مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (29) العدد (3) 2007
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (29) No. (3) 2007

الكشف عن التلوث بفطور التخزين والأفلاتوكسينات في بذور فول الصويا

الدكتورة صباح المغربي*
الدكتور محمود حسن**
نهى عليو***

(تاريخ الإيداع 2 / 5 / 2007. قبل للنشر في 2007/6/20)

□ الملخّص □

تم الحصول من تسع عينات بذور فول صويا محلية ومستوردة على /242/ عزلة نقية تتبع ل18 جنساً فطرياً، حيث عزلت على مستنبتي PDA,MSA وورق الترشيح، وكان أكثر الأجناس انتشارًا جنس *Aspergillus*، إذْ وصلت نسبة التلوث فيه إلى 88.33% في بعض العينات، ومن الأنواع المهمة التابعة له والتي ظهرت في معظم العينات *A. flavus*، *A. parasiticus*، *A. niger*، كما ظهرت أجناس أخرى تليه في الأهمية منها*Penicillium,Fusarium,Rhizopus,Absidia,Mucor,Alternaria,Trichoderma*.

قدرت الأفلاتوكسينات الكلية (B1,B2,G1,G2) في العينات بطريقة الأعمدة الدقيقةMinicolumn Aflatest باستخدام جهاز Vicam Flurometer، فَتَبَيَّن أن كل العينات ملوثة بالأفلاتوكسينات، وبلغ أعلى تركيز لها PPB28 في عينة محلية، ولم يظهر المحتوى الرطوبي للبذور علاقة واضحة بتركيز الأفلاتوكسينات فيها، في حين انخفضت نسبة إنبات البذور عموماً نتيجة الإصابة الفطرية، وبشكل خاص في المعاملات التي لم تطهر فيها البذور سطحياً على مستنبت PDA وورق الترشيح.

الكلمات المفتاحية: أفلاتوكسينات– فطور– فول الصويا.

* أستاذ في قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين–اللاذقية– سورية.
** أستاذ في قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
*** طالبة ماجستير في قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (29) العدد (3) 2007
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research - Biological Sciences Series Vol. (29) No. (3) 2007

Detection of Contamination by Storage Fungi and Aflatoxins in Soybean Seeds

Dr. Sabah Almaghribi*
Dr. Mahmud Hasn**
Noha Alio***

(Received 2 / 5 / 2007. Accepted 20/6/2007)

□ ABSTRACT □

A total of /242/ fungal isolates belonging to /18/ genera have been obtained from nine samples of local and imported soybean seeds. The isolation was on PDA, MSA media and blotter paper. The most prevalent genus was *Aspergillus* where the contamination percentage was 88.33% in some samples, and the most important species were *A. flavus, A. parasiticus*, *A. niger*, followed by other genera *Penicillium, Fusarium, Rhizopus Absidia, Mucor, Alternaria, Trichoderma.*

The total Afaltoxins (B1, B2, G1, G2) were assessed by minicolumn aflatest method using vicam Flurometer where all samples were contaminated with Aflatoxins; and the highest percentage was 28ppb in local sample.

The moisture content of the seeds did not show obvious relationship with the Aflatoxins concentration while the percentage of seeds germination affected by fungal infection; and it was low in general, especially on the non-sterile seeds on PDA media and blotter paper.

Key words: Aflatoxins, Fungi, soybean.

***Professor, Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
****Professor, Department of Plant protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*****Postgraduate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يعدّ فول الصويا *Glycine max* من أقدم البقوليات التي عرفها الإنسان، وهو من المحاصيل الاقتصادية المهمة، كونه متعدد الأغراض (غذائي، علفي، صناعي، سمادي)، وتأتي أهميته الغذائية من احتواء بذوره على نسبة عالية من البروتين تتراوح مابين 30–55% إضافةً لاحتوائها على 17–25% من المواد الدهنية (معلا وحربا، 2005).

تتميّز بروتينات فول الصويا بنوعيتها الجيدة ورخص ثمنها وغناها بالأحماض الأمينية الأساسية والفيتامينات، إضافةً لبعض المعادن الضرورية للإنسان. يستخدم دقيق الصويا في صناعة الخبز والمعجنات والحليب الذي يحتوي 3.5% من البروتين، لذلك يستخدم بديلاً عن الحليب الحيواني، ويدخل في صناعة الجبن كما أن له دوراً مهماً في معالجة مرض السكري وتضخم الغدة الدرقية وقرحة المعدة. يستخدم النبات في تغذية الحيوانات كعلف أخضر ودريس وكسبة، بالإضافة إلى العديد من الاستخدامات الأخرى (رقية وآخرون،2005).

تتعرض محاصيل الغذاء بصفةٍ عامة، ومحاصيل البذور بصفةٍ خاصة، إلى أضرارٍ كبيرةٍ نتيجة الإصابة بفطور التخزين، ويمكن تلخيص أوجه الضرر الناتج عن فطور التخزين بما يلي(ميخائيل، 1992):

1- انخفاض القدرة على الإنبات أو فقدها كليا.
2- عفن الحبوب.
3- حدوث تغيرات بيوكيميائية في الحبوب.
4- إنتاج سموم فطرية (توكسينات) Mycotoxins ضارة بالإنسان والحيوان الزراعي.
5- فقد في وزن الحبوب.

