عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لبذور السمسم

فاتن نوري ملا عبد حسين الرفاعي
كلية طب نينوى – جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2004/4/25 تاريخ القبول 2004/10/20

ABSTRACT

This study was conducted for the purpose of finding sesame seed borne fungi which produce the Lipase . Forty different isolates were obtained from different regions of Iraq (Baghdad , Slah-Al.Dan , Babylon , Taamim , Al.Anbar and Ninevah) . The percentage isolate of *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* was Found to be (22 and 20 %) respectively from Ninavh seed , and 14 % of *Alternaria sesami* from Al-Anbar .

Aqualitative test was conducted to check the capabilities of these isolates to produce the Lipase in solid cultures and to find the most active fungi producing the enzyme . It was found that all isolates produced lipase except *Rhizoctnia solani* and *Fusarium* sp. Isolated from Baghdad and Babylon respectively .

الخلاصة

أجريت الدراسة بهدف البحث عن الفطريات المصاحبة لبذور السمسم والمنتجة لانزيم اللايبيز. تم الحصول على 40 عزلة مختلفة من الفطريات المعزولة من البذور المأخوذة من محافظات بغداد وصلاح الدين وبابل والتأميم والانبار ونينوى . وإختلفت نسبة عزل الفطريات من البذور بإختلاف المناطق وكانت 22 % و 20 % للفطريات *Rhizopus stolonifer* و *Aspergillus niger* على التوالي والمعزولين من بذور محافظة نينوى يليهما الفطر *Alternaria sesami* (14 %) والمعزول من محافظة الانبار. تم إجراء إختبار نوعي لمعرفة قابلية هذه العزلات على إنتاج أنزيم اللايبيز في الاوساط الصلبة وكذلك لمعرفة أفضل العزلات المنتجة لهذا الانزيم وكان لجميع العزلات نشاطاً موجباً في إنتاج الانزيم عدا الفطر

Rhizoctnia solani والفطر *Fusarium spp.* المعزولين من بذور سمسم محافظتي بغداد وبابل على التوالي .

المقدمة

السمسم Sesame (*Sesamum indicum* L.) نبات يعود الى العائلة السمسمية Pedaliaccae ويعد واحد من أقدم النباتات التي زرعها الانسان في الشرق الادنى وفي افريقيا وتحتوي بذوره على 46 –64 % من الزيت ويحتوي زيت السمسم على 80 % من الاحماض الدهنية غير المشبعة وهو ذو محتوى عالٍ من مادة السيسومولين (Sesoimolin) المضادة للاكسدة . وتعد البذور مصدراً غنياً بالبروتين (20–28 %) والسكريات (14–16 %) والمعادن (5–7 %) وأهمها الكالسيوم والفسفور وعدد من الفيتامينات مثل B_{12} ، وبعد إستخلاص الزيت من البذور فان المادة المتبقية هي كسب السمسم وتحتوي على البروتين بنسبة 37.5 % (1) هناك العديد من الفطريات التي تم عزلها من بذور السمسم والتي يمكن أن تستخدم في تحضير منتجات تجارية مهمة منها الاحماض العضوية والكحول والمضادات الحيوية وبعض الانزيمات والفيتامينات (2) . أن العديد من الفطريات لها القدرة على إفراز أنزيمات مختلفة الى الوسط وتشمل هذه الانزيمات كل من الاميليز والسليلوليز والكايتينيز والفوسفاتيز الحامض واللايبيز وحتى DNA ase والـ RNA ase . أنزيم اللايبيز يساعد في كسر الاواصر الاسترية لانتاج الاحماض الدهنية الحرة والكحول ، والمواد الاولية الطبيعية التي يعمل عليها انزيم اللايبيز هي الفوسفولبيدات واسترات الاحماض الدهنية للكوليسترول والمواد ذات العلاقة (3) . أما الانزيمات الفطرية فهي تعمل في أس هيدرووجيني متعادل يميل للحامضية (4) . هناك إهتمام كبير بأنزيمات اللايبيز Lipases (الانزيمات المحللة للدهون والزيوت) في الاونة الاخيرة وذلك للدور الذي تؤديه في العديد من المجالات وأهمها الصناعات الغذائية فهي المسؤولة عن إنتاج نكهة متزنخة مرفوضة في العديد من منتجات الالبان واللحوم والاسماك وبقية المنتجات الغذائية الحاوية على الدهون ومن ناحية أخرى فهي ضرورية لانتاج النكهة المرغوبة والمفضلة في منتجات غذائية اخرى ، فضلاً عن ذلك يمكن أن تستخدم في صناعة المنظفات ، حيث تكون مفيدة في إزالة البقع الزيتية وكذلك تستخدم في إنتاج الايس كريم والبروتين أحادي الخلية Single Cell Protein (5 و 6) وتدخل في صناعة مستحضرات التجميل بشكل عام بسبب مقدرتها على إزالة الشحوم (7) . والاجناس الفطرية المستعملة للانتاج التجاري هي , *Candida* , *Mucor* *Aspergillis* , *Rhizopus* . (8 و9).

