عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لثمار التفاح المستورد ودراسة التأثيرات السمية للفطر *A.terreus* في ذكور الجرذ الأبيض

سامي عبد الرضا الجميلي — **جامعة الكوفة/كلية العلوم**

رغد علي الموسوي — **جامعة الكوفة/كلية العلوم**

الخلاصة

تم عزل ثلاثة انواع من الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* وهي *A.niger* و*A.terreus* و *A.flavus*و نوع واحد يتبع جنس *Rhizopus stolonifer* ،إذ تم الحصول على (16) عزلة من الفطر *A.niger* في حين كان عدد عزلات الفطر *A.terreus*(12) عزلة ، اما الفطر *A.flavus* فتم الحصول على 5 عزلات وكان اقل العزلات التي تم الحصول عليها تابعة للفطر*Rhizopus stolonifer* وبثلاث عزلات.

وأثبتت هذهِ الدراسة وجود تأثيرات واضحة للفطر*A.terreus* في معايير الدم الفسلجية والكيموحيوية في ذكور الجرذ الابيض التي تمثلت برفع اعداد خلايا الدم البيض للحيوانات المجرعة. واظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية للكبد والطحال والامعاء الدقيقة والمعاملة بعصير التفاح المصاب بالفطر *A.terreus* وجود تأثيرات مرضية تمثلت باحتقان وعائي دموي في الكبد وانتفاخ في زغابات الامعاء مع حدوث تضخم في اللب الابيض في الطحال.

المقدمة

تتعرض ثمار التفاح للأصابة بالعديد من الآفات المختلفة في اثناء جنيها وتسويقها وخزنها منها التعفن الازرق والتعفن البني والابيض وغيرها وتتسبب هذه التعفنات في خفض قيمتها التسويقية، حصل Baert وجماعته،(2006) على العديد من العزلات من ثمار التفاح العائدة للفطريات المسببة لهذه التعفنات منها *Aspergillus niger* و *A.flavus* و *Rhizopus stolonifer* و *Pencillium expansum* وهذه الفطريات تنتج مركبات سامة في مختلف الاغذية تُعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins ومن اهم هذه السموم هي سموم الافلاتوكسينات التي تنتجها بعض الانواع التابعة لجنس *Aspergillus* وينتج عن تناول الاغذية الملوثة بهذه السموم العديد من الامراض والعلل لدى الانسان والحيوان مثل وذمة الاطراف السفلى وسرطان الكبد وتشوه الاجنة والطفرات الجينية وتثبيط عملية تكوين البروتينات (Cocker وجماعته، 1984).

ونظراً لأنفتاح الاسواق العراقية على الاسواق العالمية بدأت تدخل كميات كبيرة من السلع الى البلد ومنها ثمار التفاح ومن خلال الملاحظات الميدانية ظهر وجود اصابات فطرية كثيرة في تلك الثمار وعليه تم اجراء هذا البحث للتعرف على طبيعة تلك الفطريات وتأثيراتها السمية على الصحة العامة.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

تم عزل الفطريات المرافقة لثمار التفاح المصابة والتي ظهرت عليها اعراض التعفن الاسود والبني التي جُلبت من الاسواق المحلية إذ اخذت قطع من ثمار التفاح المصاب بطول وعرض (0.5-1)سم ووضعت في طبق يحتوي على محلول هايبوكلورات الصوديوم وبتركيز 2% من المستحضر التجاري ولمدة دقيقتين بعدها نُقلت الى طبق اخر يحتوي على ماء مقطر ثم نقلت الى طبق حاوي على ورق نشاف لغرض تجفيفها بعدها زُرعت في اطباق قطرها 9سم حاوية على وسط اكار مستخلص البطاطا والدكستروز وبمعدل خمس قطع في كل طبق، حُضنت الاطباق بدرجة(25±2)مْ ولمدة سبعة ايام (ميخائيل وبيدر،1982). وبعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية عزلات الفطريات وذلك بنقل قرص من كل مستعمرة وزرع في طبق PDA(حضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة)جديد وكررت العملية عدة مرات وذلك للحصول على مزرعة نقية لكل فطر بعدها تم تشخيص العزلات اعتماداً على الصفات المظهرية للمستعمرات وعلى الفحص المجهري إذ تم اجراء فحص مجهري لكل عزلة فطرية وذلك بوضع قطرة من Lactophenol في منتصف الشريحة، ونُقل جزء صغير من المستعمرة بوساطة عروة معقمة الى هذه القطرة بعدها تم وضع غطاء الشريحة مع الضغط قليلاً بوساطة الابهام وفحص الشرائح بالمجهر الضوئي وسجلت الصفات الاتية لكل فطر:

1- لون وطبيعة الحوامل البوغية (Conidiophores).
2- شكل الحوصلة Vesicle وحجمها ولونها ، وطبيعة التراكيب القارورية .
3- شكل الابواغ ولونها.