من أهم الفطور التي تصيب بذور فول الصويا المخزونة تلك الأنواع التابعة لأجناس: *Aspergillus, Fusarium,Penicillium* إذْ تؤدي الأنواع التابعة لجنس Aspergillus إلى تعفنات لبذور وكسبة فول الصويا ضمن مجالات مختلفة من درجات الحرارة والرطوبة، وتختلف هذه الدرجات بمدى ملاءمتها للفطور حسب نوع الفطر. فمثلا يصيب النوع *Aspergillus ochraceus* بذور فول الصويا عند رطوبة نسبية 80% أو محتوى رطوبي 14.5–15% (نمور،1995)، وتعدّ درجة الحرارة عنصراً محدداً لكميات الرطوبة اللازمة، فعند توافر درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر تكون الاحتياجات من الرطوبة أقل ما يمكن، بينما تصل الاحتياجات من الرطوبة إلى أعلى معدلاتها كلما اقتربت درجة الحرارة من الحدود الدنيا أو العظمى اللازمة لنمو الفطر، لذلك فإن جميع العوامل البيئية تتداخل في إحداث تأثيراتها، مما يجعل من الصعوبة بمكان تحديد مسؤولية كل عنصر على حدة (محمد سعد،1991).

إن بعض الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* تفرز سموماً فطرية تعرف بالأفلاتوكسينات (Aflatoxins)، وهي نواتج استقلاب ثانوية لسلالات عديدة من الفطور، وسميت بذلك لكونها عزلت للمرة الأولى من النوع *A. flavus*، وتشمل أربعة سموم رئيسية هي: B1,B2,G1,G2، يمكن أن يحدث إنتاج هذه السموم في الحقل قبل الحصاد أو في مراحل ما بعد الحصاد، ويسبب هذا النوع من السموم اضطرابات مختلفة للإنسان والحيوانات الزراعية، وقد تؤدي إلى تسمم الحيوانات الصغيرة وموتها، وبالإضافة لهذه السموم، يمكن أن توجد كأثر متبقٍ في المنتجات الحيوانية كالحليب والبيض واللحم (Bennett and Klich 2003).

تعد بذور فول الصويا من المواد الغذائية التي تصاب بسهولة بفطور الأعفان، فقد أشار يوسف ورفاقه في عام 2003 إلى أنه قد تم عزل /11/نوعاً فطرياً تعود إلى أربعة أجناس رئيسية، هي: *Aspergillus,Penicillium,Fusarium,Stemphylium* من بذور الصويا المعدلة وراثيا في أرمينيا(يوسف

وآخرون،2003). كما توجد معلومات ليست بالقليلة حول تلوث بذور فول الصويا المنتجة في جنوب شرق الولايات المتحدة الأمريكية بالسموم الفطرية عند استعمالها كمواد غذائية، إذْ اكتشفت فيها السموم الفطرية التي تنتجها أنواع تابعة للجنس *Fusarium* وهي موجودة بشكل أكبر في دقيق الصويا وزيته، وبشكل خاص وكبير في غلاف البذور(Winston et al.,1994).

لوحظ في الهند خلال فترة تخزين الصويا من أيار وحتى كانون الثاني أن أكثر الأنواع الفطرية انتشارا هي من الأجناس *Aspergillus,Rhizopus*، وفي كانون الثاني لوحظ ظهور انتشار بعض أنواع *Fusarium,Penicillium,Mucor*، وعند التخزين الطويل للبذور لوحظ تلوث حتى 10% من البذور بالأفلاتوكسين B1 وبتركيز أكثر من 30مكغ/كغ (Joshi et al., 1986)، كما تبيَّن أن بذور فول الصويا تبدي قابلية كبيرة للتلوث بالسموم الفطرية. ففي دراسة أجريت على 55 عينة من البذور الجافة للمحاصيل البقولية لوحظ انخفاض في مستوى وجود السموم الفطرية في بذور الفاصوليا والعدس والحمص والبازلاء، وارتفاعها في بذور فول الصويا ودقيقه (يوسف وآخرون،1999).

يتأثر إنتاج الأفلاتوكسينات بجملة من العوامل المرتبطة مع بعضها البعض كالعوامل الوراثية الخاصة بالعائل والنوع والسلالة الفطرية، إضافة لعوامل بيئية تتعلق بوسط نمو الفطر ومحتواه من العناصر الغذائية والظروف الجوية وزمن التحضين والعمليات الزراعية (عبد الحميد، 2000)، وجد Chang وMarkakis عام 1981 أن الأفلاتوكسينات التي يفرزها النوع *A. parasiticus* لا تظهر عندما يكون المحتوى الرطوبي لبذور الشعير13.5% أو أقل من ذلك، في حين يصل التراكم الأعظمي للأفلاتوكسينات عندما يكون المحتوى الرطوبي للبذور 28–31% (Chang&Markakis,1981).

تمت دراسة تأثير الأصناف والمحتوى الرطوبي لبذور فول الصويا ومحتواها من الأحماض الفيتينية في إنتاج السموم الفطرية، فعند تحضين الأنواع *Aspergillus flavus, A. parasiticus* أبدت الأصناف المختبرة درجة استجابة متماثلة، ولوحظ انخفاض في كمية السموم الفطرية بوجود *A. flavus* في ظروف التجربة، كما لوحظ ارتفاع في كمية السموم الفطرية من 6–10 مرات بارتفاع المحتوى الرطوبي من 30–40% مقارنةً مع المحتوى الرطوبي 25%، أما في حال وجود الأحماض الفيتينية في الوسط فلوحظ بطء في نمو المشيجة الفطرية وبالتالي قلة في إنتاج السموم الفطرية (يوسف وآخرون،2003).

يتم الكشف عن السموم الفطرية في البذور والمواد الغذائية بوساطة العديد من الطرائق الكيميائية باستخدام أجهزة الكروماتوغرافي المختلفة والطرق المناعية الكيميائية، كما تستخدم الطرائق البيولوجية المختلفة كاختبار أجنة بيض الدجاج أو اختبار بيض الجمبري واختبار زراعة الأنسجة(محمد سعد،1991).

