عزل وتوصيف الفطريات الملوثة لبعض أنواع العسل التجاري في مدينة البيضاء– ليبيا

* ابتسام محمد عبدالرحمن

المستخلص: أجريت هذه الدراسة بهدف كشف الفطريات الملوثة لأنواع من العسل التجاري المباعة في مدينة البيضاءشملت عسل الشبرو،والحنون، والسدر، والزعتر، والكافور، والربيع و عسل الندوة العسلية)،حيث تم عزل الفطريات وتعريفها واختبار قدرتها على انتاج السموم على الوسط PSA باستخدام بخار الامونيا. أظهرت النتائج وجود 9 أنواع فطرية مختلفة شملت.*Acremonium*sp ، *A. alternata* ، *A.alternariae* ، *A. niger*، *C. cladosporioides*، *R. stolonifer*، *Candida* sp.، *R. mucilaginosa* و *Penicillium* sp.. كان النوع *Candida* sp. اكثرها عددا وكثافة حيث سجل عدد 44 مستعمرة فطرية وبكثافة (33.8%)في حين سجلت اقل كثافة (3.1%) لفطري *Penicillum*sp. و*R.stolonifer*، كما لوحظ ان عسل الشبرو هونوع العسل الذي تواجد فيه أكثر الأجناس الفطرية يليه عسل الكافور وعسل الزعتر، بينما كان اقل تنوع فطري في عسل الربيع وعسل الحنون وعسل الندوة، وعند إجراء اختبار كشف السموم من الفطريات المعزولة باستخدام بخار الأمونيا كانت الأنواع *A. niger*،*A.alternariae*، *R. mucilaginosa* و *Penicillium* sp. هي المنتجة للسموم في وسط الزرع.

الكلمات المفتاحية: فطريات ، السموم الفطرية،العسل

المقدمة:

يعتبر عسل النحل مصدر كربوهيدراتي طبيعي غني بالطاقة ينتج من رحيق النباتات يتم تعديله وتخزينه بواسطةحشرة النحل (White, 1992) ، (White Jr & Rudyj, 1978) و(White Jr, 1978) ويتكون العسل بشكل أساسي من السكريات، وخاصة السكريات الأحادية الفركتوز والجلوكوز رغم احتوائه على نسبة كبيرة ومجموعة متنوعة من السكريات الثنائية والثلاثية.

ينتج النحل إنزيمات تقوم بتحويل السكريات الثنائية والثلاثية إلى السكريات الأحادية (White Jr, 1978) و (Martins, Martins, & Bernardo, 2003)، ومن ناحية اخرى فإن العسل يمر بتغيرات عديدة أثناء عملية التخزين واهم هذه التغيرات التخمر الذاتي الذي يكون سببه البكتريا والخمائر والفطريات (Jiménez, Mateo, Huerta, & Mateo, 1994)،وتعد الفطريات الخيطية أكثر انتشارا في الطبيعة وذلك لان لديها جراثيم مقاومة للحرارة مع قدرة كبيرة على البقاء حيث يمكنها الدخول للعسل عن طريق الانسان او الغبار او عن طريق حبة اللقاح بواسطة النحل،. ففي دراسة اجريت على العسل قام بها (Martins et al., 2003) تم تسجيل نسبة منخفضة من التلوث الفطري تمثلت في *Mucor.spp,Penicillum*.spp وأنواع قليلة من فطر *Aspergillus* وهي *A.flavus ,A.candidus ,A.*

* قسم الأحياء، كلية التربية، جامعة عمر المختار، البيضاء – ليبيا E-mail:islam606721@gmail.com

fumigatus و*A. nigar* . وفي دراسة اخرى قد أجريت على 80 عينة من العسل وجد ثلاثة اجناس من الفطريات تضمنت *Penicillum* sp. ، *Aspergillus*.sp. و *Mucor*. sp. (Popa, Vica, Axinte, Glevitzky, & Varvara, 2009)

المواد والطرائق:

مصدر عينات العسل:

تم جمع عدد7 عينات من عسل النحل (جدول1) والمتداولة للبيع في السوق المحلي، وضعت في زجاجات معقمة محكمة الإغلاق، جرى نقلها إلى معمل أمراض النبات، قسم الوقاية، جامعة عمر المختار لغرض فحصها وتقييم نوع ودرجة التلوث الفطري بها.