بعدها تم حساب تردد الفطريات المعزولة والمشخصة (Raper و Fennel، 1965؛ Bennet و Known، Chung1992).

حفظ عزلات الفطريات المعزولة والمشخصة

نُميت العزلات المشخصة في انابيب حاوية كل منها على وسط PDA وبصورة مائلة وحضنت بدرجة حرارة (25±2)مْ ولمدة سبعة ايام ثم حُفظت في الثلاجة لحين استخدامها في التجارب اللاحقة.

دراسة التأثيرات السمية لثمار التفاح المصابة بالفطر *A.terreus* في ذكور الجرذ الابيض:

تهيئة عصير تفاح مصاب بالفطر*A.terreus*

جُلبت ثمار تفاح ذات لون اصفر وبمقدار 3 كغم من الاسواق المحلية التي لم تظهر عليها اي اعراض اصابة بالفطريات ، ثم عُقمت سطحياً بهايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% ولمدة دقيقتين بعدها تم غسل الثمار بماء مقطر معقم . ثم عُملت ثقوب في الثمار بوساطة ثاقب فليني قطره 5 ملم وبعمق 2سم وبواقع ثقب واحد لكل ثمرة ، بعدها لُقحت الثماربالفطر *A.terreus* وذلك بوضع قرص قطره 4 ملم من مزرعة بعمر سبعة ايام في كل ثقب موجود على الثمار ، بعدها وضعت الثمار في اكياس نايلون نظيفة ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 25±2مْ ولمدة عشرة ايام وبعد انتهاء مدة الحضن تم قطع كل ثمرة الى نصفين ومن ثم فصل الجزء الذي ظهرت عليه اعراض الاصابة ووضع في بيكر نظيف ومعقم والجزء السليم هو الاخر وُضع في بيكر اخر نظيف ومعقم، وبعد هذه العملية تم اخذ 100غم من الجزء المصاب من الثمار والمصابة بالفطر *A.terreus* ومثله من الجزء السليم ثم وضع كل منها في خلاط كهربائي واضيف لكل جزء 300مل ماء مقطر معقم ومزج لمدة 10 دقائق بعدها اخذ المزيج للجزء المصاب والسليم كلاً على حدة وحُفظ كل منها في قناني نظيفة ومعقمة في الثلاجة بدرجة 4ْم لحين الاستعمال.

معاملة الجرذان بعصير التفاح المصاب والسليم:

أُستعمل في هذه التجربة 9 جرذ ذكر ابيض وقُسمت الى ثلاث مجاميع كل مجموعة تضم (3)حيوانات وعوملت كالاتي:

1- المجموعة الاولى :جُرعت بعصير الجزء المصاب من الثمار المصابة بالفطر *A.terreus*.

2- المجموعةالثانية: جُرعت بعصير الجزء السليم من الثمار المصابة بالفطر *A.terreus*.

3- المجموعة الثالثة:جرعت بعصير تفاح سليم وتُركت للمقارنة.

أُجري التجريع كل 48 ساعة وبجرعة واحدة مقدارها 3مل/كغم اي ما يعادل(1غم/كغم) ولمدة اسبوعين وبعد مرور يومين من آخر جرعة تم تضحية الحيوانات بعد ان خدرت بالكلوروفورم ، وشُرحت عن طريق فتح التجويف البطني وتم سحب الدم عن طريق طعنة القلب (Heart puncture) ووضع الدم المسحوب في انابيب حاوية على مادة مانع التخثر لحساب بعض معايير الدم الفسلجة والكيموحيوية وكذلك تم استئصال الكبد والطحال والجزء الامامي من الامعاء الدقيقة (duodenum) ثم غُسلت جيداً بالمحلول الفسلجي (Normal saline) بعدها ثبتت بالفورمالين 10% وتمت تهيئتها لعمل مقاطع نسيجية منها.

