مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (5) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (5) 2008

الكشف عن سمية عزلات فطرية من بذور وكسبة فول الصويا باستخدام بعض الاختبارات الحيوية

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

(تاريخ الإيداع 10 / 9 / 2008. قبل للنشر في 2008/11/19)

□ الملخّص □

تم اختبار/103/ عزلة فطرية نقية من 23 عينة من بذور وكسبة فول الصويا تتبع إلى 17 جنساً فطرياً منها *Pythium, Fusarium, Rhizopus, Absidia, Mucor, Alternaria*، حيث درست سمية هذه العزلات على: إنبات بذور الرشاد*Lepidium sativum*، نمو سلالة من البكتريا*Bacillus subtilis* FZB27، وفطر الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*، وذلك على مستنبتي PDA وTSA إضافةً لمستنبتPSA الخاص بعزلات الجنس *Fusarium*.

استخلصت المزارع الفطرية بالأسيتون 80% ونفذت الاختبارات في أطباق إليزا، حيث تبين وجود39 عزلة متوسطة السمية في الاختبارات الثلاثة، 8 عزلات شديدة السمية أعاقت إنبات بذور الرشاد، و17عزلة منعت نمو البكتريا، وبدت سمية العزلات عالية على مستنبت TSA في اختبار Ls مقارنةً بالمستنبتات الأخرى، وكانت معظم عزلات الجنس *Fusarium* شديدة السمية على مستنبتي PSA،PDA بالنسبة لاختبارBs، ولم تظهر فروق في السمية على المستنبتات بالنسبة لاختبارSc.

الكلمات المفتاحية: العزلات الفطرية– السمية– الاختبارات الحيوية.

* أستاذ – قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
* * أستاذ – قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
***طالبة دراسات عليا (ماجستير)– قسم وقاية النبات– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (30) العدد (5) 2008
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (30) No. (5) 2008

Detection of toxicity of fungal isolates from soybean seeds and meal by using some bioassays

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

(Received 10 / 9 / 2008. Accepted 19/11/2008)

□ ABSTRACT □

A total of /103/ pure fungal isolates from 23 samples of soybean seeds and meal belonging to /17/ genera *Alternaria, Mucor, Absidia, Rhizopus, Fusarium, Pythium* were tested. The toxicity of isolates was studied on: germination of garden cress *Lepidium sativum* seeds, growth of bacterial strain *Bacillus subtilis* FZB27, and yeast fungi *Saccharomyces cerevisiae* on PDA, TSA medias and PSA for *Fusarium* isolates.

The fungal cultures were extracted by Acetone 80%, and tests were performed in Elisa plats. We found 39 isolates with medium toxicity on three testes, 8 isolates with high toxicity inhibit seeds germination, and 17 isolates prevent the bacteria growth. The toxicity was high on TSA media in Ls test compared with other Medias. Most of *Fusarium* isolates were of high toxicity on PDA, PSA Medias in Bs test. No differences in toxicity appeared on Medias in Sc test.

Key words: Fungal isolates - Toxicity - Bioassays.

*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:

اعتقد كثيرٌ من الباحثين في العشرينيات بأن الفطور غير خطرة على صحة الإنسان والحيوان بل واعتقد البعض بأن الأغذية العفنة مفيدة للصحة حتى نوقشت أول حالة تسمم فطري في الماشية عام 1924 ثم توالت التقارير بعد ذلك عن التسممات الفطرية وأهمها كارثة صغار الرومي والبط في مزارع دواجن انجليزية أدت لنفوق مائة ألف فرد نتيجة تلوث العلف بالأفلاتوكسينات التي يفرزها فطر *Aspergillus flavus*، ثم أكدت الأبحاث فيما بعد بأن الفطور تغزو تقريباً كل المنتجات النباتية والحيوانية، وتحت ظروف محددة تنتج السموم الفطرية Mycotoxin(عبد الحميد، 2000)، والتي هي نواتج استقلاب ثانوية تنتجها الفطور على المحاصيل في الحقل أو أثناء النقل والتخزين وتسبب أمراضاً للإنسان والحيوانات نتيجة تعرضها لغذاء وعلف ملوث (Nelson et al.,1993).

لذلك فإن تلوث المواد الغذائية بمختلف أشكالها بالفطور المنتجة للسموم الفطرية قد يسبب أضراراً كبيرةً للإنسان والحيوانات المستهلكة لها، فبعض هذه السموم يعتبر كعوامل مسرطنة مثل أفلاتوكسين B1، الأمر الذي دفع العلماء لإيجاد طرق للكشف عن وجود هذه المواد وتحديد مدى خطورتها وسميتها(Gaag et al., 2003).