جدول 1: قائمة بأسماء عينات العسل ومصادرها

	الاسم المحلي	اسم النبات بالعربي	الاسم الانجليزي	الاسم العلمي
1	الشبرو	الخروب	Carbo	*Ceratoniasiliqua*
2	الحنون	الشماري	Arbutus	*Arbutus bavarii*
3	السدر	السدر	Nabk	*Zizyphus lotus*
4	الندوة العسلية	-	-	-
5	الكافور	السرول	Cinnamomumcamphora	*Eucalyptus* sp.
6	الربيع	نباتات مختلفة		
7	الزعتر	الزعتر	Thyme	*Thymus capitatus*

عزل الفطريات:

تم تحضير الوسط الغذائي (Potato Sucrose Agar (PSA، بأخذ 200جم من البطاطس المقشرة والمقطعة إلى قطع صغيرة وغليها في إناء يحوي 500 مل ماء مقطر لمدة 15 دقيقة، رشحت من خلال قطعة شاش، ووضع الراشح في دورق سعة لتر أضيف إليه20جم من السكروز و20جم من الاجار وأكمل الحجم بالماء المقطر إلى اللتر،عقم الوسط بجهازالـAutoclaveتحت درجة حرارة 121 مْ وضغط 15باوند/لمدة 20دقيقة، بعدها أضيف إليه المضاد الحيوي Amoxicillin (0.3جم/ 200 مل بيئة) لمنع نمو البكتيريا وتم توزيعه في أطباق بتري نظيفة ومعقمة مسبقا.تم اخذ 2جم من كل نوع من أنواع العسل على حده ووزع على الوسط الغذائي بواقع ثلاثة مكررات لكل نوع وحضنت الاطباق في درجة

حرارة 23±2م° وخضعت للمراقبة اليومية لتسجيل ظهور الفطريات،وجرى تنقيتها على أطباق PSA جديدة، وتم حساب تكرار الفطر بالمعادلة: %تكرار الفطر: (عدد العينات ظهر فيها الفطر الواحد ÷ العدد الكلي لجميع العينات) × 100 وحسبت الكثافة بالمعادلة: %كثافة الفطر: (عدد عزلات الفطر ÷ العدد الكلي لعزلات جميع الفطريات) × 100.

تعريف الفطريات:

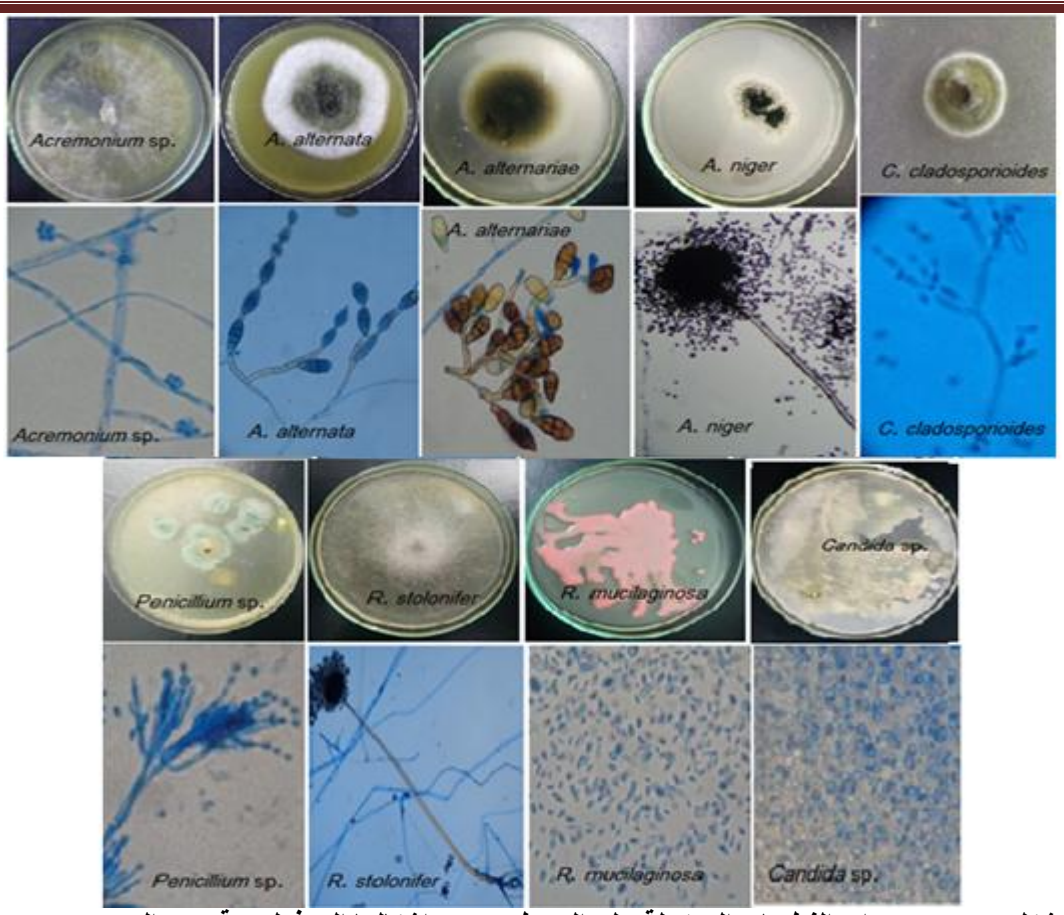
لإجراء التعريف فحصت المستعمرات النامية من حيث اللون، الحافة، طبيعة النمو وانتاج الصبغات، كما تم تحميل جزء من النمو الفطري على شرائح زجاجية مغطاة بفيلم رقيق من صبغة أزرق اللاكتوفينول لدراسة الصفات الشكلية مثل الميسليوم والحامل الجرثومي والجراثيم تحت المجهر الضوئي، ووُصفت بدقة استناداً على المراجع المعتمدة.(Barnett & Hunter, 1998) و (Kidd, Halliday, Alexiou, & Ellis, 2016)

اختبار الكشف عن السموم باستخدام محلول الأمونيا:

نُميت العزلات الفطرية على PSA في درجةحرارة25م° لمدة 7 أيام، ثم أُخرجت الأطباق من الحضان وقُلبت راساً على عقب، وأُضيف في كل غطاء من الأطباق محلول الأمونيا (Ammonium hydroxide) تركيز 25% بمعدل 2مل/غطاء، وأُقفلت بشريط من البارافيلم،وأُعيدت إلى الحضان لمدة 4- 7 أيام. في معاملة الشاهد أُضيف 2 مل ماء معقم، وكررت كل معاملة 3 مرات، وتم مراقبة الأطباق خلال هذه الفترة لملاحظة تسجيل أي تغيير في لون قواعدها تدل على إنتاج السموم (Saito & Machida, 1999)

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج العزل من عينات العسل تسجيل تسعة انواع من الفطريات شملت.*Acremonium* sp، *Cladosporium cladosporioides* ،*Aspergillusniger* ،*A.Alternariae Alternaria alternata* *Rhodotorula mucilaginosa*،*Candida* sp. ،*Rhizopus stolonifer*،*Penicillium* sp. (شكل1، جدول2).



شكل (1): مستعمرات الفطريات المعزولة على الوسط PSA واشكالها الموفولوجية تحت المجهر (40x)