المعايير المدروسة

1 -قياس المعايير الفسلجية والكيموحيوية

حساب معدل التعداد الكلي لخلايا الدم البيض(W.B.Cs)

وضع 0.4 مل من محلول ترك في انبوبة اختبار نظيفة واضيف اليها 0.02مل من الدم المسحوب بواسطة ماصة ساهلي ، رج المزيج جيداً ثم نقلت قطرة منه الى عداد الخلايا بعد وضع غطاء الشريحة وتركت لمدة دقيقتين كي تستقر الخلايا ،وفحصت بجميع قوى التكبير

اذ تم حساب عدد خلايا الدم البيض في المربعات الكبيرة الاربعة في زوايا عداد الخلايا (Brown،1976).

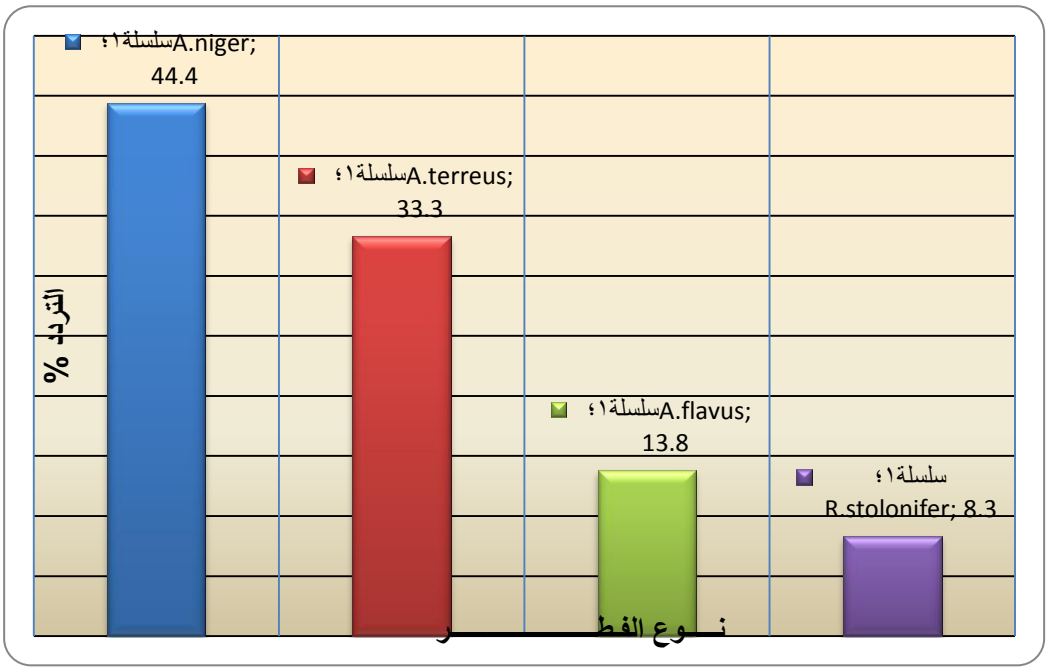
2-الدراسة النسجية المرضية Histophathological study

حُضرت المقاطع النسيجية في قسم الامراض النسجية في مستشفى الصدر التعليمي/النجف الاشرف وقد اتبعت الطريقة نفسها التي اوردها Bancroft وStevens(1982).

النتائج والمناقشة

الفطريات المعزولة من ثمار التفاح

تم عزل ثلاثة انواع من الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* ونوع واحد يتبع جنس *Rhizopus* ،إذ تم الحصول على (16) عزلة من الفطر *A.niger* وبتردد بلغ 44.4% في حين كان عدد عزلات الفطر *A.terreus*(12) عزلة وبتردد 33.3% ، اما الفطر *A.flavus* فتم الحصول على 5 عزلات وبتردد 13.8% وكان اقل العزلات التي تم الحصول عليها تابعة للفطر*Rhizopus stolonifer* وبثلاث عزلات وبتردد 8.3%(شكل1).