من أكثر الطرائق الشائعة المستخدمة لقياس السموم الفطرية طريقة كروماتوغرافيا الطور السائل HPLC وهي طريقة حساسة ولكنها الأكثر كلفةً وتستهلك وقتاً طويلاً في عمليات الاستخلاص والغسيل، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC، كروماتوغرافيا الطور الغازيGC وتقنية أطباق إليزا ELISA، ولكن لا تزال الحاجة ملحة لطرق أخرى دقيقة وبسيطة وأقل كلفة بحيث يمكن استخدامها كأداة مراقبة للتقدير السريع للسموم الفطرية(Sarter&Zakhia, 2004).

وتعتبر تقنية أطباق إليزا ELISA من الطرائق المناعية الكيميائية الهامة في الكشف عن السموم الفطرية بإضافة جزء بروتيني لهذه السموم لإكسابها صفة المناعة حيث أصبح بالإمكان الحصول على أجسام مضادة للعديد من السموم الفطرية ولكنها من الطرق المرتفعة الكلفة كذلك، وهناك الطرائق البيولوجية المختلفة كاختبار أجنة بيض الدجاج أو اختبار بيض الجمبري واختبار زراعة الأنسجة واختبار الكائنات الدقيقة(محمد سعد، 1991).

ومن الطرائق البيولوجية المستخدمة مجموعة من الاختبارات الحيوية السريعة التي تعتبر سهلة التنفيذ ويمكن إجراؤها دون الحاجة إلى أجهزةٍ معقدة ومكلفة، هذه الاختبارات تكشف عن السلالات المنتجة للسموم الفطرية دون تحديد نوعية السم الفطري وكميته، والتي يمكن تحديدها لاحقاً بإجراء اختبارات أخرى مكملة(المغربي، 1986).

إضافةً إلى ذلك فإن هذه الاختبارات تعتبر بديلاً هاماً في حال عدم إمكانية التحليل الكروماتوغرافي وغياب مادة السم القياسية (Standard) اللازمة لهذا التحليل، وقد تنوعت الكائنات المستخدمة في مثل هذه الاختبارات كاستخدام مجموعة من الأنواع البكتيرية التابعة لجنس *Bacillus* في الكشف عن السموم المفرزة من قبل مجموعة من الفطور مثل *Alternaria alternata*(Fr) Kieissler، *Fusarium equisetum* التي تصيب بعض أنواع الفاكهة والخضار، حيث تبين في نهاية الاختبار أن السموم المنتجة من هذه الفطور منعت تطور البكتريا ونموها(Digrak & Ulukanli, 2002).

وفي تجربة اختبر فيها 48 سماً فطرياً مختلفاً تعود لمجموعة من الأجناس أهمها *Aspergillus*، *Penicillium*، *Fusarium* كمضاد حيوي للبكتريا *Bacillus thuringiensis* وجد بأن معظم هذه السموم كان لها نشاط مشابه لنشاط المضادات البكتيرية إضافة إلى ملاحظة تشوهات في حجم الخلايا الأمر الذي قد يدل على التأثير المسرطن والمطفر لهذه السموم(Boutibonnes et al., 1983)، وقد اعتُبر منع إنبات جراثيم

البكتريا *Bacillus subtilis* من قبل سم الباتولين من الطرق البيولوجية الحساسة والبسيطة للكشف عن هذا السم(Reiss, 1975)، وقد درست سمية الباتولين فيما بعد كمضاد بكتيري على سلالتين من البكتريا *Bacillus subtilis*، *B.megaterium*، حيث زدات نسبة منع نمو كلا السلالتين كلما ازداد تركيز الباتولين(Zygota&Picteka, 1989).

أبدى فطر الخميرة *Saccharomyces cerevisiae* حساسية شديدة لسم الباتولين عند استخدامه بتركيز 10ميكروغرام/مل(Diaz et al., 1997).

كما اختبر 19 نباتاً من عدة أنواع من العائلة الصليبية لدراسة تأثير أفلاتوكسين B1 على إنبات البذور وتطور البادرات فوجد بأن نبات الرشاد *Lepidium sativum* كان الأكثر حساسيةً تجاه السم حتى في تركيز 8 ميكروغرام/مل أجار(Crisan,1973)، ثم استخدم هذا النبات فيما بعد في دراسة سمية 19 عزلة فطرية مستخلصة بالأسيتون معزولة من مجموعة من المواد الغذائية على إنبات بذوره حيث منعت 8 عزلات إنبات البذور(Fromentin et al., 1983).

واستخدم الطحلب *Euglena gracilis* وهو من الطحالب المتحركة في الكشف عن العزلات الفطرية السامة من عينات لثمار الفاكهة والخضار وحبوب المحاصيل، حيث درست علامات السمية اعتماداً على حركة وشكل الطحلب ولونه (المغربي، 1990).