مواد وطرائق العمل

مصادر البذور

تم الحصول على بذور السمسم المخزونة للموسم (2003) والمزروعة في مناطق مختلفة من العراق بغداد و صلاح الدين وبابل و التأميم والانبار ونينوى وحفظت البذور بأكياس نايلون في الثلاجة بدرجة 5 °م لحين الاستعمال .

إختبار سلامة البذور Seeds Health Testing

جرى إختبار سلامة البذور وتم عزل الفطريات بالطريقة المعتمدة من قبل الجمعية العالمية لفحص البذور International Seed Testing Association (10) بطريقة أطباق الاكار (Agar Plate Method) وتم تعقيم 100 بذرة سطحياً بغمرها بمحلول 1 % هايبوكلورايت الصوديوم Sodium hypochlorid لمدة دقيقة واحدة قبل توزيعها على الاطباق ثم وزعت بمعدل 10 بذور / طبق وإحتوت الاطباق على وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA) المضاف اليها المضاد الحيوي Streptomycin 100 جزء بالمليون . حضنت الاطباق بدرجة 25 °م لمدة 7 أيام (11) وعرضت لدورة إضاءة متعاقبة 12 ساعة ضوء و12 ساعة ظلام (12) . الفطريات النامية في اطباق الاكار تم فحصها بإستعمال المجهر المركب Compound microscope وللحصول على فطريات نقية أستخدمت طريقة قمة الهايفا او السبور المنفرد وشخصت الفطريات إعتماداً على المفاتيح التصنيفية التي وردت في المصادر التالية (13-17) حفظت العزلات المختلفة من الفطريات داخل أنابيب الاختبار Slants في الثلاجة بدرجة 5°م .

كشف النشاط الانزيمي Enzymatic activity test

جرى إختبار نوعي Qualitative لقابلية العزلات الفطرية على إنتاج أنزيم اللايبيز Lipase على اوساط الزرع الصلبة الخاصة بالكشف عن فعالية العزلات في إنتاج هذا الانزيم. أخذ اللقاح الفطري بحجم متساو من مزارع نقية فتية بإستخدام ثاقبة فلين Cork borer بقطر 8 ملم تم تثقيب الطبق الحاوي على وسط PDA والمستعمرة الفطرية ونقلت الاقراص بإستخدام إبرة اللقاح لاطباق الاوساط الزرعية (تحتوي على 15-25 مل من الوسط / طبق) وبواقع ثلاث مكررات لكل عزلة ثم حضنت الاطباق في درجة حرارة 25 ° ± 1 .

أستخدم الوسط الموصوف من قبل King *et al.* (18) والمكون من 10 مل Tween 80 وببتون 8 غم وكلوريد الكالسيوم المائي 0.1 غم واكار 20 غم وأكمل الحجم الى اللتر بالماء المقطر (الاس الهيدروجيني 6.0) . تم تعقيم مادة Tween 80 منفرداً بقنينة زجاجية ثم أضيفت الى المزيج المعقم بعد إنخفاض درجتي حرارتيهما ويتم الاستدلال على إنتاج انزيم اللايبيز بتكون راسب أبيض تحت الغزل الفطري او بلورات بيضاء مغمورة في وسط الزرع تحيط بالمستعمرة النامية عند ملاحظة الاطباق بصورة مقلوبة.