أهمية البحث وأهدافه:

نظرًا لأهمية البذور في كونها غذاء للإنسان وأحد مكونات العليقة للحيوانات الزراعية، فإن تلوث البذور المخزونة والمشتقات الناتجة عنها بالفطور"، وخاصة تلك الفطور التي تتطور خلال عمليات النقل والتخزين، " يعد أمراً مهماً وخطيراً على صحة الإنسان والحيوانات الزراعية على حد سواء، خاصةً أن العديد من الأنواع الفطرية هذه قادرة على إفراز سموم فطرية قد تكون قاتلة للحيوانات، أوقد تحدث العديد من الأمراض كالسرطانات والاضطرابات المختلفة، كما

أن العديد من هذه السموم يمكن أن ينتقل للإنسان إما مباشرةً بتناول البذور الملوثة أو بشكل غير مباشر عن طريق المنتجات الحيوانية المختلفة، كاللحم والبيض والحليب. ولعل الطريق الثاني أكثر خطورة من الأول.

يهدف هذا البحث إلى دراسة فطور التخزين التي تصيب بذور فول الصويا، وإلى تحديد نسب الإصابة بكل جنس فطري، وتأثير هذه الإصابة في إنبات البذور، إضافة للكشف عن تلوث بذور فول الصويا بالأفلاتوكسينات، وذلك بتحديد نسبة الأفلاتوكسينات الكلية(B1,B2,G1,G2) في العينات، وعلاقة هذه النسبة بالمحتوى الرطوبي للبذور، وقد أجري هذا البحث في مخبر الأمراض الفطرية في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة تشرين وذلك خلال عامي 2005-2006.

طريقة البحث ومواده:

❖ جمع العينات: تم الحصول على (9)عينات من البذور من مصادر مختلفة، وتراوح وزن العينات (500-5000)غ، وضعت في أكياس من الخام وحفظت في خزانة لفترة وجيزة حتى القيام بعمليات العزل ويوضح الجدول رقم(1) أرقام العينات ومصدرها:

جدول (1):أرقام العينات المستخدمة في البحث ومصدرها.

رقم العينة	مصدر العينة
1	حمص – موسم 2003- (حقول مزارعين).
2	حمص - موسم 2004- (مركز بحوث دمشق).
3	حمص – موسم 2005- (حقول مزارعين).
4	حلب – موسم 2005- (مركز بحوث حلب).
5	إدلب – موسم 2005- (السوق المحلي).
6	الأرجنتين- (مديرية الزراعة باللاذقية)-4\3\2006.
7	دمشق – موسم 2005- (مركز بحوث دمشق).
8	الأرجنتين – (مديرية الزراعة باللاذقية)-26\7\2006.
9	الرقة – موسم 2006- (مركز بحوث الرقة).

❖ تحديد المحتوى الرطوبي للعينات: تم حساب المحتوى الرطوبي للبذور عند بدء التجربة لجميع العينات المستخدمة في الدراسة، وذلك بواسطة جهاز قياس الرطوبةDenver، حيث تم طحن كمية من البذور، ثم وضع حوالي 4غ من العينة المطحونة في صحن الجهاز، وتم التجفيف على درجة حرارة105م حيث يحسب الجهاز نسبة الرطوبة في العينة مباشرة بعد تجفيفها بالكامل، نكرر العملية على 5 مكررات ثم يؤخذ المتوسط الحسابي للمكررات للحصول على المحتوى الرطوبي للعينة.

❖ العزل والتنقية: تمت عمليات عزل الفطور من عينات البذور، وذلك على ثلاثة مستنبتات، وحدد لكل مستنبت معاملتين (بذور مطهرة سطحيا بهيبوكلوريت الصوديوم التجاري10%، وبذور من دون تطهير) وحدد لكل معاملة خمس مكررات، وفي كل مكرر 10بذور، وهذه المستنبتات هي:

- ورق الترشيح (طريقة الغرفة الرطبة): فقد تمت زراعة البذور على ورق الترشيح ضمن أطباق بتري معقمة مع إضافة الماء المقطر والمعقم.
- مستنبت غذائيP.D.A: مستنبت الآجار والدكستروز ومستخلص البطاطا الذي يعدّ ملائماً لنمو الكثير من الأنواع الفطرية(الجمعية العربية لوقاية النبات، 1990).
- مستنبت غذائي M.S.A: مستنبت الآجار وملح كلور الصوديوم ومستخلص المالت الذي يعدّ ملائماً لفطور المواد المخزونة(Maghribi,1985، عبد الحميد، 2000).

تم تحضين الأطباق المزروعة عند درجة حرارة 20± 2 ولمدة 7-10 أيام، ومن دون إضاءة حتى ظهور المستعمرات الفطرية، إذْ تمت الدراسة الأولية عليها لتعرّف الفطور، ومن ثم عد المستعمرات الفطرية استناداً إلى لون المستعمرة وشكلها وتحديد الجنس من خلال الفحص المجهري بالاعتماد على المعطيات العلمية في المرجع(Onion et al;1981)، ومن ثم حساب نسبة الإصابة الفطرية بحساب النسبة المئوية للبذور الملوثة بكل جنس(Sigsgaard et al., 1981، ميخائيل، 2000).

- التنقية: تمت عمليات التنقية على عدة مستنبتات، بما يتناسب وطبيعة الفطر، إذْ تمّتْ زراعة أنواع *Penicillium, Aspergillus* على مستنبت تشابك آجار Czapek agar، وعلى مستنبت خلاصة الخميرة والمالت والآجار M.Y.A، أما أنواع الجنس *Fusarium* فتمت تنقيتها على مستنبت P.S.A مستخلص البطاطا والسكروز وبيئة P.D.Aللمساعدة في عملية التصنيف، وتمت دراسة المواصفات المزرعية وتصنيف الفطور بالاعتماد على المراجع (Nelson et al., 1983،Onion et al., 1981).

