دراسة فعالية المستخلص المائي لقشور الرمان *Punica granatum* L. على الفطريات المعزولة من حبوب العدس والبازلاء

وسن صالح حسين* مؤمن علي عبد**

المستخلص: هدف البحث الى دراسة فعالية المستخلص المائي لقشور الرمان *Punica granatum* L. على الفطريات المعزولة من حبوب العدس *Lens culinaris* والبازلاء *Pisum sativum* لمواد السلة الغذائية الموزعة في مدينة الموصل حيث تم عزل ثلاث انواع من الفطريات وهي *Aspergillus flavus* بنسبة 33.3% و 43.5% من حبوب العدس والبازلاء على التوالي و *Aspergillus nigar* بنسبة 6.6% و25% من حبوب العدس والبازلاء على التوالي وكذلك تم عزل *Mucor sp.* بنسبة 13.3% في حبوب البازلاء فقط. كما تم دراسة تأثير قشور الرمان على الفطرين *Aspergillus flavus* و*Mucor sp.* واظهرت نتائج الدراسة ان مستخلص قشور الرمان ذو فعالية عالية في تثبيط النمو للفطر *Aspergillus flavus* اذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط 71 و 64% عند التراكيز 15 و 10% على التوالي، بينما كانت نسبة التثبيط لمستخلص قشور الرمان ضد الفطر *Mucor sp.* اقل نسبيا حيث بلغت النسبة المئوية للتثبيط 45 و 33% عند التراكيز 15 و 10% على التوالي.

الكلمات المفتاحية: العدس، البازلاء، *Aspergillus flavus*, Mucor sp ، قشور الرمان

Studying the effectiveness of pomegranate peels Punica granatum L. aqueous extract on fungi isolated from lentils and peas

***Wasan Saleh Hussein**

Asst.proph, Department of Biology, College of Sciences, Mosul University, Iraq

Momin Ali Abed

*** Research, College of science, Mosul University**

Abstract: Research was aim to study the effectiveness of pomegranate peels aqueous extract (*Punica granatum* L.), on the fungi isolated from lentils (*Lens culinaris*) and peas (*Pisum sativum*) from the food basket distributed in the city of Mosul Where three types of fungi were isolated: *Aspergillus flavus* by 33.3% and 43.5% of lentils and peas respectively، and *Aspergillus nigar* by 6.6% and 25% for lentils and peas respectively, and Mucor sp. 13.3% in peas only. And study effect of pomegranate peels on fungi *Aspergillus flavus* and Mucor sp. The results of the study showed that pomegranate peel extract was highly effective in inhibiting the growth of the fungus *Aspergillus flavus*, as the percentage of inhibition reached 71 and 64% at 15 and 10% respectively. While the percentage of inhibition of pomegranate peel extract against Mucor sp. Relatively less, as the percentage of inhibition reached 45 and 33% at 15 and 10%, respectively.

Key words: lentils, peas , *Aspergillus flavus*, Mucor sp, pomegranate peels .

المقدمة:

تعد الحبوب مصدرا اقتصاديا مهما فبعضها يستهلك كغذاء رئيسي للإنسان، وهناك العديد من المواد العالقة على الحبوب بعد حصادها التي تزال بعملية التنظيف ألا إن أنواعا معينة من الفطريات تبقى عالقة بالحبوب والتي تسمى الفطريات المرافقة للحبوب Seed-borne fungi والتي تسبب أو تساعد في تدهورها (محمد، 1983).