النتائج والمناقشة

عزل الفطريات Isolation of fungi

أظهرت نتائج إختبار سلامة بذور السمسم المأخوذة من مناطق مختلفة بطريقة اطباق الاكار Agar Plate Method تواجد العديد من أجناس الفطريات المصاحبة للبذور Seed borne fungi بلغ عددها ثمانية أجناس (جدول 1) . وجد الفطر *Alternaria alternata* (Fr) Kessler مصاحباً لبذور السمسم المأخوذة من محافظات مختلفة عدا المعزولة من بغداد وبابل وكانت أعلى نسبة لوجوده هي 8 % من بذور السمسم المأخوذة من صلاح الدين وكانت نسبة وجوده أقل في بذور المحافظات الاخرى وهذا الفطر شائع الانتشار في الحقول والمخازن ولقد جاء مطابقاً لما ذكر (19-21) . ولقد عزل بعض الباحثين هذا الفطر من بذور نباتات اخرى (22 و23). كما عزل الفطر *A. sesami* من البذور المتحصل عليها من المناطق المختلفة من العراق وكانت أعلى نسبة عزل هي 14 % من بذور الانبار وبنسب أقل في المناطق الاخرى ولقد عزل الفطر من السمسم من مناطق مختلفة من العالم (21 و 24). لوحظ وجود الفطر *Aspergillus niger* في بذور السمسم المأخوذة من المحافظات المختلفة وكانت 16 % في بذور سمسم بغداد ، كما لوحظ تواجد الفطر *Aspergillus flavus* في بذور السمسم المأخوذة من الانبار ولم يظهر في بقية العينات ولقد عزلت هذه الفطريات من قبل الباحثين Naseema and Wilson (25) و Saber (26) . الفطر *Fuarium spp.* عزل من بذور سمسم بابل ولم يظهر في بقية العينات ، وأكدت دراسات سابقة على عزل الفطر *Fuarium sp* من بذور السمسم (20) . وجد الفطر *Macrophomina phaseolina* في عينات بذور السمسم المأخوذة من بابل ونينوى ولم يظهر في البقية ، وقد ذكر بعض الباحثين مصاحبة هذا الفطر لبذور السمسم (20 و 27). كذلك فأن الفطر *Penicillium spp* ظهر في كل العينات عدا المأخوذة من الانبار ونينوى وبنسب متفاوتة تراوحت بين

(2-10) % وقد عزل هذا الفطر من قبل كاظم وآخرون (28). بينما ظهر الفطر *Rhizoctonia solani* مصاحباً لبذور السمسم المأخوذة من بغداد (4 %) وقد عزل هذا الفطر من قبل Gokulapalan and Nair (29) ، أما الفطر *Rhizopus stolonifer* فقد ظهر بنسبة 22 % في عينة بذور السمسم المأخوذة من محافظة نينوى وبنسب أقل في كل من بذور سمسم الانبار وصلاح الدين (10 و 4 %) على التوالي وقد عزل هذا الفطر من قبل Saber (25).

الفعالية الانزيمية Enzymatic Activity

أظهرت دراسة النشاط الانزيمي للفطريات المعزولة من بذور السمسم وجود تباين كبير بين الانواع المختلفة وحتى التي تعود منها للجنس الواحد في إنتاج انزيم اللايبيز (جدول 2) .

انزيم اللايبيز

إختبار نشاط الفطريات في تحليل الدهون أعطت جميعها كشفاً موجباً عدا فطرين أعطيا كشفاً سالباً ، وكان النشاط الانزيمي في إنتاج انزيم اللايبيز يتراوح من ضعيف (+) الى نشاط متميز (+++) جدول (2) خاصة الفطر *Aspergillus niger* المعزول من بذور السمسم بغداد وبابل والتأميم ونينوى وكذلك بالنسبة للفطر *Alternaria sesami* المعزولة من بذور سمسم التأميم ونينوى أما بقية العزلات الفطرية فقد أعطت نشاطاً انزيمياً يتراوح بين ضعيف (+) ومتوسط (++) والفطريين اللذين أعطيا كشفاً سالباً (-) هي *Rhizoctouia solani* المعزولة من بغداد والفطر *Fusarium sp* المعزولة من بذور سمسم بابل وهذه النتيجة هي عكس ماحصل عليه كاظم وآخرون (28) حيث ذكر أن للفطر *Fusarium sp* نشاط ضعيف (+) في إنتاج انزيم اللايبيز. أستخدمت مادة Tween 80 كمادة تفاعل لما تمتاز به من إعطاء كشف مرئي سهل الملاحظة اولاً وأن سيولتها وسهولة إمتزاجها مع مكونات الوسط الزرعي يعطي تماساً أكبر بينها وبين الانزيم المحلل للدهن. والفطريات التي أعطت كشفاً سالباً هي ليست بالضرورة غير قادرة على تحليل الدهون فقد ذكر Cochrane (30) أن أنزيم اللايبيز موجود في معظم الفطريات وأن عدم ظهوره في الكشف قد يعود لقصر مدة الاختبار كما ذكر الرفاعي (31) أن بعض الاحياء المجهرية تتطلب مدة تصل الى 10 أيام لتعطي تحليلاً مرئياً للدهون إلا أن معظمها لايتطلب أكثر من

5 أيام لهذا الغرض والسبب الاخر قد يعود الى أن الانزيم الذي يفرزه الفطر غير قادر على التحليل المرئي Hydrolyze لآصرة الاستر Ester الموجودة في مادة التفاعل Tween 80.