جدول 2: الصفات المزرعية والمجهرية للفطريات المعزولة

اسم الفطر	الصفات المزرعية	الصفات المجهرية
*Acremonium*sp.	المستعمرة بطيئة النمو هيفية خفيفة تشبه لون الجلد	الميسليوم جيد التكشف، والحوامل الجرثومية اسطوانية قصيرة والكونيدات وحيدة الخلية، كروية تحمل على قمة الحامل في مجاميع بابعاد4µ
A. alternata	المستعمرة سريعة النمو رمادية الى زيتونية داكنة اللون بحواف بيضاء وسوداء من القاعدة بعد غزارة التجرثم	الحامل الكونيدي مفرد او ثنائي التفرع، والكونيدات برميلية الشكل مقسمة طوليا وعرضيا الى عدد من الاقسام، تتروح ابعادها بين 21µ و4µ والبعض منها ذات قمة اسطوانية قصيرة.
A. Alternariae	المستعمرة سريعة النمو، خضراء داكنة بدون حواف بيضاء، سوداء من الاتجاه المعاكس.	الحامل الكونيدي بسيط قصير مفرد والكونيدات بدون منقار، برميلية الشكل، مقسمة طوليا وعرضيا بأبعاد30µ×6
A. niger	النمو في البداية أبيض، لاحقاً يصبح أسود بسبب سرعة التجرثم. يتلون بالأصفر الشاحب من جانب القاعدة.	الحامل الكونيدي طويل منتصب (1.5-3µ) والرأس كروي كبير (750-800µ)، والذنيبات مرتبة في صفين، والجراثيم كروية سميكة خشنة الجدار داكنة اللون (2.5 -9µ).
C. cladosporioides	المزرعة بطيئة النمو خضراء مخملية زيتونية بسبب غزارة التجرثم. الحواف بيضاء متموجة. ينتج صبغات داكنة سوداء من القاعدة.	الحامل الكونيدي متفرع مقسم منتصب بطول يفوق 90µ، والكونيدات صغيرة في سلاسل متفرعة بكل الإتجاهات بيضاوية الشكل تشبه حبة القمح زيتونية داكنة اللون مكونة من خلية واحدة أوخليتين بأبعاد (2- 4 × 3-16µ).
Penicillium sp.	المزرعة في البداية بيضاء تتحول تدريجيا الى اللون الاخضر بعد التجرثم ناعمة مخملية الملمس	حامل كونيدي أملس مقسم شفاف وسميك، يحمل فريعات أحادية الصف، تحمل سلاميات بيضاوية طويلة تترتب عليها الجراثيم في سلاسل بيضاوية الشكل أحادية الخلية (1.7 ×2.9µ).
R. stolonifer	مستعمرة هيفية سريعة النمو بيضاء	الميسليوم جيد التكشف، والحواملاسبورانجية طويلة

	تتحول الى رمادية اللون هوائية برؤوس سوداء	مفردة او ثنائية التفرع، تنتهي بتركيب يشبه الجذور، تحمل في اعلاها اكياس اسبورانجية سوداء (30-10µ) بداخلها عدد كبير من الجراثيم كروية ملساء بأبعاد5×5µ
Candida sp.	المستعمرة سطحية كريمية اللون ناعمة	جسم الفطر مكون من خلايا كروية الى بيضية الشكل بأبعاد (2×2µ).
R. mucilaginosa	المستعمرة سطحية حمراء كريمية الملمس لامعة	جسم الفطر مكون من خلايا بيضاوية الى متطاولة بأبعاد (4×2µ).

بينت نتائج التجربة المدونة في الجدول (3) أن أكثر الانواع الفطرية ظهرت في نوع العسل الشبرو حيث تم عزل عدد 7 أنواع فطرية تمثلت في *Acremonium*sp. ،*A.alternata* ،*A.alternaria*، *C. cladosporioides*، *Candida* sp.، *R. mucilaginosa* ،*Penicillium*sp. يليها نوعي عسل الكافور والزعتر بعدد 5 انواع من الفطريات في الكافور *Acremonium sp.* ،*C. cladosporioides*، *Candida* sp.، *R. stoloniferCandida* و *R. mucilaginosa* أما في عسل الزعتر *Acremonium sp.* ،*A. niger* ،*C. cladosporioides*، *Candida* sp. وفي حين كان النوعين عسل الندوة وعسل الحنون اقلها تلوثا وسجلا ظهور *R. mucilaginosa*، الفطرين.*Candida* sp و *A.aiternata* في عسل الندوة بينما سجل عسل الحنون ظهور الفطرين *A.alternata*, *Candida* sp. وقد اجرى (Jiménez et al., 1994) دراسة مماثلة وجد خلالها انواع مختلفة من الفطريات منها *A.niger* و *Penicillium* sp. ، أيضا خلال دراسة أجراها (Kačániová, Kňazovická, Felšöciová, & Rovná, 2012) سجل وجود الفطريات *Acremonium* ، *Aspergillus*، *Cladosporium* و *Penicillium*، كما ورد وجود الفطرين *Aspergillus* و*Penicillium* في عسل النحل (Popa et al., 2009).