*أستاذ مساعد، قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق wassbio54@uomosul.edu.iq

**باحث، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق momen.sc53@student.uomosul.edu.iq

ولكثرة المشاكل التي تسببها الفطريات المرافقة للحبوب ومنها اتلاف الحبوب وإفرازاتها السامة للإنسان والحيوان والتي تميزت عزلاتها بإنتاجها للسموم الفطرية Mycotoxin وهي منتجات ايض ثانوي تتعرض لها المنتجات الزراعية قبل الحصاد وما بعد الجني واثناء الخزن، وقد بينت الدراسات ان الفطر *Aspergillus flavns* يتميز بمقدرته العالية على انتاج اكثر السموم الفطرية خطورة و وجود على سطح الكره الارضية ويعتبر الافلاتوكسين B1 من اهم المركبات التي لها دور كبير في احداث الامراض السرطانية لمعظم الكائنات الحية التي تتعرض الى مواد حاملة لهذه المركبات. اما الفطر *Aspergillus nigar* فهو واسع الانتشار ويسبب عفن البذور ومرض العين الزرقاء للفواكه والخضراوات. ويعتبر من فطريات المخازن التي تسبب ذبولاً للبادرات (الجميلي،2009) اما الفطر *Mucor sp.* والذي يسمى بالعفن الاسود والذي ينمو في الاماكن الرطبة مسببا تعفن في كثير من الفواكه البذور (Batt،2014).

وعلية حاول الإنسان جاهدا لدرء هذه الكائنات ومنع انتشارها باستخدام الطرق الآمنة والتي منها المستخلصات النباتية، حيث تشكل النباتات في الوقت الحاضر خزينا مهما للعديد من المركبات الدوائية اذ ثبت أمكانية استخدامها بشكل خام لامتلاكها فعالية بيولوجية عالية إضافة الى استخدامها أكثر أمانا من المستحضرات المصنعة، فالعديد من النباتات تنتج مواد بيولوجية ذات فعالية علاجية تستعمل كمضادات فطرية او بكتيرية ،2003, AL-Mughrabi).

ويمتلك الرمان العديد من المركبات الفعالة التي اظهرت فاعليتها كمضادات للفطريات والبكتريا وكذلك مضادات للأكسدة (Mansour *et al*،2013) ، يمتلك الرمان العديد من المركبات الفعالة مثل (التانينات Tannins، الفلافونات Flavonoids، القلويدات Alkalaids، الفينولات Phenols، صابونياتSaponins ، الراتنجات Resins، كلايكوسيدات Glycosides،-Ellagic acid، gallic acid) واظهرت هذه المركبات فاعليتها بوصفها مضادات للفطريات والبكتريا وكذلك مضادات للاكسدة (Mansour *et al*.2013) ، وبينت الدراسات وجود العديد من المركبات المشخصة بوساطة تقنية HPLC هي (Tannic acid, Ellagic acid, Gallic acid, Rutin, Qurtecin (الجنابي ،2019). استخدم الرمان. Punica *granatum* L الذي ينتمي إلى عائلة Punicaceae على مدى قرون لمعالجة مختلف الامراض في الهند واسيا حيث غرف بفعاليته الحيوية بوصفه مضاد اكسدة Antioxidant، ومضاد للسرطان Anticarcinogenic، ومضادا للالتهابات Antinflamation، ومضاد للبكتريا Antibacterial، ومضاد للفطريات Antifungal. حيث اظهرت المستخلصات للأجزاء المختلفة لشجرة الرمان كفاءة عالية في الاغراض العلاجية المختلفة ومنها تأثيرها المضاد لأنواع الكانديدا .Candida spp والخميرة Saccharomy (Duman *et al*. 2009).

ونظرا لوجود خزين من هذه الشجيرة في العراق ولإمكانية تحضير مستخلصاتها بتقانات سهلة وكلفة ارخص لذا تضمنت هذه الدراسة استخدام المستخلصات المائية لقشور ثمار الرمان في مقاومة بعض الفطريات الممرضة المعزولة من البقوليات الموزعة في مواد السلة الغذائية وهي *Aspergills flavus* و*Aspergillus nigar* و*Mucor sp.*.

الهدف من الدراسة: –

1.عزل وتشخيص الفطريات من بعض انواع البقوليات الموزعة في السلة الغذائية في محافظة نينوى.