في الآونة الأخيرة كان السعي كبيراً لتطوير طرق حساسة ودقيقة مع التشديد على تحسين السرعة وخفض تكاليف الاختبارات لذلك فقد ازدادت أهمية الاختبارات الحيوية مؤخراً في الكشف عن السموم الفطرية إضافة إلى أنها تعطي مؤشراً أساسياً قبل القيام بالتحاليل الكيميائية المكلفة (Maragos, 2004).

تتلوث بذور وكسبة فول الصويا بالعديد من الفطور منها الأنواع التابعة لجنس *Fusarium* والتي تسبب تلف وفساد البذور والعلف وتلويثهما بأنواع مختلفة من السموم الفطرية، حيث سجلت قدرة عزلات جنس *Fusarium* على إنتاج الزيرالينون أو T-2toxin في بذور وكسبة فول الصويا (Richardson et al.,1985)، كما درست سمية 52 عزلة تتبع للجنس *Fusarium* من 20 عينة من بذور فول الصويا تعود لسبعة أنواع منها *F.oxysporum*، *F.sporotrichioides*، *F.semitectum* وذلك على فئران تجربة قدمت لها وجبات معداة بالفطور حيث سببت 9 عزلات موت للفئران و10عزلات نقصاً في الوزن من 1−20غ، إضافة إلى أن البيئات المعداة بالنوع *F.sporotrichioides* و *Fusarium* spp سببت نزيفاً وإنتاج كمية زائدة من المادة المخاطية في المعدة والمثانة (Park et al.,1999).

أهمية البحث وأهدافه:

إن تلوث بذور وكسبة فول الصويا بفطور التخزين والسموم الفطرية التي تنتجها يعد أمراً هاماً وخطيراً على صحة الإنسان والحيوانات الزراعية إذ قد تؤدي إلى نفوق الحيوانات أو قد تسبب هذه السموم سرطانات واضطرابات مختلفة، إضافة إلى أن العديد من هذه السموم يمكن أن ينتقل للإنسان إما مباشرةً بتناول البذور الملوثة أو بشكل غير مباشر عن طريق المنتجات الحيوانية الملوثة كاللحم والبيض والحليب لحيوانات تناولت علف ملوث، وبما أن بذور وكسبة فول الصويا تدخلان في غذاء الإنسان وعليقة للحيوانات بشكل جريش بذور وكسبة فإن دراسة سمية الفطور المرافقة لهما يمكننا من الحصول على مؤشر للسموم الفطرية المحتمل تواجدها لذلك فقد هدف هذا البحث إلى:

1- الكشف عن سمية عزلات فطرية من بذور وكسبة فول الصويا باستخدام بعض الاختبارات الحيوية سهلة التنفيذ، تعطي نتائج بوقت قصير، لا تحتاج إلى تجهيزات معقدة وتكاليف كبيرة مقارنة بالطرق الأخرى وتستخدم تراكيز منخفضة من الخلاصات الفطرية وبالتالي كميات قليلة من المذيبات العضوية، إضافة إلى أن كائنات ومواد الاختبار متوفرة ورخيصة.

2- دراسة العلاقة بين نوع المستنبت الغذائي وإفراز السموم الفطرية.

مواد البحث وطرائقه:

أجري هذا البحث في مخبر الأمراض الفطرية في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة تشرين وذلك خلال عامي2007-2008.

❖ العزلات الفطرية: تم اختبار/103/عزلة فطرية نقية من 23 عينة من بذور وكسبة فول الصويا تعود إلى 17جنساً فطرياً على مستنبت آجار البطاطا والدكستروز PDA، ومستنبت آجار الصويا والتريبتونTSA إضافة إلى مستنبت آجار البطاطا والسكروز P.S.A بالنسبة لعزلات الجنس*Fusarium*، واستخدم مستنبت MSA آجار المالت والملح للجنس *Scupolariopsis* لأنه لم ينم على مستنبت PDA، وضبطت درجة PH لكل المستنبتات على الدرجة 6.5±0.2 باستخدام NAOH أوHCL وذلك على جهاز PH meter بالمقارنة مع ورق عباد الشمس والجدول(1) يوضح الأجناس الفطرية مع عدد العزلات.

❖ تحضير الخلاصة الفطرية: زرعت العزلات النقية على المستنبتات المغذية الصلبة في أطباق بتري وحضنت على درجة حرارة 23±2 ْم لمدة 7 أيام ثم أخذ قرصان من وسط المزرعة بقطر1سم بواسطة أنبوب اختبار (شكل1) ووضعا في الأنبوب وأضيف 2مل أسيتون80%(80أسيتون:20ماء مقطر) ثم أغلق الأنبوب بسدادة فلينية وسجل عليه رقم العزلة وتاريخ الاستخلاص (شكل2) ووضع في الظلام لمدة 30 دقيقة مع الرج المتقطع ثم وضع في البراد لحين إجراء الاختبار (Maghribi, 1985).