شكل (1) النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من ثمار التفاح

وهذه النتائج تقارب ما توصل اليه Baert وجماعته،(2006) الذين اكدوا على قدرة الفطريات *A.niger* و *A.flavus* و *Rhizopus* على اصابة ثمار التفاح بعد الحصاد ، كما تتماشى مع ماذكره Sidawi وجماعته (2006) الذين وجدوا ان الفطر *Rhizopus stolonifer* يسبب مرض التعفن الطري لثمار التفاح ، وحصل Wyenandtوجماعته،(2008)على النتيجة السابقة نفسها. وما يميز هذه الدراسة هو عزل الفطر *A.terreus* وبتردد عالي إذ ان البحوث العلمية المتوفرة حول مسببات مرض التعفن البني على التفاح لم تُسجِل هذا الفطر كمسبب لمرض التعفن البني لثمار التفاح.

دراسة التأثيرات السمية لثمار التفاح المصابة بالفطر *A.terreus* في ذكور الجرذ الابيض

1-الدراسة الفسلجية والكيموحيوية

اثرت عصائر اجزاء التفاح المصاب بالفطر *A.terreus* سواء كان الجزء المصاب بصور مباشرة او الذي لم تظهر عليه اعراض وعلامات الاصابة بالفطر في رفع معدلات اعداد خلايا الدم البيض لدى الجرذان المعاملة بها إذ وصل معدل تلك الاعداد الى(8.4×10^3 و7.4×10^3) خلية/مل بالنسبة للثمار المصابة بالفطر *A.terreus* ولجزئي الثمار المصابة بصور مباشرة او التي لم تظهر عليها الاعراض على التوالي قياسا بمعاملة السيطرة3.2×10^3خلية/مل (جدول1).

ويمكن ان يعزى سبب هذه الزيادة في اعداد خلايا الدم البيض لدى الحيوانات المعاملة بعصائر ثمار التفاح المصابة بالفطر *A.terreus* الى قدرة هذا الفطر على انتاج الافلاتوكسينات وهناك دراسات عديدة تعزز هذا التفسير منها ما ذكره Marin وجماعته،(2002)من قدرة الافلاتوكسينات على رفع اعداد خلايا الدم البيض للحيوانات المجرعة بهذه المركبات السامة مقارنة بمعاملة السيطرة. كما اشارت دراسة اخرى الى ان عزلة الفطر *A. flavus* المنتجة للافلاتوكسينات زادت من اعداد خلايا الدم البيض مقارنة بمعاملة السيطرة (الجنابي، 2009). وفي دراسة اجراها Sakhare وجماعته،(2007) اكد ان لسموم الافلاتوكسينات تأثير في معايير الدم الفسلجية والكيموحيوية فقد سبب اعطاؤها الى الحيوانات المختبرية ارتفاعاً في اعداد خلايا الدم البيض مقارنة مع معاملة السيطرة.

جدول (1) تأثير عصير ثمار التفاح السليمة والمصابة بالفطر *A.terreus* في معدلات اعداد خلايا الدم البيض لدى ذكور الجرذ الابيض.

ت	المعاملة	معدل اعداد خلايا الدم البيض $10\times^{3}$
1	الجزء الذي ظهرت عليه اعراض وعلامات الاصابة بالفطر *A.terreus*	8.4
2	الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض وعلامات الاصابة بالفطر *A.terreus*	7.4
3	Control	3.2

L.S.D(0.05) =5.2.