❖ <u>حساب نسبة إنبات البذور</u>:

حسبت نسبة إنبات البذور في معاملات مستنبت PDA ووسط الغرفة الرطبة، لأن مستنبت المالت وكلوريد الصوديوم MSA يمنع إنبات البذور بسبب احتوائه على الملح، وتمّ ذلك بعَّد البذور النابتة وأخذ المتوسط الحسابي للمكررات في كل معاملة، وتمت المقارنة بين معاملة البذور المطهرة سطحيا والبذور غير المطهرة لتحديد دور الفطور الملوثة للبذور في إعاقة الإنبات.

❖ <u>تحديد تركيز الأفلاتوكسينات الكلية في العينات</u>:

أ- المواد المستخدمة: حسبت نسبة الأفلاتوكسينات الكلية(B1,B2,G1,G2) بواسطة الأعمدة الدقيقة Aflatest minicolumn باستخدام جهازVicam Fluorometer في مخبر تحليل السموم في مديرية التموين في اللاذقية، ومجال الاختبار لهذه الطريقة بين 0-50 ppb والمواد اللازمة لإجراء التحليل هي: أعمدة خاصةAflatest، جهاز قياس الفلورة، ماصات، أسطوانات مدرجة، ورق ترشيح خاص يأتي مع الجهاز 24سم، أقماع ترشيح، ورق ترشيح زجاجي 11سم، كاشفDeveloper، ماء مقطر، خلاط من الستانلس ستيل، ملح طعام(NaCl)، ميثانول.

ب- طريقة العمل: 1- يعاير الجهاز بوساطة الأمبولات القياسية الخاصة به، ثم يحضر المحلول الكاشف بأخذ 1مل منه وتضاف إلى 9 مل ماء مقطر تمزج جيدا على رجاج، وتوضع في الظلام ضمن عبوة داكنة لكي لا يتخرب المحلول بالضوء(يتم تحضيره يوميا).

2- يحضر محلول الاستخلاص ميتانول/ماء مقطر بنسبة /20:80/، ويطحن جزء من العينة ويؤخذ 50غ من العينة المطحونة، يضاف لها 5غ من ملح كلور الصوديوم النقي في الخلاط، ويضاف للخليط 100مل محلول استخلاص/ميتانول:ماء مقطر/، ثم يتم الخلط بالسرعة القصوى لمدة دقيقة واحدة.

3-يرشح الخليط الناتج على ورق ترشيح، يؤخذ 10مل من الرشاحة وتمدد ب 20مل ماء مقطر، وتخلط جيدا، ثم يتم الترشيح على مرشح زجاجي دقيق Glass microfibre filter، يؤخذ من الرشاحة 1مل يوضع في المحقن(جزء تابع للجهاز) يوضع تحت المحقن العمود الخاص بفصل الأفلاتوكسينات، نقوم بضغط المحقن ببطء بمعدل نقطة إلى نقطتين في الثانية حتى خروج الهواء.

4- يضاف للمحقن 1مل ماء مقطر، وتمرر عبر العمود بمعدل نقطة إلى نقطتين في الثانية، وتكرر العملية مرة أخرى مع الماء المقطر حتى خروج الهواء. بعد ذلك يوضع أنبوب زجاجي صغير خاص بالجهاز تحت العمود، ويضاف للمحقن 1مل ميتانول، ويمرر بمعدل نقطة إلى نقطتين في الثانية، فتنحل الأفلاتوكسينات وتصل إلى الأنبوب الزجاجي، ثم يضاف له 1مل من المحلول المظهر، وتخلط جيدا على هزاز. يوضع هذا الأنبوب في جهاز Vicam Fluorometer لإجراء القياس والحصول على تركيز الأفلاتوكسينات في العينة(Vicam,1997).

النتائج والمناقشة:

يبين الجدول (2) الأجناس وأهم الأنواع الأكثر وجوداً في معظم العينات مع عدد العزلات الخاصة بكل جنس، كما يبين الجدول(3) النسب المئوية للإصابة بكل جنس فطري للعينات التسع المدروسة، إذْ تم الحصول على /242/عزلة نقية، تتبع ل18 جنساً فطرياً، تنتمي إلى أربعة صفوف فطرية شكلت فيها الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* النسبة الأكبر/98/ عزلة، وهو الجنس الأكثر تردداً في كل العينات. واحتل النوعان *A. flavus* و *A. parasiticus* في تلك النسبة المرتبة الأولى /55/عزلة، وقد كانا مترافقين، وكانت نسبة الإصابة فيهما مرتفعة في العينات رقم(1،4،5،6).

جدول (2):بعض الأنواع الفطرية المعزولة من بذور فول الصويا والأجناس والصفوف التابعة لها إضافة لعدد عزلات كل جنس.

الصف	الجنس والنوع	عدد العزلات
CL.Oomycetes	*Pythium* sp	2
CL.Zygomycetes	*Absidia ramoza* (Lindt) Lendner	5
	Mucor spp. Micheli ex Fries	9
	Rhizopus spp. Ehrenberg ex Corda	6
CL.Ascomycetes	*Aspergillus fumigatus* vuill *A. flavus* Link ex Fries *A. niger* V.Tiegh *A. candidus* Link *A. terreus* Thom *A. nidulans* Berk.&Br *A. parasiticus* Speare *A. tamarii* Kita *A. ochraceus* Wilhelm *A. versicolor* Vuill *A. glaucus* Link ex Fries	98
	Penicillium citreoviride Biourge *P. fellutanum* Biourge *P. chrysogenum* Thom *Penicillium*.spp.	25

	Saccharomyces.spp.	
14	*Fusarium moniliforme* Sheldon *F. oxysporum* Schlecht *F. tricinctum* (Corda)Sacc	CL.Deuteromycetes
18	*Alternaria tenussima*(Kunze ex Pers)Wiltshire *A.alternata* (Fr) Kieissler *A.oheiranthi*	
15	*Cladosporium* spp Link ex Fries	
4	*Botrytis* spp Person ex Fries	
7	*Trichoderma* spp Persoon ex Fries	
5	*Trichothecium roseum* (Pers)Link ex Fries	
3	*Cephalosporium* sp Link ex Fries	
2	*Scopulariopsis brevicaulis* (Sacc)Bainier	
8	*Rhizoctonia solani*	
2	*Sclerotinia sclerotiorum*	
4	*Ulocladium* sp	

إضافةً إلى 15 عزلة من الفطور التي لم تعطِ سوى مشيجة عقيمة.