شكل1: طريقة أخذ القرص الفطري

شكل2 : وضع الأقراص في الأنابيب مع التغطية

❖ مواد الاختبارات الحيوية:

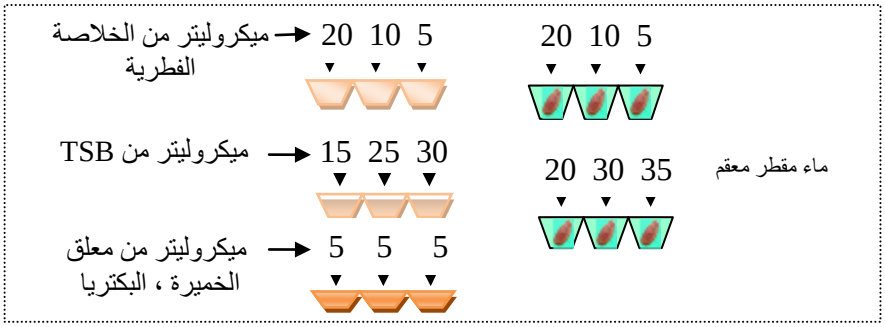
- بذور رشاد*Lepidium sativum* : حيث استخدمت بذور بلدية معقمة إنتاج محلي لعام2007 جيدة التكوين سليمة نسبة إنباتها عالية، تم انتقاؤها بواسطة مكبرة يدوية، وحصلنا عليها من السوق المحلية، اسمها التجاري بذور المستقبل.

- سلالة بكتيرية(FZB27)*Bacillus subtilis*: تم الحصول عليها من معهد التقانات الحيوية برلين-ألمانيا، زرعت في5 مل من مستنبت تريبتون الصويا السائل TSB على درجة حرارة 23±2 مئوية.

– فطر خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* زرع كذلك في 5 مل من مستنبت TSBعلى درجة حرارة 23± 2مئوية، تم تحضيره مخبرياً حيث أضيف 50غ خميرة (فورية جافة ونشطة) لكل ربع ليتر ماء مقطر ومعقم على حرارة 38 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ومن ثم نقيت وجددت على مستنبتPDA.

❖ التمديد والاختبار:

تم تنفيذ الاختبارات الحيوية ضمن أطباق إليزا بحيث تم اختبار كل كائن في طبق مستقل وخصص لكل عزلة ثلاثة تراكيز من الخلاصة الفطرية(5، 10، 20) ميكروليتر ومكررين لكل تركيز، ثم أضيف السائل الممدد وهو مستنبت TSB في اختبار الخميرةSc والبكترياBs، والماء المقطر المعقم بالنسبة لاختبار بذور الرشاد Ls بحيث يصبح الحجم النهائي 40 ميكروليتر، وأخيراً أضيف 5 ميكروليتر من معلق البكتريا والخميرة (بعمر 24 ساعة) كل على حدا في طبقه الخاص ووضعت بذرة واحدة من بذور الرشاد في كل حفرة(شكل3)، حدد شاهد لكل اختبار مثل المعاملة ولكن بإضافة خلاصة محضرة من المستنبت المغذي المستخدم في الاختبار وغير مزروع بالفطر.



شكل3: خطوات تنفيذ الاختبار في أطباق إليزا.

❑ حضنت أطباق الاختبار على حرارة 23±2 ْم بعد وضعها في علب بلاستيكية معقمة، وأخذت القراءات بعد 24 ساعة بالنسبة لاختباري Sc،Bs، وبعد 48 ساعة بالنسبة لاختبار Ls، وحددت نتائج السمية مقارنةً بالشاهد لاختباري Sc، Bs على أساس ثلاث درجات:

- **صفر**: تقابل تأثيراً معدوماً للخلاصة الفطرية على المادة الحية (نمو مماثل للشاهد).
- **واحد**: تقابل تأثيراً ملحوظاً (نمو أقل من الشاهد)، سمية متوسطة.
- **اثنان**: تقابل تأثيراً أعظمياً ملحوظاً (لا يوجد نمو مقارنة بالشاهد)، سمية شديدة(المغربي، 1986).

عند الحصول على نتيجة من الدرجة (واحد أو اثنان) تم عزل البكتريا والخميرة من التراكيز الثلاثة على مستنبت PDA أو TSA للتأكد من درجة النمو ثم حضنت الأطباق وفحصت مقارنة بالشاهد المزروع.

❑ أما بالنسبة لبذور الرشاد فأخذت النتائج وفق12 مرحلة من مراحل الإنبات(شكل4).