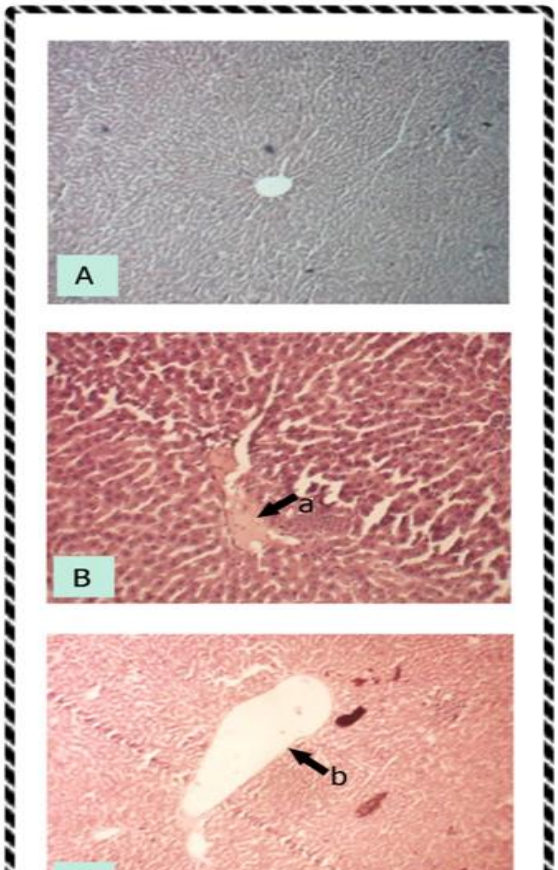
2- الدراسة النسجية المرضية

أظهرت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من أكباد الجرذان التي تم معاملتها بعصير الجزء المصاب بالفطر *A.terreus* وجود تغيرات واضحة في انسجة الكبد تمثلت بظهور احتقان وعائي دموي (صور1،B).اما العصير المحضر من اجزاء الثمار التي لم تظهر عليها اعراض الاصابة بالفطر *A.terreus* فقد أحدث احتقان وعائي شديد(sever vascular congestion)(صور1،C). وقد يعود سبب هذهِ التأثيرات الى النواتج الايضية للفطر وخاصة المركبات السامة للفطر *A.terreus* حيث لها تأثير على لبيدات الغشاء البلازمي اذ تؤدي الى فقدان الغشاء لخاصية النفاذية الاختيارية وبالتالي تحلل الخلية (Cell Lysis)، وقد اشار Papiya،(2005) الى ان النواتج الايضية للفطر *A.flavus* ادت الى احتقان وعائي في الكبد. وقد توصلت الجنابي،(2009) الى نتائج مقاربة لنتائج هذه الدراسة فيما يخص تأثير العزلة السامة للفطر *A.flavus* على انسجة الكبد في الجرذان المختبرية.

وقد بينت نتائج الفحص المجهري لمقاطع طحال الحيوانات المعاملة بعصير الجزء المصاب بالفطر *A.terreus* حدوث تضخم اللب الابيض(White pulb hyperplasia) نتيجة انقسام خلايا انسجة الطحال على نحو غير طبيعي فقد اشار Albright،(2001) الى ان السموم ومنها سم السترنين يعد من المواد المولدة للسرطان (Carcinogenic) علماً ان الفطر *A.terreus* ينتج هذا السم (ابراهيم والجبوري،1998) وكذلك حدثت نفس الحالة لعصير الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض الاصابة بالفطر اعلاه على انسجة الطحال بتضخم اللب الابيض(صور2).

وكذلك اظهرت نتائج الفحص النسيجي للامعاء الدقيقة وجود تغييرات واضحة ايضاً فقد حصل انتفاخ في الزغابات للحيوانات المعاملة بعصير المصاب بالفطر *A.terreus* اما عند المعاملة بعصير الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض الاصابة بنفس الفطر في اعلاه فقد حدث انتفاخ في الزغابات مع قصر في بعضها (صور3).

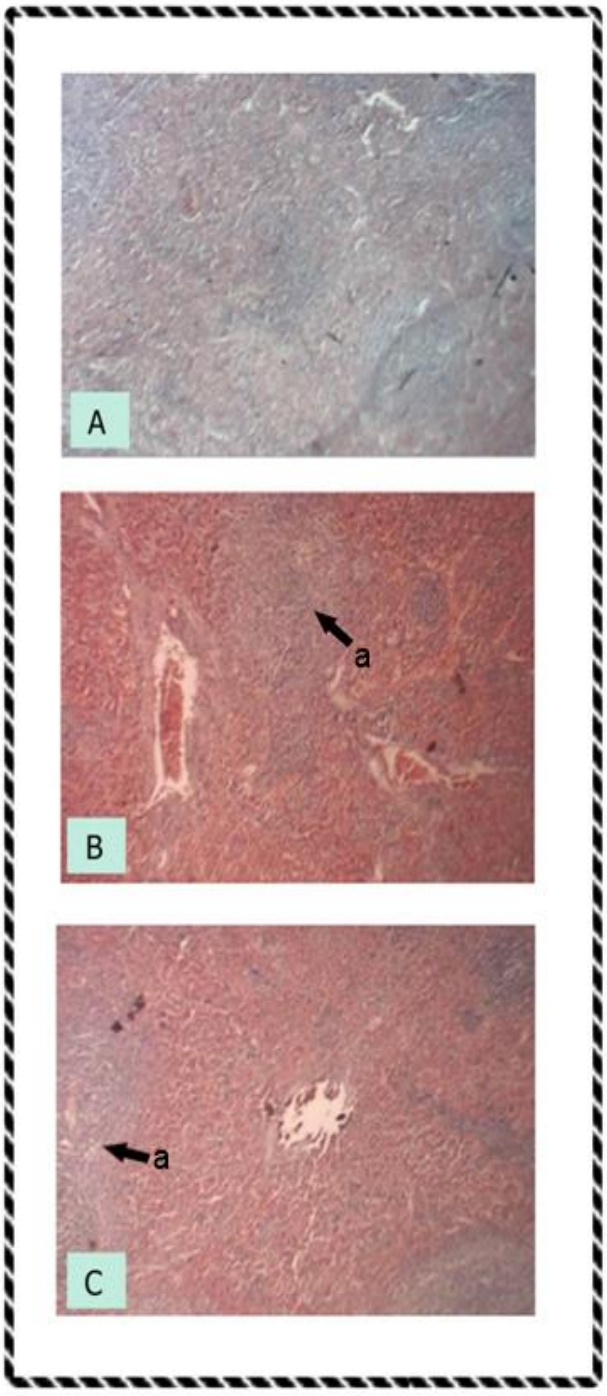
اشار Lia وجماعته،(2000) الى ان سم Patulin يؤثر في القناة الهضمية للحيوانات المختبرية مؤدياً الى حدوث تقرحات فيها وقد ذكرت بعض الدراسات ان السموم الفطرية تعمل على تخريب الطبقة المخاطية (Mucosal layer) في المعدة والقناة الهضمية مما يؤدي الى حدوث تغيرات في محتويات الدهون وذلك ناتج عن تأثير الانزيم المحلل للدهون (Lipase) (Chiou وجماعته، 2001؛ Sedlakova وجماعته،2001).