وأخيراً يمكن القول بأن الفطريات التي تم عزلها من بذور السمسم المأخوذة من المحافظات مختلفة أختلفت فيما بينها في نشاطها الانزيمي جدول (2) إذ ظهرت الفروقات النوعية سواء بين الانواع المختلفة او بين الاجناس التي تعود اليها هذه الانواع ، وإن درجة الحرارة 25 °م التي تم فيها تحضين الفطريات الخاصة بالاختبارات الانزيمية لها القدرة في أعطاء الصورة الادق للفعالية الانزيمية للعزلة إذا علمنا أن درجة الحرارة تؤثر على إنتاج الانزيم لنفس العزلة (32) او أنها قد لاتكون الدرجة المثلى لنمو النوع وبالتالي تؤثر على الفعالية الحيوية بشكل عام ، إن النتائج التي تحققت في هذه الدراسة لاتتفق مع دراسات اخرى تتعلق بالنشاط الانزيمي لاجناس وانوع مماثلة درست من باحثين آخرين وذلك يعود الى إختلاف العزلات وان اختلافها يعطي نتائج مختلفة أي ان كل عينة من الفطر مأخوذة من بذور ذات مصدر مختلف (33) .

جدول (1) الفطريات المعزولة من بذور السمسم المأخوذة من محافظات مختلفة على وسط اكار البطاطا والدكستروز.

المحافظات	الفطريات	% للعزل
بغداد	*Alternaria sesami*	% 12
	Aspergillus niger	% 16
	Cladosporium cladosporioides	% 4
	Penicillium spp	% 10
	Rhizoctonia solani	% 4
صلاح الدين	*Alternaria alternata*	% 8
	Alternaria sesami	% 4
	Alternaria spp	% 2
	Aspergillus niger	% 2
	Penicillium spp	% 2
	Rhizopus stolonifer	% 4
بابل	*Alternaria sesami*	% 2
	Aspergillus niger	% 2
	Cladosporium cladosporioides	% 2
	Fusarium sp	% 2
	Macrophomina phaseolina	% 2
	Penicillium spp	% 2
التأميم	*Alternaria alternata*	% 2
	Alternaria sesami	% 4
	Aspergillus niger	% 12
	Penicillium spp	% 4
الانبار	*Alternaria alternata*	% 4
	Alternaria sesami	% 14
	Aspergillus flavus	% 2
	Aspergillus niger	% 16
	Rhizopus stolonifer	% 10
نينوى	*Alternaria alternata*	% 6
	Alternaria sesami	% 4
	Aspergillus niger	% 20
	Macrophomina phaseolina	% 2
	Rhizopus stolonifer	% 22

جدول (2) التحري عن الفطريات المنتجة لانزيم اللايبيز Lipase والمعزولة من بذور السمسم المأخوذة من مناطق مختلفة من العراق

المحافظات	الفطريات	الكشف عن انزيم اللايبيز *
بغداد	*Alternaria sesami*	+
	Aspergillus niger	+++
	Cladosporium spp.	++
	Penicillium spp	+
	Rhizoctonia solani	-
صلاح الدين	*Alternaria alternata*	++
	Alternaria sesami	++
	Alternaria spp	+
	Aspergillus niger	++
	Penicillium spp	+
بابل	*Alternaria sesami*	+
	Aspergillus niger	+++
	Cladosporium cladosporioides	+
	Fusarium sp	-
	Macrophomina phaseolina	++
	Penicillium spp	++
التأميم	*Alternaria alternata*	++
	Alternaria sesami	+++
	Aspergillus niger	+++
	Penicillium spp	+
الانبار	*Alternaria alternata*	+
	Alternaria sesami	++
	Aspergillus flavus	++
	Aspergillus niger	++
نينوى	*Alternaria alternata*	++
	Alternaria sesami	+++
	Aspergillus niger	+++
	Macrophomina phaseolina	+

*- غير منتج لانزيم اللايبيز (عدم تكون راسب أبيض تحت المستعمرة الفطرية) .

\+ منتج لانزيم اللايبيز (تكون راسب أبيض تحت المستعمرة الفطرية بقطؤ 1-3 ملم) .

++ منتج لانزيم اللايبيز (تكون راسب أبيض تحت المستعمرة الفطرية بقطؤ 4-7 ملم) .

+++ منتج لانزيم اللايبيز (تكون راسب أبيض تحت المستعمرة الفطرية بقطؤ 8-11 ملم) .

المصادر

1.الشمري ، زهير راضي عداي . رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة الموصل (2002).