2.اختبار الفعالية البايولوجية للمستخلص المائي لقشور الرمان على الفطريات المعزولة من البقوليات.

المواد وطرائق العمل: –

جمع العينات: –

تم جمع العينات من محاصيل البذور وهي العدس *Lens culinaris*، والبازلاء *Pisum sativum* من مواد السلة الغذائية الموزعة في مدينة الموصل. كما تم الحصول على نبات الرمان من الاسواق المحلية لمدينة الموصل.

عزل الفطريات من البذور: –

عقمت البذور سطحيا بغمرها في محلول هايبوكلورات الصوديوم (NaCIO) تركيزه 3% لمدة دقيقتين بواقع 15 بذرة لكل نوع، ثم غسلت البذور بالماء المقطر المعقم لمدة لا تزيد عن دقيقتين ثم جففت على ورق ترشيح معقم لتجفيفها من الماء الزائد. كما تم عزل الفطريات ايضا بدون تعقيم بواقع 15 بذرة لكل نوع لعزل الفطريات المتواجدة على سطح البذرة زرعت البذور المصابة بصورة عشوائية في إطباق بتري زجاجية معقمة قطر 9 سم تحتوي على الوسط الغذائي المعقم (potato dextrose agar) PDA الذي حضر في المختبر وبثلاث أطباق لكل نوع من البذور، حضنت الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة 25± 2 لمدة 3-5 ايام بعدها حسبت النسبة المئوية لظهور، ثم شخصت الفطريات اعتمادا على الصفات التصنيفية التي أوردها كل من(Raper و Fennell Hoog , 1965 ;1971, Ellis; و Guarro , 1995) . و تم توزيع البذور على اطباق بتري تحتوي على وسط PDA. تم حساب نسبة الظهور للفطريات المعزولة حسب المعادلة الاتية:

$$\text{النسبة المئوية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها النوع الواحد}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

تحضير المستخلص المائي لقشور الرمان: –

حضر المستخلص المائي بإضافة 10 غم من مسحوق قشور الثمار إلى 100 مل ماء مقطر ومزج بواسطة خلاط كهربائي لمدة 15 دقيقه ثم ترك المزيج لمدة نصف ساعة بعدها رشح خلال أوراق ترشيح، Whatman No1 للحصول على رائق ستستخدم لاحقا في الدراسة كمحلول أساس،Solutions stock حفظت المحاليل في قناني زجاجيه محكمه الغلق في الثلاجة على درجة حرارة 4 ±1 م لحين الاستعمال بعد ان تم تعقيم المستخلص بواسطة Membrane filter 0.22.

تحضير الوسط الزرعي (PDA): –

حضر الوسط الغذائي PDA بواقع (150 مل) حيث تم تسخين الوسط على النار حتى الغليان ووضع في قارورة زجاجية محكمة الغلق وعقم في جهاز المؤصدة Autoclave لمدة 20 دقيقة.

اختبار فعالية المستخلص المائي لقشور ثمار الرمان ضد الفطريات المرافقة للبذور: –

تم تحضير الوسط الزرعي كما في الفقرة السابقة وبعد انخفاض درجة حرارة الوسط وقبل التصلب اضيفت كميات معلومة الى الدوارق الحاوية على الوسط الزرعي للحصول على التراكيز (10%و15%)، رجت الدوارق بصورة جيدة لضمان تجانس المستخلص مع الوسط الزرعي، صبت الاوساط الغذائية في اطباق بتري معقمة قطرها ٧سم وذلك بواقع ثلاث مكررات لكل

تركيز ولكل فطر، استخدم وسط غذائي غير معامل للمقارنة. لقحت جميع الاطباق بعد تصلب الوسط فيها بأقراص قطر كل منها (0.5سم) مأخوذة من اطباق تحتوي على مستعمرة الفطر *Aspergillus flavus*و *Mucor sp* بعمر 4ايام، حضنت جميع الاطباق في الحاضنة على درجة حرارة (27 م°) وتم قياس قطر المستعمرة بعد مرور اسبوع من التحضين ثم قيست النسبة المئوية للتثبيط حسب معادلة (Abbot ,1925).