جدول3: انواع واجناس الفطريات المعزولة

نوع العسل	اسم الفطر
السدر	*Acremonium*sp., *Candida* sp.,*A.alternata, R.mucilaginosa*
الحنون	*A.alternata, Candida* sp.
الزعتر	*A.niger,C.cladosporioides,Candida*sp., *Acremonium*sp.,*R.mucilaginosa*
الربيع	*C. cladosporioides,R .mucilaginosa*
الشبرو	*Penicillium* sp. ,*Candida* sp.,*Acremonium*sp.,*R.mucilaginosa, A. alternariae,C .cladosporioides,A.alternata*
الكافور	*R. stolonifer, Candida* sp.,*Acremonium*sp.,*R.mucilaginosa, C .cladosporioides,*
عسل الندوة	*Candida* sp.,*A.alternata*

وبينت نتائج التجربة المدونة في جدول (4) عدد العينات التي ظهر فيها الفطر وعدد العزلات وتكرار وكثافة الفطريات في جميع أنواع العسل التي تم دراستها، حيث تبين ان اكثر ظهور للفطر *Candida* sp. في خمس عينات من العسل يليه الفطريات*Acremonium* sp.، *A. alternata*، *C. cladosporioides*، *R. mucilaginosa* والتي ظهرت في 4عينات من العسل، في حين ظهرت الفطريات *A .alternariae*، *A. niger*، *Penicillium* sp. و *R. Stolonifer* في عينة واحدة من عينات العسل.

سجل الفطر *Candida* sp.اكبر عدد عزلات والذي بلغ 44عزلة ونسبة تكرار وصلت 71.4% وبلغت الكثافة 33.8%، في حين سجل الفطر A. niger وجود عزلتين فقط ونسبة تكرار 14.3% وكثافة وصلت 1.5%.

جدول4: تكرار وكثافة الفطريات المعزولة

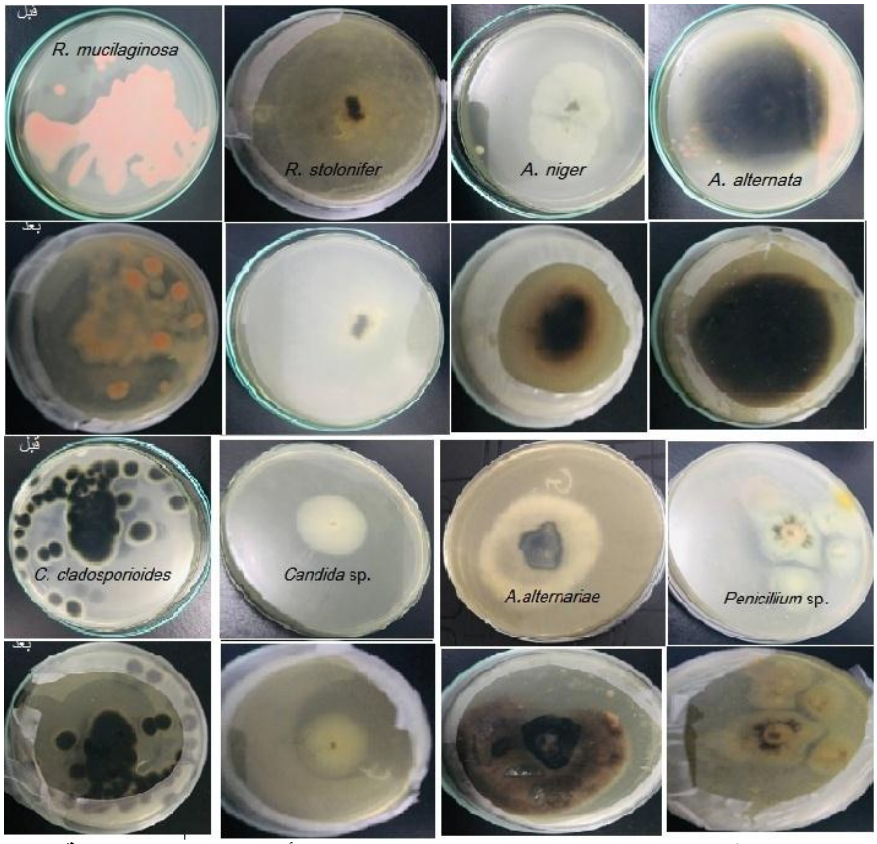
اسم الفطر	عدد العينات التي ظهر فيها الفطر	% التكرار	عدد العزلات	% الكثافة
Acremonium sp.	4	57.1	11	8.5
A. alternata	4	57.1	9	6.9
A .alternariae	1	14.3	12	9.3
A. niger	1	14.3	2	1.5
C. cladosporioides	4	57.1	20	15.4
Penicillium sp.	1	14.3	4	3.1
R. stolonifer	1	14.3	4	3.1
Candida sp.	5	71.4	44	33.8
R. mucilaginosa	4	57.1	26	20
المجموع			130	