2.البوني ، عبد العزيز محمد ."أساسيات الفطريات العلمي".مطبعة جامعة الفاتح ، طرابلس ، ليبيا (1990).

3.دلالي ، باسل كامل ."موضوعات مختارة في التكنولوجيا الحيوية" . دار الكتب للطباعة والنشر ، مطبعة جامعة الموصل (1993).

4.الخفاجي ، زهرة محمود . "التقنية الحيوية" . مطبعة دار الحكمة للطباعة والنشر ، الموصل (1990).

5.Satsuki T. and Watanabe T., Bio. Industry . 7 : 501-507(1990) .

6.Benjamin S. and Pandy A., Biotech . J. 5 : 11-14 (2000).

7.Thomson C.A. , Delaquis J. and Mazza G., Critical Reviews in food Science and Nutrition . 39 (2) : 165-187 (1999).

8.Mukataka S. , Hagashi K. , Sat S. and Takahashi J., Agric . Biol. Chem. 53 (9) : 2355-2361 (1989).

9.Magan N. , Jenkins N.E. and Howarth J . International Journal of Food Microbiology, 217-221 (1993).

10.I.S.T.A., Proceeding of the international Seed Testing . International Rules for seed Testing . Wageningen , Netherlands . 152 p (1976).

11.Mengistu A. and Sinclair J.B., Plant Dis. Reptr. 63 (7) : 616-619 (1979).

12.Michail S.H. , Abd-El-Rehim M.A. and Abd-Elgasim E.A., Acta Phytopathologia, 14 (3-4) : 371-377 (1979).

13.Ellis M.B. Dematiaceous Hyphmycetcs . Common Wealth Mycological Institute , Kew , Surrey , England (1971).

14.Barntt H.L. and Hunter B.B., Illustranted Genera of Imperfect Fungi . Burgess Publishing Company , Minnesota . 241 p (1972).

15.Streets R.B., The Diagnosis of Plant Dieeases . The University of Arizona Press (1975).

16.Booth C. *Fusarium* . Common Wealth Mycological Institute . Kew Surrey , England . 58 p (1977).

17.Pitt J.I. and Hocking A.D., Fungi and Food Spoilage. Academic Press , London . 405 pp (1997).

18.King A.D.Jr. , Pitt J.I. and Beuchat L.I. Method for the Mycological Examination of Food . 2nd ed . Plenum Press , New York . U.S.A. (1986).

19.Hemeda A.A.H., MSc. Thesis . Faculty of Agric . Univ. of Alexandria (1985).

20.Khamees M.A.F. and Schlsser E., Mededelingen van de Faculteit Landbououwweten schappen , Rijksuniversiteit Gent , 55 (3a) : 877-887 (1990).

21.Ojiambo P.S. , Narla R.D. , Ayiecho P.O. and Nyabundi J.O., Tropical Agricultural Researchand Extension , 1 (2) : 125-130 (1998).

22.Krishnappa M. and Shetty H.S., Plant Dis. Res. 5 : 203-204 (1990).

23.Roberts R.G. , Robertson J.A. and Hanlin R.T., J. Bot. 64 : 1964-1971(1986).

24.Wu W.S., Plant Protection Bulletin , Taiwan , 30 (3) : 314-319 (1988).

25.Saber S.M., Mycoflora and susceptibility for aflatoxin accumulation of sesame seeds cultivar in Egypt. African Journal of Mycology and Biotechnology , 6 (3) : 41-52 (1998).

26.Naseema A. and Wilson K.I., Indian Phytopathology , 51 (3) : 240-243 (1998).

27.Li L.L. , Wang S.Y. , Fang X.P. , Huang Z.H. , Wang S.T. , Li M.L. and Cui M.Q., Oil crops of China , No. 1 , 3 –6 , 23 (1991).

28.كاظم ، سعاد عبود وهديل توفيق الحديثي وسوزان سعدي حسين وسمير خلف عبد الله . مجلة البصرة للعلوم الزراعية المجلد 4 : (1-2) 253-260 (1991).

29.Gokulapalan C. and Nair M.C. Collateral hosts of *Rhizoctonia solani* kuhn causing shaeth blight of rice . Internatioal Ricearch New sletter , 8 *6) : 10 (1983).

30.Cochrane V.W. Physiology of Fungi . John Wiley and Sons , Inc. New York . 524 p (1958).

31.الرفاعي ، فاتن نوري . رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الموصل (1999).

32.Fergus C.L. Mycoligia . 61 : 120-129 (1969).

33.Triagiano R.N. and Fergus C.L. Mycologia . 71 : 908-917(1979).