جدول(3):النسب المئوية للإصابة بكل جنس فطري على العينات المدروسة.

الجنس الفطري	رقم العينة								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aspergillus	32.6	31.6	40.0	86.0	68.0	57.6	88.3	2.0	12.3
Penicillium	13.3	7.3	1.3	–	12.3	0.3	–	–	7.3
Cladosporium	12.7	20.0	20.0	0.3	–	–	–	61.0	31.0
Mucor	16.0	13.3	11.0	3.3	6.7	9.0	0.6	1.3	14.0
Rhizopus	–	9.0	–	–	2.0	6.0	5.0	18.0	16.6
Absidia	4.0	1.0	17.0	10.3	9.3	6.3	0.3	–	–
Alternaria	1.3	1.6	2.3	–	1.7	–	–	6.0	0.3
Fusarium	2.0	2.0	0.3	–	–	–	–	7.0	6.3
Rhizoctonia	0.3	2.3	0.3	–	–	1.3	–	0.6	4.0
Trichoderma	–	1.0	3.0	–	–	2.0	–	–	–
Sclerotinia	–	3.3	0.3	–	–	–	–	–	–
Botrytis	1.3	3.0	1.6	–	–	–	–	–	–
Trichothecium	0.3	1.4	1.3	–	–	–	–	–	–

Pythium	0.3	–	1.0	–	–	–	–	–	–
Scopulariopsis	0.3	–	–	–	–	–	–	–	–
Cephalosporium	0.3	0.3	–	–	–	–	–	–	–
Saccharomyces	15.3	2.3	–	–	–	17.0	5.6	3.2	4.3
Ulocladium	–	–	–	–	–	–	–	0.6	0.3
مشائج عقيمة	–	0.6	0.3	–	–	0.3	–	0.3	3.6
المجموع	100	100	100	100	100	100	100	100	100

وجد النوع *A. niger* في كل العينات، وكان أكثر تردداً في العينات رقم(1،4،5)، كذلك وجد النوع *A. fumigatus* بشكل كبير في العينتين رقم (6،7)، يليه في الأهمية في العينات ذاتها النوع *A. candidus*، كما تردد النوع *A. nidulans* في العينات رقم (4،5)، وظهر في العينات رقم (2،3) النوعان *A. tamarii* و*A. ochraceus*. أما النوع *A. terreus* فقد وجد بشكل خاص في العينتين رقم (1،2)، كما عزل النوعان *A. versicolor, A. glaucus*. من العينة رقم(8)، مع الإشارة إلى أن هذه الأنواع الأخيرة تفرز أنواعاً مختلفةً من السموم الفطرية التي لا تقل أهميةً عن الأفلاتوكسينات، ولكنها ليست ضمن مجال بحثنا.

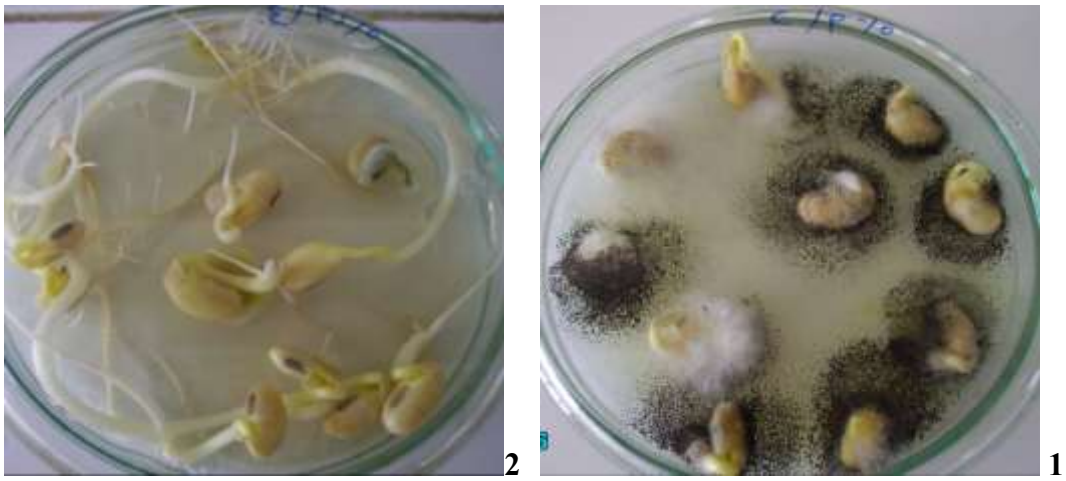
احتلت الفطور التابعة للأجناس *Rhizopus,Absidia,Cladosporium,Mucor,Penicillium* الدرجة الثانية بعد الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* من حيث الانتشار، وبشكل خاص في المعاملات التي لم يتم تطهير البذور فيها، ثم تلتها بقية الأجناس التي كانت نسبة التلوث فيها منخفضة ومختلفة من عينة لأخرى كما يظهر في الجدول رقم(3). وهذه النتيجة تتطابق مع ما قدمه(Kacaniova(2003، إذْ أشار إلى أن تلك الأجناس هي الأجناس الأكثر ترددا وظهوراً في بذور فول الصويا مع الجنس *Aspergillus*. هذا وقد كانت نسبة التلوث بجنس *Penicillium* مرتفعة في العينات 1و2و5 مقارنةً بباقي العينات، نتيجة التخزين الطويل للبذور، وهذا ما يتوافق مع(Joshi et al., 1986).