ولوحظ في هذه الدراسة ظهور فطر *Penicillum*sp. في أحد أنواع العسل التي تم دراستها وهذا وافق الدراسة التي أجراها(Finola, Lasagno, & Marioli, 2007) ذكر فيها أنه عادة مايتواجد فطر *Penicillum* sp. وفطر *Mucor*sp. في العسل .

وجدت نوعان من الخمائر وكان أكثر تواجدا هو*Candida* sp.، وهذا مافسره (Martins et al., 2003) في دراسة سجل فيها ظهور خمائر عرفت ب *Candida* humicola و*Saccharomyces* sp. وجدت بنسبة عالية ، ويعتبر وجود الخمائر كمؤشر على وجود كائنات دقيقة في العسل، وقد فسر (Martins et al., 2003) انخفاض مستويات التلوث الميكروبي في العسل نتيجة لتأثره بمجموعة واسعة من العوامل منها الظروف البيئية ، والتكوين الجزيئي للعسل وحموضة العسل ، أيضا تم عزل العديد من الخمائر من الأطعمة والمنتجات الغذائية والمشروبات الغازية كما تم ذكرها في دراسة أجراها (Abdel-

Sand, و((Esch, 1992)، (Abdel-Sater, Zohri, & Ismail, 2001) (Sater & Saber, 1999 (FEMJ, GA, & VAN GRINSVEN, 1976

من خلال التجربة اتضح أن بعض الأنواع الفطرية المختبرة لها القدرة على إنتاج السموم والذي ظهر في تغيير لون قواعدها بعد التعرض لبخار الأمونيا مقارنةُ باللون في الشاهد قبل التعرض للبخار،حيث لوحظ التغير في قواعد مستعمرات *A. alternariae*، *A. niger*، *Penicillium* sp. و *R.mucilaginosa* شكل (2). نتائج مماثلة أجراها (Kačániová et al., 2012) عند اختباره سمية الفطر على عسل النحل أثبت فيها ان أنواع العسل المستخدم في دراسته يحتوي على السموم الفطرية بكثرة خاصة من أجناس فطر *Penicillium*، كما توافقت وجود الفطريات المنتجة للسموم في عينات من عسل الزهر البرتغالي قام بها (Martins et al., 2003) اثبت فيها تواجد الفطريات الخيطية في 46 من عينات العسل كانت تابعة الاجناس *A.niger*، *A.fumgatus*، *Penicillum* sp.،*Mucor* sp.، *A.candidus*و*A.flavus* وكان الاختلاف هو ان الفطريات الناتجة لا تحتوي على سموم الافلاتوكسين Aflatoxin.



شكل (2): تغير لون بعض قواعد المستعمرات على الوسط PSAتحت تأثير بخار الامونيا دلالة على وجود السموم

الاستنتاجات:

سجلت الدراسة وجود 9 أنواع من الفطريات في عينات العسل المدروسة، وكان أكثر الأجناس تواجدا , *Candida* sp. *R. mucilaginosa* و *C.cladosporium* . كذلك هذه الدراسة تظهر أن بعض الاجناس الفطرية الموجودة في انواع العسل التجاري المباعة في مدينة البيضاء التي تم دراستها لها القدرة على انتاج السموم الفطرية وهذه الفطريات هي*A.alternariae*، *R. mucilaginosa* ، *A. niger* ، *Penicillium* sp. أما باقي الفطريات المعزولة غير سامة.

