضوع البحث)) حيث لوحظ بالمقارنة مع المحلول القياسي ظهور مركبات لها نفس سرعة الجريان R_f ونفس ألوان المحلول القياسي المستخدم في صفائح التحليل الكروماتوكرافي T.L.C (Jones 1982) ، وهذه النتائج مطابقة لما حصل في استخلاص بعض المركبات السامة من سيقان القطن بعد إصابة القطن بالفطر Verticillium (Zaki 1972) ولخطورة هذه المواد السامة الموجودة في علائق القطن لذا يتوجب معاملة كسب القطن قبل استخدامها ببعض المبيدات الفطرية التي تساعد من الحد من نمو الفطريات.

الاستنتاجات

١- إمكانية كسب القطن على إنتاج سموم الافلاتوكسين بعد إصابتها بالفطر A. flurus ومماثل للمحلول القياسي (الافلاتوكسين B1).

٢- توفر الرطوبة في كسب القطن يؤدي إلى نمو كثير من الفطريات وبالتالي إلى إفراز بعض السموم المضرة بصحة الحيوان الذي يتناول كسب القطن كعليقة.

٣- نمو كثير من الفطريات على كسب القطن مما يؤدي إلى تلف الكسب إذا لم يتم معالجتها.

التوصيات

١- زراعة أصناف مقاومة من القطن مقاومة للفطريات أو الأحياء المجهرية الأخرى.

٢- التهوية الجيدة أثناء خزن كسب القطن.

٣- تعقيم المخازن قبل خزن كسب القطن ببعض المبيدات الفطرية.

٤- تقليل الرطوبة جهد الإمكان.

٥- توعية المزارعين بضرورة مكافحة الأمراض التي تظهر على القطن بغية الحصول على إنتاج وفير و جيد.

المصادر

العزاوي, بتول زينل . ١٩٧٧ . دراسة مدى تلوث العلائق الحيوانية بالافلاتوكسين والفطريات المنتجة له والمعزولة منها. رسالة ماجستير- كلية العلوم- جامعة بغداد.

الهيتي, أياد عبد الواحد. ١٩٩٢ . السموم الفطرية: المفهوم العام. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جامعة بغداد.

الهيتي, أياد عبد الواحد. ١٩٧٧ . الفطريات تهاجم حاصل الذرة الصفراء في المخازن: تشخيصها. تأثيرها. مقاومتها. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

الورشان, سليم حسن صالح. ١٩٩٩. استعمال بعض المحددات الكيمياوية للحد من تلوث علائق الطيور الداجنة بالافلاتوكسين B1. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

البياتي، عبد الرسول خضر . ٢٠٠١ . تغير في تراكيز الفايتوالكساين في نبات الطماطة بعد إصابتها بالفطر R. solani مجلة الفتح / كلية المعلمين / جامعة ديالى (العدد ١).

البياتي، عبد الرسول خضر . ١٩٩٥ . سمية مركب الفايتوالكساين المستخلص من حزبي للطماطة على الفطر F. solani المجلة العلمية لجامعة تكريت / العلوم الصرفية والزراعية المجلد ٢ العدد ١ لسنة ١٩٩٥.

البياتي، عبد الرسول خضر وحسين عبد محمد صالح .١٩٩٣ . فصل مكونات مركب الفايتو الكساين من أوراق وسيقان الطماطة. مجلة كلية التربية /جامعة صلاح الدين المجلد ٣ العدد ١ لسنة ١٩٩٣.

A.K.ABBAS.(1983) Phytoalexin production and the Resistance of cloner (Triflium spp) to *verticillium*. M.sc.thsis.univ. college of swansea,uk.

Barnett, H.Z and B.B.Humter.1972. Illustrated genera of imperfect fungi.3rd edition, Burgess puplishing company Minneapolis,Minnesota.

Booth 1971. The Genus Fursarium.Common wheat my cological insitut, Kew snrrey, England. p.p.237.

Boning, K.(1936) Investigation on horseradish diseases and their control. Angew Bot 18:482-494.

Cocker, R.D, B.D.jones, M.J.Nagler, G.A.Jnpart, A.J.Wellbridge and S.panigrahi.1984. Mycotoxin training manual tropical development and research institute overseas development administration, 127 clerken Well Boad, London Ecir 5 DB.

Goldblatt, L.A. and Dollear, F.A.1977. Detoxification of contaminated cropes, in mycotoxins in Human and Animal Health, Rodricks, Hesseltine and Mohlman, Ed.pathotox. pub.,park forest,IL,139

Hesseltine, C.W.1976.CODITIONS Leading to mycotoxin contamination of food and feeds. In "Mycotoxin and other fungal related food problems" (Ed.J.V.Rodrixks). Advances in chemistry series, No.149, American chemical society, Washingtion,D.C,I.

Hoffman,H.(1854). Speration biennium fadenpilze Botanische Zeitung; 12:249-254.

Jelinek, C.F., A.E.pohland and G.XW.wood.1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds An updata-J.Assoc.off Anal.chem.72: 223-230.

Jones, F.T., W.H.Hgler and. PB.Hamilton.1982. Assonciation of low levels of aflatoxin in feed with productivity losses in commercial broiler operations. Poultry sci.61: 868.

Jones, T.B.D. (1972) Methods of aflatoxin analysis G70.Tropical produds Institute.

Onuorah,O.M.O(1982) Studies on the dicitation of lueerne.PH.D. thesis,univ.of wdes.

Romer, T.R.1973. Determiation of aflatoxin in mixed foods.J.of the AOAC, pp: 56-75.

Serck-Hanssen, A.1970. Aflatoxin-in duced fatal hepatit is. Acase report from Ugand.Arch Environ.Health, 20:729-731.

Smith, J.W., C.H.H.hill and P.B.Hamilton.1971. Effects of dietary modification on a flatoxicosis in broiler Chickems. Poult.Sci.50: 758.

Wogan, G.N.1965. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins Bacterial. Rev.30:460-470.

Zaki,A.I.(1972) Vergosin and hemsgossypol, antifungal compounds produced in cotton plants inoculated with verticillium albo atrum phytopathol;62:1398-1410.

Identification The Growth Fungi on Cotton Residues and its Poisons

A.K.Al-baiati safaa. Z.b. Al - tikriti

College of Agriculture

Abstract

This study was carried out in Almansor industries for vegetable oils products to identify the effecting poisons in the cotton residues stored in Almansor industries / Baiji. The study illustrated that the fungi companion with the cotton residues were *A.flavus*, *Alternaria*, *Penicillium* and *Fusarium* respectively. The study was also included the investigation of the presence of the Aflatoxin B1 by using T.L.C.method.