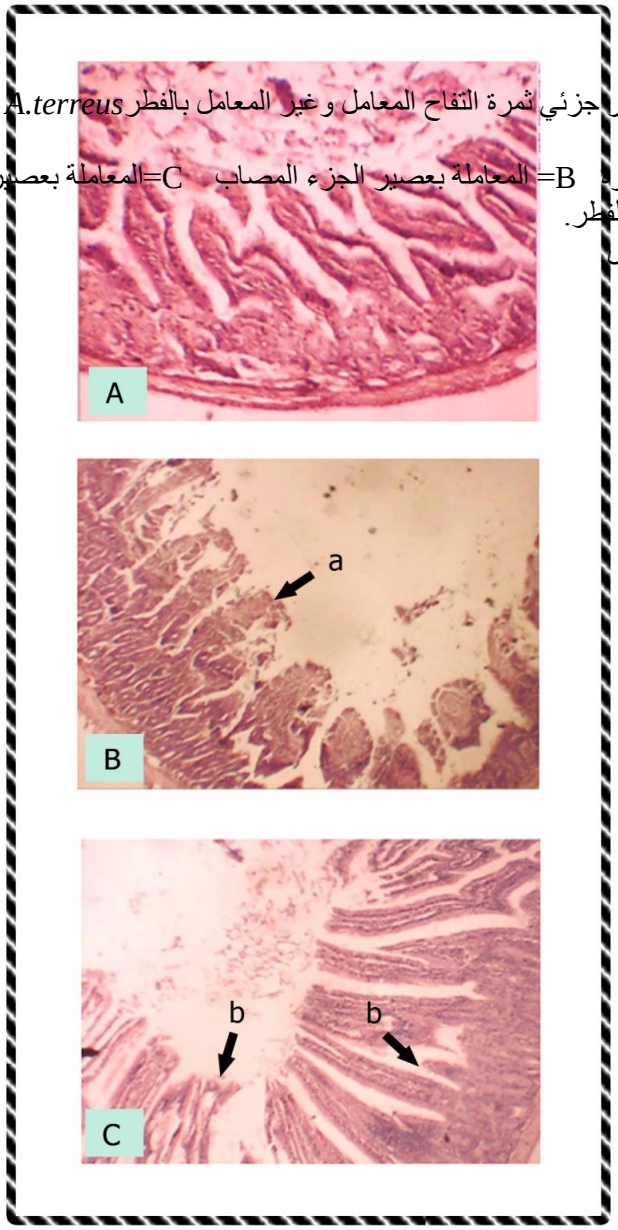


a=احتقان وعائي دموي .

b= احتقان وعائي شديد.