Isolation and characterization of fungi contaminant from some types of commercial honey in El-Beida city, Libya

Ibtesam. Mohamed Abedalrhman
Department of Biology, Education Faculty, Omer Al-Mukhtar University, El-Beida, Libya
E-mail: islam606721@gmail.com

Abstract: This study was conducted with the aim of detecting fungi contaminated with types of commercial honey sold in the city of Al-Bayda (including Al-Shebro honey, Al-Hanoun, Sidr honey, thyme, Camphor, Spring and honeydew honey), where the fungi were isolated, defined and tested for their ability to produce toxins on the medium (PSA) using ammonia vapor. The results revealed the presence of 9 different fungal species They included *Acremoniumsp., A. alternata, A.alternariae, A. niger, C. cladosporioides, R. stolonifer, Candida sp., R. mucilaginosa and Penicillium sp*. The species *Candida sp*. was the most numerous and dense, with 44 fungal colonies and densities (33.8%) recorded, while the lowest density (3.1%) was recorded for *Penicillum.sp*. and *R.stolonifer*. Also, it was noticed that Shebro honey was the type of honey in which the most fungal genera were present, followed by Camphor honey and thyme honey, while the least fungal diversity was in Spring honey, Hanoun honey and Dew honey, and when conducting a toxicological test for isolated fungi using ammonia vapor, *A.alternariae, A. niger, R. mucilaginosa,* and *Penicillium sp*. The toxins are produced in the culture medium.

Keywords :fungi., mycotoxin, honey.

Reference:

1-Abdel-Sater, MA, & Saber, Sabah M. (1999). Mycoflora and mycotoxins of some Egyptian dried fruits. *Bull. Fac. Sci., Assiut Univ*, *28*(1-D), 91-107.

2- Abdel-Sater, MA, Zohri, AA, & Ismail, MA. (2001). Natural contamination of some Egyptian fruit juices and beverages by mycoflora and mycotoxins. *JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-MYSORE-*, *38*(4), 407-411.

3- Barnett, Horace Leslie, & Hunter, Barry B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*: American Phytopathological Society (APS Press).

4- Esch, F van. (1992). Yeast in soft drinks and concentrated fruit juices. *Brygmesteren (Denmark)*.

5- Finola, Mónica S, Lasagno, Mirta C, & Marioli, Juan M. (2007). Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry, 100*(4), 1649-1653.

6- Jiménez, Misericordia, Mateo, José Juan, Huerta, Tomás, & Mateo, Rufino. (1994). Influence of the storage conditions on some physicochemical and mycological parameters of honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 64*(1), 67-74.

7- Kačániová, Miroslava, Kňazovická, Vladimíra, Felšöciová, Soňa, & Rovná, Katarína. (2012). Microscopic fungi recovered from honey and their toxinogenity. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, 47*(11), 1659-1664.

8- Kidd, Sarah, Halliday, Catriona L, Alexiou, Helen, & Ellis, David. (2016). *Descriptions of medical fungi* (Vol. 3): David Ellis.

9- Martins, H, Martins, L, & Bernardo, F. (2003). Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey Esporos de Bacillaceae, fungos e aflatoxinas em mel. *RPCV, 98*, 85-88.

10- Popa, Maria, Vica, Mihaela, Axinte, Roxana, Glevitzky, Mirel, & Varvara, Simona. (2009). Study concerning the honey qualities in Transylvania region. *Annales Universitatis Apulensis: Series Oeconomica, 11*(2), 1034.

11- Saito, Michihiko, & Machida, Sachiko. (1999). A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of Aspergillus flavus and A. parasiticus by ammonia vapor. *Mycoscience, 40*(2), 205-208.

12- Sand, FEMJ, FEMJ, SAND, GA, KOLFSCHOTEN, & VAN GRINSVEN, AM. (1976). Yeasts isolated from proportioning pumps employed in soft drink plants.

13- White, Jonathan W. (1992). Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. II. *American bee journal (USA)*.

14- White Jr, Jonathan W. (1978). Honey. *Advances in food research, 24*, 287-374.

15- White Jr, Jonathan W, & Rudyj, Orest N. (1978). The protein content of honey. *Journal of Apicultural Research, 17*(4), 234-238.