ظهر *الجنس Alternaria* في ست عينات حيث لم يظهر في العينات رقم (4،6،7) التي وجد فيها نسب إصابة مرتفعة بالجنس *Aspergillus*، في حين كانت أعلى نسبة إصابة بجنس *Alternaria* في العينة رقم 8، وتوافق ذلك مع نسبة إصابة منخفضة بالجنس *Aspergillus*. وهذا ما يتوافق مع(Wilson et al.,2002) الذي أشار إلى أن وجود أفراد تابعة للجنس الأخير تعيق وتمنع نمو الألترناريا، كما عزل جنس *Fusarium* من العينات(1،2،3،8،9) وهو الذي يعدّ من الفطور الحقلية الملوثة لبذور فول الصويا، والذي تفرز الأنواع التابعة له العديد من السموم كالزيرالينون Zearalenone الذي يحدث اضطرابات هرمونية، والفومونيزين Fumonisin والفيوزارين Fusarin والتريكوثيسينات Trichothecenes مثل T-2 الذي يسبب نزيفاً هضمياً لدى الحيوانات الزراعية(Park et al.,1999).

وقد ظهر *الجنس Cladosporium* بنسبة كبيرة في بعض العينات، وخاصة العينة رقم8، وهو من فطور الحقل. ويعدّ من الأعفان الملوثة للغذاء، وبعض أنواعه تفرز سموماً فطرية مثل كلادوسبورين Cladosporin

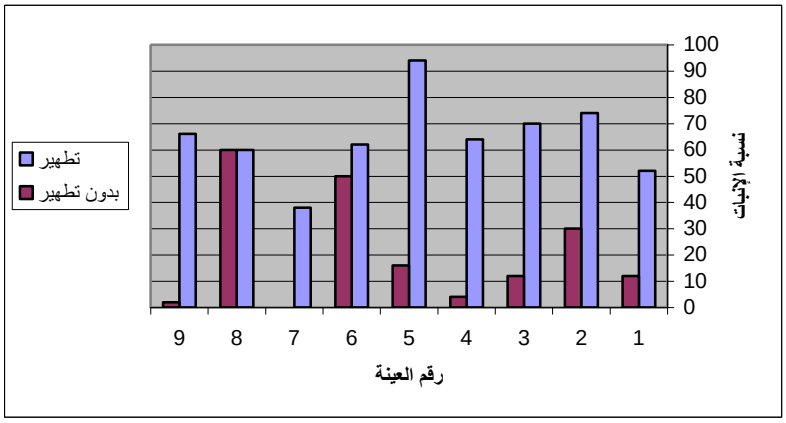
والإيمودين Emodin التي تسبب تحسسات وتبقعات جلدية للإنسان (Dehoog et al.,2000). هذا، وتجدر الإشارة إلى أن باقي الأجناس على قدر من الأهمية أيضاً لكونها تقوم بإفراز أنواع أخرى من السموم الفطرية المهمة. فالأجناس *Trichoderma, Cephalosporium, Trichothecium* تفرز العديد من الأنواع التابعة لها سموم الترايكوثيسينات التي توجد في الغذاء والعلف على حد سواء، وتسبب تقرحات جلدية وإقياءات ونزيفاً هضمياً (Bennett and Klich,2003).

عند دراسة تأثير الإصابة الفطرية في نسبة إنبات البذور تبين أن تطهير البذور سطحيا قد أسهم في ارتفاع نسبة إنبات البذور في معاملات مستنبت PDA وورق الترشيح، بالمقارنة مع معاملات دون التطهير، التي انخفضت نسبة الإنبات فيها شكل(1).

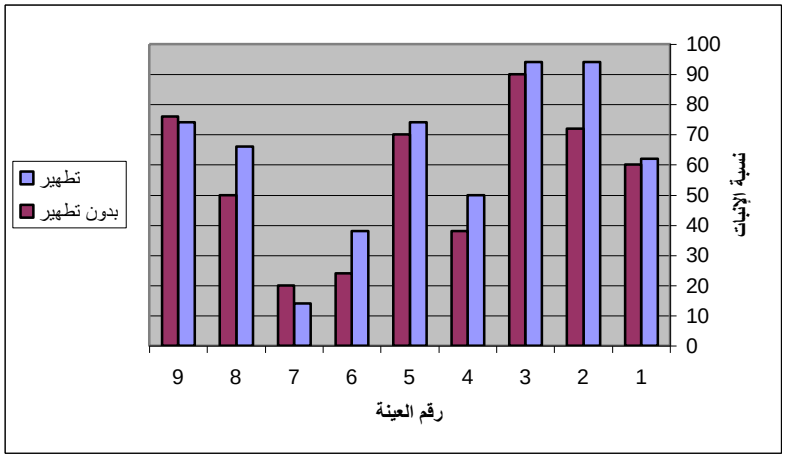


شكل(1):تأثر نسبة الإنبات بالتطهير السطحي للبذور على مستنبت PDA 1- دون تطهير 2- مع تطهير

ومن جهة أخرى نجد أن نسبة إنبات البذور انخفضت بشكل عام حتى في المعاملات التي عقمت فيها البذور سطحيا، نتيجة الإصابة الفطرية. وهذا ما يوضحه المخططان 1و2، وهو يدل على أن تلوث البذور سطحياً بالفطور يعيق إنباتها إلى حدٍّ كبير. وهذا ما يتوافق مع ميخائيل (1992).



مخطط(1): تأثير التطهير السطحي لبذور فول الصويا في نسبة إنباتها في معاملة المستنبت الغذائي PDA.



مخطط(2): تأثير التطهير السطحي لبذور فول الصويا في نسبة إنباتها في معاملة ورق الترشيح.