صور(1) تأثير عصير جزئي ثمرة التفاح المعامل وغير المعامل بالفطر *A.terreus* في كبد الجرذان المختبرية (40x).
A= معاملة السيطرة B= المعاملة بعصير الجزء المصاب C=المعاملة بعصير الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض الاصابة بالفطر.





صور(2) تأثير عصير جزئي ثمرة التفاح المعامل وغير المعامل بالفطر *A.terreus* في طحال الجرذان المختبرية. (40x)

A= معاملة السيطرة B= المعاملة بعصير الجزء المصاب C=المعاملة بعصير الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض الاصابة بالفطر.

a=تضخم في اللب الابيض

a= انتفاخ في الزغابات.

b= انتفاخ في الزغابات مع قصر بعضها.

صور(3) تأثير عصير جزئي ثمرة التفاح المعامل وغير المعامل بالفطر *A.terreus* في الامعاء الدقيقة. (40x)

A= معاملة السيطرة B= المعاملة بعصير الجزء المصاب C=المعاملة بعصير الجزء الذي لم تظهر عليه اعراض الاصابة بالفطر.

المصادر

ابراهيم، إسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري (1998). السموم الفطرية، مركز إباء للأبحاث الزراعية صفحة 343.

الجنابي، بيداء عبود حسن. (2009). دراسة التأثيرات السمية للفطر Aspergillus flavus في بعض المعايير الفسيولوجية والكينوحيوية والنسيجية لدى اناث الجرذ الابيض وامكانية السيطرة الحيوية على الاضرار الناجمة عنها. رسالة ماجستير- كلية العلوم. جامعة الكوفة.

ميخائيل، سمير وتركي بيدر، (1982). امراض البذور، دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

Albright, D.M. (2001). Human health effects of airborne mycotoxin exposure in fungi contaminated indoor environments. J. Professional safety. P.26-28..

Baert ,K. ; Kamala, A; De Meulenear, B. ; Huybrechts,I. ; De Henanw,,S. ; Devlieghere, F. (2006). Exposure Assessment of patulin in apple Juice for Flwmish young children.

Bancroft, J. D. & Stevens A. (1982). Theory and Practice of Histology techniques. Churchill Living stone, New York. 117.

Bennet and Known- Chung, K.J., J. E. (1992). Medical Mycology. Lea and Febiqer. PP: 235,866.

Brown, B. A. (1976). Hematology: Principles and Procedures. 2nd , Lea and Febiger. Philadelphia.

Chiou, A.; Verger, R. and Kokotos, G. (2001). Synthetic routes and Lipase-lihibiting activity of long chain alpha- keto amides. Lipids, 36(5):535-542.

Cocker, R.D.; Jones, B.D.; Nagler, M.J.; Gillman, G.A.; Walbridge, G.A. and pangrahi, A.J. (1984). Mycotoxin training manual tropical development and research institute overseas development administration. pp35.

Lia, C.L.; Y.M. Fuh and shtt, D.Y.C. (2000). Detection of mycotoxin patulin in apple juice. Journal of food and Drug Analysis, 8:85-96.

Marin, D.E.; Taranu, I.R.P.; Bunacin, F.; Pascale, Tudor, D.S.; Avarm, N.; Sarca, M.; Cureu, I.; Criste, R.D.; Stuta, V. and Oswald, I.P. (2002). Changes in Performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in wealing piglets exposed to low doses of aflatoxin. J. Anim. Sci. 80:1250-1257.

Papiya, Mazumdar (2005). Pharmacological and toxicological studies of some mycotoxins in animals. Thesis.

Raper, K. B. and Fennel, D. I. (1965). The genus Aspergillus Williams and Wilkins Company. Baltimore. PP:686.

Sakhare, P.S.; Harne, S.D.D.R.; Kalorey, D.; Warke, S.R.; Bhandarkar, A.G.& Kurkure, N.V. (2007). Effect of toxirak polyherbal feed supplement during induced

aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. Vet. Archiv., 77: 129-146.

Sedlakova, A.; Kohout, A. and Sarissky, M.(2001). changes of gastric lipase activity after ethanol and indomethacin administration: Influence of pre- treatment with allopurinol, pentoxifylline and LDOPA. Physiol. Res., 50(3): 299-307.

Wyenandt, A.; Multrooney, R.P.; Everts, K.L. and Rideout, S.L. (2008). Agriculture Experiment station. Rutgers University, 37pp.