$$Rr = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

R1 = الاطباق غير المعاملة (المقارنة)،R2 = الاطباق المعاملة بالمستخلص النباتي

Rr = النسبة المئوية للتثبيط

النتائج والمناقشة: –

عزل الفطريات: –

اظهرت النتائج ان البذور المختبرة (العدس *Lens culinaris* والبازلاء *Pisum sativum*) عزلت منها نوعين من الفطريات هما *(Aspergillus flavus* و*Mucor sp.)* ضمن العينات المعقمة سطحيا بتركيز(3%) من هيبوكلورات الصوديوم، في حين ظهر نوعين من الفطريات في عينات البذور الغير معقمة هما *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* والتي شخصت بالاعتماد على الصفات التصنيفية الواردة في كثير من الابحاث العلمية مثل شكل ولون المستعمرة الفطرية وحجم الكونيديات وشكل ونوع الحامل الكونيدي ونوع الجسم الثمري الشكل(4). توافقت هذه النتائج مع دراسة. Ahmad *et al* (2013) اذ تم عزل الفطريات *Aspergillus nigar* و*Aspergillus* flavus و *Mucor sp.* من حبوب كل من الفاصولياء البيضاء، الحمص، الفول، البازلاء السوداء، العدس.

الخواص المظهرية والمجهرية للفطريات المعزولة: –

الفطر *Aspergillus flavus*: –

اظهر الفطر مستعمرات بيضاء قطنية في بداية النمو وعند نضج المستعمرة اصبحت خضراء مصفرة، الحويصلة بيضوية، الذنيبات مكونة من صف واحد. وهو متوافق مع ما تم ذكره في (pitt, *et al*,1997).

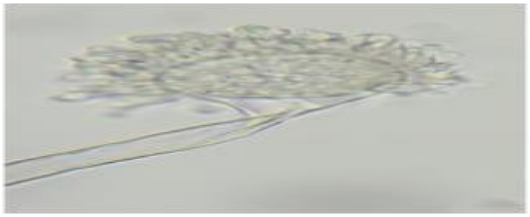
الفطر *Aspergillus niger*: –

المستعمرة في بداية النمو بيضاء اللون وعند نضج المستعمرة اصبحت سوداء اللون، الحويصلة كروية، الذنيبات مكونة من صفين الاولى قصيرة والثانية متفرعة. وهو متوافق مع ما تم ذكره في (pitt *et al.*1997)

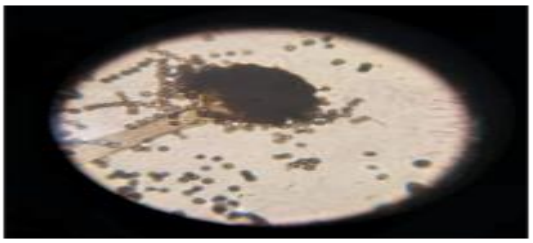
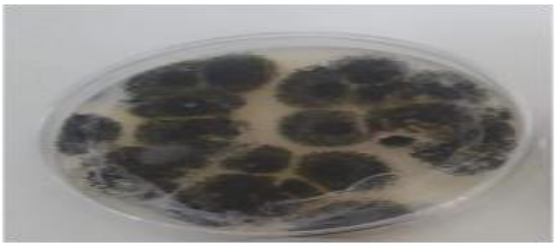
الفطر *Mucor sp.*:

المستعمرات في بداية النمو بيضاء اللون ومن ثم تتحول تدريجيا الى اللون الاسود مع نمو كثيف يصل الى اعلى الطبق، الكيس البوغي sporangiaكروي الشكل، ولا يحتوي الفطر على اشباه جذور rhizoids وكذلك لا يحتوي على خيوط مدادة stolons وهو وافق مع ما تم ذكره في (pitt *et al* 1997)