شكل 4: مراحل إنبات بذور الرشاد

حيث إن المراحل 2–5 تقابل نمو الجنين في البذرة، و6–12 تقابل نمو الجذير، ويجب أن يعطي الشاهد دائما المراحل 9 و10 و11 وعلامات السمية تكون كالتالي: **صفر:** مراحل النمو 9–11 مثل الشاهد، **واحد:** مراحل النمو 7–8، **اثنان:** مراحل النمو من 2–6.(Maghribi,1985).

النتائج والمناقشة:

بعد أخذ نتائج الاختبارات تم حساب مجموع درجات السمية ورتبت كما هو ظاهر في الجدول1، مع الأخذ بالاعتبار بأن مجموع عدد العزلات السامة أخذ على المستنبتات الثلاثة إذ يمكن أن تكون نفس العزلة سامة على مستنبتين أو ثلاثة.

الجدول(1): تحديد سمية العزلات الفطرية على كائنات الاختبار الحيوية المستخدمة.

الجنس الفطري	عدد العزلات الكلي	اختبار Ls		اختبار Sc		اختبار Bs		المستنبت
		++	+	++	+	++	+	
Cladosporium	21	-	-	-	-	-	2	PDA
		-	2	-	-	-	-	TSA
Mucor	8	-	-	-	-	-	-	PDA
		-	3	-	-	-	-	TSA
Rhizopus	10	-	-	-	-	-	-	PDA
		2	1	-	-	-	-	TSA
Absidia	3	-	-	-	-	-	-	PDA
		1	2	-	-	-	-	TSA
Alternaria	21	-	1	-	2	6	3	PDA
		2	4	-	2	-	-	TSA
Fusarium	16	2	-	-	2	9	2	PDA
		-	5	-	-	-	1	TSA
		2	2	-	1	10	-	PSA
Rhizoctonia	3	-	-	-	1	-	1	PDA
		-	1	-	-	-	-	TSA
Trichoderma	5	-	-	-	-	-	-	PDA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Sclerotinia	1	-	-	-	-	-	1	PDA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Botrytis	4	-	-	-	-	-	-	PDA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Trichothecium	1	-	-	-	-	-	-	PDA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Pythium	2	-	-	-	-	1	-	PDA
		1	1	-	-	-	-	TSA
Scopulariopsis	3	-	-	-	-	-	-	MSA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Acremonium	2	-	-	-	-	-	-	PDA
		-	-	-	-	-	-	TSA
Ulocladium	1	-	1	1	-	-	1	PDA
		-	-	1	-	-	-	TSA

PDA	-	-	-	-	-	-	1	*Nigrospora*
TSA	-	-	1	-	-	-		
PDA	-	-	-	-	-	-	1	*Helminthosporium*
TSA	-	-	-	-	-	-		

++عزلات شديدة السمية، +عزلات متوسطة السمية، SC: *Bacillus subtilis* LS: *Lepidium sativum*
BS: *Sacharomyces cerevisiae*

دلت نتائج الاختبارات الحيوية التي أجريت على الخلاصات الفطرية للعزلات النقية على:

1-اختبار Ls:

وجود ثمانية عزلات شديدة السمية على إنبات بذور الرشاد موزعة في عزلتين لكل من الأنواع *Rhizopus stolonifer*، *Alternaria alternata*، *Fusarium* spp. وعزلة لكل من *Absidia ramosae*، *Pythium* sp.، وهذا ما يتوافق مع (Fromentin et al., 1983)، و(المغربي، 1986).

وعليه يمكن القول بأن تلك العزلات قد يكون لها القدرة على إنتاج السموم الفطرية فالأنواع التابعة لجنس *Rhizopus* تفرز العديد من السموم الفطرية كالتوكسوفلافين Toxoflaven والريزوبتيرين Rhizopteren إضافة لسموم الأفلاتوكسينات (عبد الحميد،2000)، وتعد الأنواع التابعة لجنس *Alternaria* من الفطور الشائعة التي تسبب خسائر في الخضراوات والمحاصيل والفواكه سواء في الحقل أو في المخزن ومن أهم أنواعها *A.alternata* والتي تنتج العديد من السموم مثل altertoxinsI، altertoxinsII، altertoxinsIII، stemphyltoxinIII (Davis&Stack,1991)، وقد عزل هذا النوع بأعداد كبيرة من بذور فول الصويا والأرز والذرة حيث يوصى بضرورة الكشف عن السموم التي يفرزها هذا النوع في هذه المحاصيل (Broggi et al.,2007).

كما أن وجود الجنس *Fusarium* قد يكون دليلاً على وجود سمومه كالزيرالينون Zearalenone الذي يحدث اضطرابات هرمونية وتضخمات في الجهاز التناسلي وضمور المبايض والخصي لدى الحيوانات، كما تنتج العديد من الأنواع التابعة لهذا الجنس مجموعة أخرى من السموم تعرف بالترايكوثيسينات Trichothecenes والتي تتواجد في الغذاء والعلف على حد سواء، ويسبب تناولها نزيفاً هضمياً وتقيؤات، كما أن ملامستها بشكل مباشر تؤدي إلى التهابات جلدية (Benntt & Klich, 2003).