قد لا يسهم فحص الفطور في الحصول على تقييم جيد لحجم تلوث الغذاء بالسموم الفطرية، لذا يجب أن يكتمل التقييم بالكشف عن سموم الفطور، ويبين الجدول(5) أن كل العينات كانت ملوثة بالأفلاتوكسينات، ولكن بتراكيز متفاوتة:

جدول (4):العلاقة بين نسبة المحتوى الرطوبي للبذور ونسبة الأفلاتوكسينات الكلية في العينات.

رقم العينة	متوسط المحتوى الرطوبي للبذور %	نسبة الأفلاتوكسينات(B1,B2,G1,G2)PPB
1	2.7	18.0
2	7.3	8.5
3	9.6	9.9
4	9.2	28.0
5	10.6	18.0
6	10.7	22.3
7	10.8	18.0
8	11.2	15.0
9	9.4	13.0

وجدت عينتان(4،6) كان تركيز الأفلاتوكسينات فيهما (22.3،28.0)ppb على التوالي، وهي نسب أعلى من النسبة المنصوح بها، وفق المواصفة رقم/2680/ التي أقرتها هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، إذْ حددت هذه النسبة ب ppb20 للحبوب والمكسرات والبذور الزيتية ومنتجاتها، ومنها فول الصويا (وزارة الصناعة 2002)، وترافقت هذه العينة مع إصابة بالفطرين*Aspergillus flavus A.parasiticus* بلغت نسبتها 46% في العينة رقم 4 و13.66% في العينة رقم 6، ويعدّ هذان الفطران هما المسؤولين عن إفراز الأفلاتوكسينات.

تفاوتت نسبة الأفلاتوكسينات الكلية في باقي العينات، بالرغم من ارتفاع نسبة التلوث في بعضها بفطور *Aspergillus*. وهذا ما يتوافق (BEAN et al., 1972)، إذْ إن نسبة الإصابة المرتفعة بالجنس *Aspergillus* لا تترافق بالضرورة مع نسبة مرتفعة من الأفلاتوكسينات، ذلك أن وجود الفطور لا يدل دائما على وجود تركيز عال من الأفلاتوكسينات، وهو ما يعود كذلك إلى الأنواع، وحتى السلالات التابعة لذلك الجنس والقادرة على إفراز الأفلاتوكسينات، وهذا يتوافق أيضاً مع (Gupta and Venki 1975).

شكل(2): إصابة البذور بشكل كامل بفطر *Aspergillus flavus* في العينة رقم 4.

الاستنتاجات والتوصيات:

1- نستنتج من هذا البحث أن بذور فول الصويا، سواء أكانت محلية أم مستوردة، تصاب بعد عمليات الحصاد، وخلال النقل والتخزين، بالعديد من الأنواع الفطرية التي تنتمي إلى عدة أجناس من أهمها: *Aspergillus ,Penicillium,Fusarium,Rhizopus,Absidia,Mucor,Alternaria,Trichoderma,Rhizoctonia.*

2- تتلوث بذور فول الصويا بالأفلاتوكسينات التي يفرزها النوعان*Aspergillus flavus, A.parasiticu* فقد كانت كل العينات المدروسة ملوثة وبتراكيز مختلفة. ويعود ذلك إلى العديد من الظروف الطبيعية والكيماوية والبيولوجية وغيرها. هذه الأفلاتوكسينات التي تعدّ مواد مسرطنة ومطفرة للإنسان والحيوان الزراعي.

3- تتأثر نسبة إنبات بذور فول الصويا بمقدار درجة تلوثها بالفطور السطحية والداخلية ونوع هذه الفطور، إذ تنخفض نسبة الإنبات عموما.

4- تلوث بذور فول الصويا بالأفلاتوكسينات لا يعني عدم تلوثها بأنواع أخرى من السموم، فكل الأجناس الفطرية المذكورة سابقا تفرز سموماً فطرية مهمة جداً، لذلك لابد من الكشف عنها بالطرائق المتاحة الأخرى، كأجهزة الكروماتوغرافي المختلفة، أو الطرائق الحيوية أو المناعية وغيرها.

5- قد لا تبدي دراسة عامل طبيعي واحد، كالمحتوى الرطوبي للبذور، علاقة واضحة مع نسبة السموم الفطرية فيها، وبشكل خاص الأفلاتوكسينات، كما في دراستنا هذه، لذلك يجب دراسة تأثير مجموعة من العوامل المشتركة والمتفاعلة مع بعضها، كدرجة حرارة الوسط، ودرجة حرارة المخزون، والرطوبة النسبية، والأضرار الميكانيكية، في البذور، كالإصابات الحشرية وغيرها من عوامل أخرى فيزيائية وكيميائية.

6- إنه من الضروري إعطاء الدعم والأهمية اللازمة لمثل هذه الدراسات، والتعمق في دراسة السلالات الفطرية المفرزة للأفلاتوكسينات وغيرها من السموم الفطرية الخطيرة، التي تعد مسببات مهمة لأمراض السرطانات

المختلفة، فقد أكدت التقارير العلمية حقيقة أن الأنواع و السلالات التابعة لجنس واحد تتفاوت بصورة ملحوظة في مقدرتها على إنتاج السموم الفطرية، إضافة لدراسة العوامل المختلفة المؤثرة في إنتاج تلك السموم.

7- ننصح بإجراء دراسات مماثلة ومطورة على أنواع أخرى من البذور التي تدخل في الغذاء البشري، وفي العليقة بالنسبة للحيوانات، لما لهذا الأمر من أهمية في تأمين غذاء صحي وسليم.

المراجع:

1- الجمعية العربية لوقاية النبات. *المرشد الوجيز في أمراض النبات*، ترجمة بسام بياعة–الطبعة الثانية بالاشتراك مع منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة ومكتب الكومنولث الزراعي–1990–599.