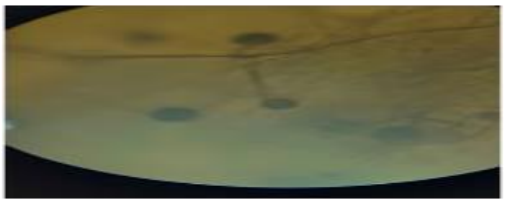
الشكل (4) يوضح الفطريات المعزولة من بذور العدس والبازلاء



Aspergillus flavus

Aspergillus nigar



Mucor sp.

بينت نتائج الجدول (1) ان النسبة المئوية لظهور الفطر *Aspergillus flavus* على حبوب العدس والبازلاء بلغت (33.3 و43.5%) على التوالي، في حين كانت النسبة المئوية لظهور *Asergillus niger* على حبوب العدس والبازلاء (6.6 و25%) على التوالي، اما الفطر *Mucor sp.* فكانت النسبة المئوية الظهور على حبوب العدس 0% في حين بلغت 13.3 على بذور البازلاء.

جدول (1) النسبة المئوية لظهور الفطريات المرافقة لحبوب العدس والبازلاء

ت	الفطريات المعزولة	الظهور% العدس	الظهور % البازلاء
1	*Aspergillus flavus*	33.3	43.5
2	*Asergillus niger*	6.6	25
3	*Mucor sp.*	0	13.3

القابلية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان على نمو الفطريات على الوسطPDA

اشارت نتائج الجدول (2) والشكلين (5 و6) الى الاختلاف في القابلية التثبيطية لتراكيز المستخلص المائي لقشور الرمان على نمو الفطريات المرافقة للحبوب حيث بلغت اعلى نسبة مئوية للتثبيط 71% و 45% سجلت بتركيز 15% للفطريات *Aspergillus flavus* و *Mucor sp.* على التوالي في حين بلغت اقل نسبة للتثبيط بتركيز 10% اذ بلغت 64% و 33% للفطريات *Aspergillus flavus* و *Mucor sp.* على التوالي، توافقت هذه النتائج مع ما وجده Dahham *et al*2010))الذين اشاروا الى الكفاءة العالية للمستخلص المائي لقشور الرمان في تثبيط الفطريات *Aspergillus*

flavus و *Penicillium*، *Mucor sp.* ويعزى سبب هذا التثبيط الى مركبات الايض الثانوي الموجودة في قشور الرمان مثل الفينولات والقلويدات والفلافونيدات والمعروفة بتاثيرها التثبيطي (Hussain,2020).

جدول(2) تأثير مستخلص قشور الرمان على نمو الفطريات المرافقة للحبوب والنسبة المئوية للتثبيط

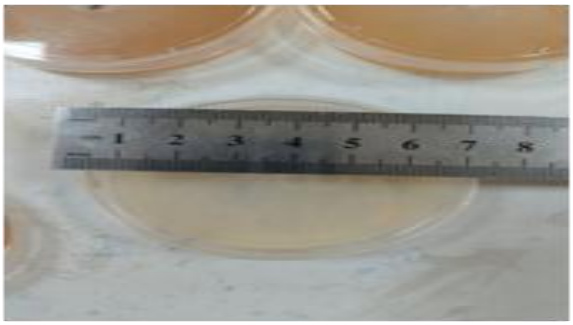
المعاملات	قطر المستعمرة (سم)		التثبيط(%)	
	A. flavus	*Mucor sp.*	*A. flavus*	*Mucor sp.*
المقارنة	7	7	0.0	0.0
%10	2.5	4.7	64	33
%15	2	3.85	71	45