أما بالنسبة للجنس*Absidia* فتفرز أنواعه الريزوبين وأحماضاً عضوية، ويعتبر هذا الجنس من الفطور المسجلة كممرض للحيوانات حيث يسبب حالات إجهاض في الأبقار (Knudtson & Kirkbride, 1992).

وجدت كذلك اثنتان وعشرون عزلة متوسطة السمية ضمت: أ- عزلتين للجنس *Cladosporium* من الأنواع C.*herbarum*، C. *oxysporum*. حيث يعتبر هذا الجنس من الأعفان الملوثة للغذاء والعلف وبعض أنواعه تفرز سموماً فطرية مثل كلادوسبورين Cladosporin والإيمودين Emodin التي تسبب تحسسات وتبقعات جلدية للإنسان (Dehoog et al.,2000).

ب- ست عزلات للجنس *Fusarium* على مستنبتي PDA وTSA من الأنواع *F.chlamydosporum*، *F. sporotrichioides*، *F. oxysporum*، *F.semitectum*، *Fusarium* sp.، حيث وجد بأن النوع *F. sporotrichioides* ينتج أنواعاً عديدة من الترايكوثيسينات T-2، HT-2، DAS، NS(Scott et al.,1980)، كما أن إفراز الأنواع المختلفة من تلك الترايكوثسينات يتعلق بنوع المادة الغذائية وظروف التحضين إضافة للرطوبة ودرجة

الحـرارة(Mateo et al., 2002)، وينـتج النـوع *F.semitectum* ترايكوثيسـينات مـن نـوع DAS (Suzuki et al., 1980)، أمـا النـوع *F. oxysporum* فينـتج حمـض الفيوزاريـك Fusaric acid (زيرالينون)(ميخائيل،1992).

ج- خمس عزلات للنوع *Alternaria alternata*، وعزلتين للنوع *Absidia ramose*، وثلاث عزلات *Mucor* spp، وعزلة واحدة فقط لكل من الأنواع *Rhizoctonia solani*، *Rhizopus stolonifer*، *Pythium* sp.، *Ulocladium* sp.

2- اختبار Bs:

أبدت سبع عشرة عزلة سمية شديدة منعت نمو البكتريا تجلت في : عشر عزلات للجنس *Fusarium* من الأنواع *F.semitectum*، *F. sporotrichioides*، *F.tricinctum*، *F.heterosporum*، *Fusarium* sp.، وست عزلات للجنس *Alternaria* من الأنواع *Alternaria alternata*، *Alternaria brassicola*، وعزلة *Pythium* sp.

وأظهرت ثلاث عزلات من جنس *Alternaria* سمية متوسطة في نفس الاختبار السابق من الأنواع *Alternaria alternata*، *Alternaria* sp، وعزلة واحدة لكل من *Rhizoctonia solani*، *Fusarium semitectum*، *Fusarium* sp، *Sclerotinia* sp، *Ulocladium* sp، وعزلتين للجنس *Cladosporium* وهذه النتائج تتوافق مع (Digrak & Ulukanli, 2002).

3- اختبار Sc:

ظهر في هذا الاختبار سبع عزلات متوسطة السمية كانت للأنواع التالية: *Nigrospora sphaerica*، *Ulocladium* sp.، عزلتان *Fusarium* sp.، عزلتان *Alternaria alternata*، وعزلة *Rhizoctonia solani*.

4- علاقة المستنبتات بالسمية:

لقد ظهر على مستنبت PDA العدد الأكبر من العزلات السامة والمتوسطة السمية وذلك في اختباريBs،Sc ولم يبد مستنبت TSA أي تأثير في إظهار السمية بالنسبة لهذين الاختبارين، وتساوى تأثير مستنبتي PDA وPSA بالنسبة لجنس *Fusarium* في اختبار Bs، أما على إنبات بذور الرشاد فنلاحظ بأن العزلات السامة والمتوسطة السمية ظهرت بصورة أساسية على مستنبتTSA الأمر الذي يدل على العلاقة بين السمية ونوع المستنبت الغذائي خاصةً وأن هذا المستنبت مناسب لنمو الأعفان (فطور التخزين) وبعض الأنواع البكتيرية وكونه يحتوي على أحماض أمينية من بذور الصويا فإنه يمكن القول بأن الفطور التي أبدت سمية على هذا المستنبت قد تكون قادرة على إنتاج سمومها في بذور وكسبة فول الصويا، فالتركيب الكمي والنوعي للمستنبتات له تأثير على سير العمليات البيولوجية المخلقة للتوكسينات حيث وجد أن خليط الجلوكوز والفركتوز بنسبة 2:1 يعطي أعلى كمية من إنتاج الأفلاتوكسينات، كما أن اختلاف مصدر النتروجن يؤثر على التوكسين الناتج فالبنسليوم *Pencillium baarnense* عند نموه على مستنبت تشابك دوكس Czapek-Dox المحتوي على نترات ينتج حمض الأورسيليك Orsellic Acid بينما على مستنبت Raulin-Thom المحتوي على أمونيا ينتج بارنول Baarnol، وقد تم الحصول على أعلى إنتاج من الزيرالينون من *Fusarium culmorm* في مستنبت آجار سكروز يليه آجار دقيق الأرز، وتباين إنتاج *Fusarium tricinctum* من T-2 بتباين المستنبت فمستنبت دقيق الأرز أعطى أقصى إنتاج يليه مستنبت دقيق الذرة (عبد الحميد،2000)، حتى أن محاليل الاستخلاص قد تؤثر على السمية حيث وجد بأن الاستخلاص المائي

للفطر *Rhizopus stolonifer* كان ساماً جداً بعد حقنه في الأرانب في حين أن الاستخلاص بالأسيتون لهذا النوع أبدى سمية متوسطة على الأرانب عندما اختبر على العيون والجلد(Reiss, 1993).

بالنسبة للتراكيز المستخدمة فقد لوحظ منع النمو بشكل رئيسي في التركيز الأعلى 20 ميكروليتر في الاختبارات الثلاث ومن ثم بشكل متفاوت في التركيز 10ميكروليتر، وكان منع النمو أو الإنبات في التركيز 5 ميكروليتر شبه معدوم وهذا الأمر يتوافق مع (Haikal, 2008).

الاستنتاجات والتوصيات:

1- تعطي الاختبارات الحيوية Sc، Bs، Ls مؤشراً جيداً على سمية العزلات الفطرية وبشكل خاص Bs، Ls، هذه الاختبارات سهلة التنفيذ، اقتصادية، تعطي نتائج بوقت قصير أقصاه 48 ساعة، كمية المادة الحية المستخدمة قليلة ويمكن التحكم فيها حسب ظروف كل مخبر، كما يمكن إنجاز 15عزلة فطرية في الطبق الواحد بالنسبة للاختبار الواحد.

2- قد يعطي دليل سمية العزلات الفطرية المستخدم في مثل هذه الاختبارات مؤشراً عن وجود السموم الفطرية التي تنتجها تلك العزلات، كما يمكن تطبيق هذه الاختبارات في تحديد سمية الخلاصات من المواد الغذائية وبعد الحصول على النتائج يمكن اللجوء للطرق الكمية لتحليل الخلاصات التي أبدت سمية في هذه الاختبارات.

3- معظم عزلات الجنس *Fusarium* كانت متوسطة إلى شديدة السمية على مستنبتي PDA، PSA وعلى كائنات الاختبار الثلاث.

4- كانت عزلات النوع *Alternaria alternata* متوسطة إلى شديدة السمية على مستنبتي PDA، TSA وعلى كائنات الاختبار الثلاث.

5- ظهر على مستنبتPDA العدد الأكبر من العزلات السامة والمتوسطة السمية وذلك في اختباري Sc، Bs، وتساوى تأثير مستنبتي PDA وPSA بالنسبة لجنس *Fusarium* في اختبار Bs.

6- ظهرت سمية العزلات على مستنبت TSA بشكل رئيسي في اختبار Ls.

7- كان للتركيز الأعلى من المستخلصات الأثر الأكبر على كائنات الاختبار الثلاث.

8- نوصي بمتابعة البحث لاختيار مستنبتات أخرى صلبة أو سائلة تساعد على إظهار سمية العزلات الفطرية، وكائنات اختبار تكون أكثر حساسية للسموم الفطرية.

المراجع:

1- المغربي، صباح. *طرق حيوية سريعة للكشف عن الفطريات المنتجة للسموم الفطرية في المواد الغذائية* – أسبوع العلم السادس والعشرون- اللاذقية- 1986-11ص.

2- المغربي، صباح. *دراسة بعض فطور التخزين على الخضار والفواكه وبعض المحاصيل والكشف عن العزلات المنتجة للسموم الفطرية* – مجلة جامعة تشرين – مجلد 12- العدد2- 1990 – ص 58-66.

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

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

5- ميخائيل، سمير. *أمراض البنور*- منشأة المعارف بالإسكندرية-الطبعة الثالثة-مصر-2000-334 ص.