2- رقية، نزيه؛ عبد الحميد، عماد؛ عبد العزيز، محمد؛ سلامة، سليمان؛ محمد، يوسف؛ علي ديب، طارق؛ سعد، فؤاد. *إنتاج المحاصيل الحقلية* – مديرية الكتب و المطبوعات الجامعية – جامعة تشرين – سورية –2005–413.

3- عبد الحميد، محمد عبد الحميد. *الفطور والسموم الفطرية*–دار النشر للجامعات–القاهرة–مصر–2000–539.

4- محمد سعد، مجدي مجد الدين. *السموم الفطرية مشكلة زراعية وبيئية وصحية*–الهيئة العامة المصرية للكتاب–مصر–1991–179.

5- معلا، محمد؛ حربا، نزار. *تربية المحاصيل الحقلية*(الجزء النظري)–مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية–جامعة تشرين–سورية –2005–448.

6- ميخائيل، سمير. *أمراض البذور* – كلية الزراعة– جامعة الإسكندرية– منشأة المعارف –مصر–1992–263.

7- ميخائيل، سمير. *أمراض البذور*–منشأة المعارف بالإسكندرية–الطبعة الثالثة–مصر–2000–334.

8- نمور، دمر. *وقاية المواد المخزونة* – مديرية الكتب والمطبوعات الجامعية – جامعة تشرين– سورية– 1995– 312.

9- وزارة الصناعة بالجمهورية العربية السورية. *الحدود القصوى المسموح بها في الأغذية والأعلاف –الأفلاتوكسينات*– هيئة المواصفات و المقاييس العربية السورية –مواصفة رقم2680– قرار اعتماد رقم 362–سورية–2002.

10- يوسف، عمران؛ غريغوريان، كارينا مارتينوفا؛ أوسيبان، ليا ليفونفنا. *تلوث بذور فول الصويا المعدلة وراثيا والمتداولة في أرمينيا بالفطور المجهرية والسموم الفطرية* – المؤتمر العربي الثامن لعلوم وقاية النبات–جامعة عمر المختار البيضاء ليبيا–2003.

11- يوسف، عمران؛ غريغوريان، كارينا مارتينوفا؛ أوسيبان، ليا ليفونفنا. *سجل للأنواع الفطرية الملامسة للبذار الجافة للمحاصيل البقولية في أرمينيا ونشاطها السمي*– المجلس الأعلى للعلوم أسبوع العلم39–جامعة دمشق–1999.

12-BEAN,A.G;SCHILLINGER,A.J;&KLARMAN,L.W. *Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing strains of Aspergillus spp in soybeans*. Applied microbiology.Vol24,No3, 1972, 437-439.

13-BENNETT,W.J; and KLICH,M. *Mycotoxins*. American Society for Microbiology. Tulane university, New Orleans, Louisiana,.Vol16,No3,2003, 497-516

14-CHANG,H.G; and MARKAKIS,P. *Effect of moisture content on aflatoxin production in barley*. Cereal Chemistry, Vol.58, No.2, 1981,:89-91.

15-DEHOOG,G.S.F;QUEIROZ-TELLES,G;HAASE,G;FERNANDEZ-ZEPPENFELDT,D.A;ANGELIS,A;VANDENENDE,T;MATOS,H;PELTROCHE-LLACSAHUANGA,A.A;PIZZIRANI-KLEINER,J;RAINER,N;RICHRD-

YEGRES,V;VICENTR,and YEGRES,F. *Black fungi*. clinical and pathogenic approaches. Med Myco, 38, 2000:243-250.

16-GUPTA, S.K; and VENKITASUBRAMANIAN,T.A. *Production of aflatoxin on soybeans*. Applied Microbiology.Vol29, No6, 1975, 834-836.

17-JOSHI.B,C;SRIVASTAVA,S.K;and PRAJAPATI,S.K. *Studies on detection of mycoflora and aflatoxin B1in stored Soybean Bull*. Grain Technol.1986,T24,No 3,.206-210.

18-KACANIOVA, M. *Feeding soybean colonization by microscopic fungi*. Trakya University J Sci 4(2), 2003,165-168.

19-MAGHRIBI,S.*Recherche sur les moisissures toxinogenes des orges de brasserie et des malts*. These Docteur es Sciences.l'Universite' de Nancy I,1985,255.

20-NELSON,P.E;TOUSSOUN,T.A;&MARASAS,W.F.O.*Fusarium Species An illustrated manual for identification.* The Pennsylvania State University. Press University Park and London, 1983, 97,142,132.

21-ONION,A.H.S;ALLSOPP,D; and EGGINS,O.W. *Smith's introduction to industrial mycology*. Seventh Edition. British Library Cataloguing in Publication data. London, 1981,398p

22-PARK,J;LEE,K;KIM,J;LIM,S;SEO,J; and LEE,Y. *A Hemorrhagic Factor(Apicidin) produced by toxic Fusarium isolates from soybean seeds.* American Society for Microbiology.Vol.65,, N؛1,1999,126-130.

23-SIGSGAARD,P;ANDERSEN,K;LUND,A; and WELLING,B. *Analytica Microbiologica EBC(suite du n 6/7-1981).*Bios Paris Franc,Vol.12,N؛10-October1981, 31-33.

24-VICAM,L.P.*Aflatest instruction manual*,313pleasant treat Watertown, MA02172 USA,1997, 36-37.

25-WILSON,D.M;MUBATANHEMA,W; JURIEVIC,Z. *Biology and ecology of Mycotoxigenic Aspergillus species as related to economic and health concerns*. Adv. Exp. Med. Biol,, 504,2002.:3-17.

26-WINSTON,H.H;BOWMAN,D.T;PERRY,K.B;RANDELL-SCHADEL,B.L;CASPER,H.H;SWANSON.S.H.*Fusarium mycotoxins in soybeans and cotton seed*. INFORM:Int. New Fats, oils and Relat.Mater.1994, T5,N4,539.