شكل (5) تأثير مستخلص قشور الرمان على نمو فطر *Aspergillus flavus.*

Control

15% مستخلص قشور الرمان **10% مستخلص قشور الرمان**

شكل(6) تأثير مستخلص قشور الرمان على نمو فطر *Mucor sp*



Contr

15% مستخلص قشور الرمان **10% مستخلص قشور الرمان**

الاستنتاجات: –

بينت النتائج عزل نوعين من الفطريات وهي *Aspergillus flavus* و *Aspergillus nigar* من حبوب العدس والبازلاء الموزعة في مواد الحصة التموينية، كما تم عزل Mucor sp. في حبوب البازلاء فقط. اظهرت الدراسة ان مستخلص قشور الرمان ذو فعالية تثبيطيه عالية على الفطرين *Aspergillus flavus* و Mucor sp.، واظهر الفطر *Aspergillus flavus* تأثرا واضحا للمستخلص المائي لقشور الرمان. بينما كانت نسبة التثبيط لمستخلص قشور الرمان ضد الفطر Mucor sp. اقل نسبيا واعطى التركيز 15% اعلى نسبة مئوية لتثبيط الفطريات المعزولة من الحبوب.

المصادر العربية والأجنبية:

الجميلي، سامي عبد الرضا علي وعذراء حرجان محسن (**2009**)، **التأثيرات السمية لحبوب الحنطة المصابة بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* في الجهاز التناسلي لإناث الجرذ الأبيض**، مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة، 1(2).

الجنابي، محمد سامي فرحان (**2019**)، **الفعَّالية التثبيطية لقشور ثمار نبات الرمان *Punica granatum***. رسالة ماجستير، كلية العلوم /جامعة تكريت، العراق.

محمد، عز الدين سلطان (**1983**)، **أنتاج بذور الخضروات**، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة الموصل، مطابع جامعة الموصل.

Ahmed ,N.H. .;Abood,S.A and AL- Janabi ,A.A.(2013).Antimicrobil Effect of Pomegranate peel Extract on some pathogenic Microorganisms. Eng .and Tech.J.31(3):316-324.

Al-Mughrabi , K.I.(2003).Antimicrobial activity of extracts from leaves ,stems and flowers of *Euphorbia macrolada* against plant pathogenic fungi Phytopathol .Mediterranea,42:245-250.

Batt , C. A., & Tortorello, M. L. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology: (2nd ed., Vol. 1). Academic press.

Dahham , S.S.; Ali , M.N.; Tabassum , H. and Khan , M. (2010). Studies on antibacterial and antifungal activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) varities and their relation to some of their Pomological and phytonutrient Characteristics .Molecules . 14:1808-1817 .

Duman , A. D.; Ozgen , M.; Dayisoylu , K. S.; Erbil , N.; Durgac ,C. (2009). Antimicrobial activity of six pomegranate (*Punica granatum* L.) Varities and their relation to some of their Pomological and phytonutrient Characteristics . Molecules.14:1808-1817.

Ellis ,M.B.(1971) *Dematiaceous hyphomycetes*. Common Wealth Mycol. Inst. Kew, Surrey, England. 608p.

Hussain, W. S. (2020). Effects of Spraying aqueous extracts of some crop plants on growth of four types of weeds. Plant Archives. 20 (1), 1460-1464 .

Hoog, G.S. and Guarro, J (1995) Atlas of clinical fungi. Centeralbureau voor Scimmel-cultures and universitat Rovirai virgili , Spain. 720 p.

Mansour , E.; Ben Khaled , A.; Lachiheb , B.; Abiod , M.; Bachar , K. H. and Ferchich , A. (2013). Phenolic Compounds , Antioxidant and Antibacterial activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate . J. Agr. Sci. Tech. 15 : 1393 - 1403.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D (1997). Fungi and Food Spoliage, 2nd ed. Gaithersburg, Maryland, pp 593.

Raper,K.B. and Fennell, D.I (1965) The genus Aspergillus . Baltimore, Williams and Wilkins Co. P 686.