6-BENNETT, W. J; and KLICH, M. *Mycotoxins*. American Society for Microbiology. Tulane University, New Orleans, Louisiana. Vol. 16, No. 3, 2003, 497-516

7-BOUTIBONNES, P; MALHERBE, C; KOGBO, W; MARAIS, C. *Antibacterial activity of 48 mycotoxins against Bacciilus thuringiensis*. Microbiologie-Aliments- Nutrition. Vol.1, 1983, 259-264.

8-BROGGI, L. E; GONZALEZ, H. H; RESNIK, S. L; PACIN, A. *Alternaria alternata prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina*. Rev Iberoam Micol. 24(1): 2007,47-51

9-CRISAN ,*E.V. Effects of Aflatoxin on Seeding Growth and Ultrastructure in Plants.* Applied Microbiology. 26(6): 1973,991–1000.

10-DAVIS, V. M; STACK, M. E. *Mutagenicity of stemphyl toxinIII, a metabolite of Alternaria alternatA.* Applied and environmental microbiology. vol. 57, 1991,180-182.

11-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.

12-DIAZ, L; TERESA, M; & FLANNIGAN, B. *Mycotoxins of aspergillus clavatus:toxicity of cytochalasin E, Patulin, and extracts of contaminated Barley malt*. journal of food protection, vol. 60, No. 11, 1997, 1381-1385(5).

13-DIGRAK, M; and ULUKANLI, Z. *Determination of some fungal metabolites by bioassay method*. ksu. j. science and engineering, 5(2)2002.

14-FROMENTIN, H; NGUYEN VAN, H; & BIEVRE, C. *Toxicogenic fungi isolated from foodstuffs coming from the Far East.* Bull Soc Pathol Exot Filiales. Nov;76(5): 1983,592-595.

15-GAAG,B;SPATH, S; DIETRICH, H; STIGTER, E; BOONZAAIJER, G; OSENBRUGGEN, T; KOOPAL, K. *Biosensors and multiple mycotoxin analysis*. Food control. 14, 2003, 251-254.

16-HAIKAL, N. Z. *Effect of Filtrates of Pathogenic Fungi of soybean on Seed Germination and Seedling Parameters*. Journal of Applied Sciences Research, 4(1): 2008,48-52.

17-KNUDTSON, W. U and KIRKBRIDE, C. A. *Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA)*. J Vet Diagn Invest. 4: 1992,181-5**.**

18-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.

19-MARAGOS,M; CHRIS. *Emerging Technologies for Mycotoxin Detection*. Toxin reviews, vol. 23, 2004, 317-34.

21- MATEO, J. J; MATEO, R. and JIMENEZ, M. *Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by Fusarium sporotrichioides isolates under diverse culture conditions*. International Journal of Food Microbiology. Vol, 72, Issues 1-2, 30 January 2002, 115-123.

20-NELSON, P.E;DESJARDINS, A.E; and PLATTNER, R. D. *Fumonisins, mycotoxins produced byFusarium species: Biology, chemistry and significance*. In: R.J. Cook, (Ed) Ann. Rev. Phytopathology. 31: 1993,233-249.

21-PARK, J. S; LEE, K. R; KIM, J. C; LIM, S. H; SEO,J.A; AND WON LEE, Y. *A Hemorrhagic Factor (Apicidin) Produced by Toxic Fusarium Isolates from Soybean Seeds*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. Jan. Vol. 65, No. 1, 1999, 126–130

22- REISS, J. *Bacillus subtilis; A sensitive bioassay for patulin* . Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 13, No. 6, 1975, 689-691.

23-REISS, J. *Biotoxic activity in the Mucorales***.** Mycopathologia, 121**:** 1993,123-127.

24-RICHARDSON, K. E; HAGLER, W. M; HANEY, C.A; and HAMILTON, R. B. *Zearalenone and trichothecene production in soybeans by toxigenic Fusarium*. Food Prot. 48: 1985.240–243

25-SARTER, S; ZAKHIA, N. *Chemiluminescent and bioluminescent assays as innovative prospects for mycotoxin determination in food and feed*. Luminescence, 19: 2004,345–351.

26-SCOTT, P. M; HARWIG, J & BLANCHFIELD, B. J. *Screening Fusarium strains isolated from over-wintered Canadian grains for trichothecenes*. Mycopathologia, 72(3): 1980, 175-180.

27-SUZUKI, T; KURISU, M; HOSHINO, Y; ICHINOE, M; NOSE, N; TOKUMARU, Y & WATANABE, Y. *Production of trichothecene mycotoxins of Fusarium species in wheat and barley harvested in Saitama Prefecture*. Japan. J. Food Hyg. Soc. Jpn, 21(1): 1980,43-49.

28-ZEGOTA, H; PICETKA, M. *Elimination of the toxic effects of patulin on Bacillus subtilis and B.megaterium by irradiation.* Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A. Volume 188, Number 4 / April, 1989. 348-350.