تأثير الحرارة على انتاج السم Patulin المفرز من الفطر Penicillium expansum link. في ثمار التفاح .

د. جبار سلمان خلباص العتابي
قسم علوم الحياة
كلية الآداب والعلوم
جامعة التحدي

الخلاصة Abstract

تم استخلاص وتشخيص سم البايتولين في ثمار التفاح المتعفن starking delicious ، والذي جمع في الاسواق المحلية ، وذلك باستخدام التحليل الكروماتوجرافي العمودي ، وحددت كميات السم المتواجدة في الانسجة المتعفنة ، بصفائح السليكاجيل الرقيقة TLC Plates , فكانت بتركيز 1 – 18 مايكرو جرام /جرام نسيج متعفن . كما وجد السم في الانسجة السليمة المظهر التي تحيط بالانسجة المتعفنة وبمكيات 0 – 1.2 مايكروجرام /جرام نسيج. لقحت ثمار التفاح السليمة Pyrus malus var. Starking delicious بسبورات عزلة منتجة للفطر Penicillium expansum ، وذلك بادخال ابرة مغطاة بسبورات الفطر داخل الثمار ، وحضنت الثمار على درجات حرارة 9 و 18 و 23 م°. تبين بأن الفطر يفرز السم Patulin بكميات تتناسب مع قطر التعفن ، الا ان انتاج السم عند الدرجة الحرارية 9 م° كان اكثر منه عند الدرجات الحرارية 18 و 23 م° حيث بلغت اعلى كمية من السم 32 مايكروجرام / جرام نسيج متعفن عند الدرجة الحرارية 9 م° مقارنة بـ 12.4 و 8.6 مايكروجرام/جرام نسيج عند الدرجات 18 و 23 م°. . كما وان السم ينتشر للانسجة السليمة المظهر المحيطة بالانسجة المتعفنة وبكميات كانت اقصاها 19٪ من مجموع السم المفرز في الثمار تحت درجة 9 م° .

Effects of temperature on the production of patulin mycotoxin by Penicillium expansum Link . on Apple Fruits.

Abstract

Analysis of the decayed apples (var. Starking delicious), collected from the local market, for patulin mycotoxin, using column chromatography and TLC plates, showed that patulin mycotoxin was present in all the decayed tissues at the level 1- 18 µg/g moldy tissue. However,patulin

mycotoxin was found at the level 0 - 1.2 µg/g healthy tissues surrounding the decayed tisues.

Inoculation of healthy apple fruits (var. starking delicious) with Penicillium expansum link. spores, and incubation for different periods of time under different temperaure 9, 18 and 23°c, showed that patulin quantity proportionally related to the size of moldy lessions. The highest quantity (32 µg/g. of moldy tissues) of patulin mycotoxin was produced under the temperature 9°c in comparison with 12.4 and 8.6 under the temperatures 18 and 23°c, respectively . Patulin mycotoxin could be diffused to the healthy tissues surrounding the moldy tissues. The maximum quantity extracted from the healthy tissues was 19% of overall patulin mycotoxin produced under the temperature 9°c.

المقدمة Introduction

السموم الفطرية Mycotoxins لهاأهمية بايولوجية كبيرة حيث تتداخل مع تخليق الحمض النووي DNA وتؤدي الى ظهور طفرات وراثية سرطانية على الانسان والحيوان (2 ، 1) ، ويعزى لها اعراض مرضية على الجهاز العصبي المركزي والقلب (3) . الباتيولين Patulinأحد الأمثلة لهذه السموم ، وهو لكتون غير مشبع صيغته الوصفية $C_7 H_6 O_4$ يفرز من قبل العديد من الفطريات التي تعود الى الاجناس Aspergillus و Penicillium، ويعتبر من السموم الفطرية التي تؤثر على الاحياء الدقيقة والحيوانات (5–8) ، يؤثر سم الباتيولين على العديد من النباتات ، حيث يسبب ذبول بادرات العصفر Safflower 9، كما ان زراعةالفرع نبات البطاطا الحلوة Itomoea cairica في تربة تحتوي على 5 ملجم سم الباتيولين / لتر ماء يسبب ذبول الافرع ويؤدي الى تقليل الجذور وتثبيط النمو (10) .

يتواجد سم الباتيولين في ثمار التفاح المتعفن وفي عينات ثمار الكمثري المتعفن وبكميات تراوحت من 1 – 15 مايكروجرام/ جرام نسيج متعفن (7) . كذلك حصل لندروث ونسكانن (Lindroth and Niskanen, 1978)على سم الباتيولين بتركز 3 – 16400 ، مايكروجرام باتيولين / لتر عصير التفاح المتعفن ، كما أشار ثورم وآخرون (Thurm et. al., 1979) (12) الى وجود سم الباتيولين في عصير الكرز الحامض وبكميات 20 – 2000 مايكروجرام باتيولين /لتر عصير .

ونظرا لذوبان السم في الماء ، فقد وجد بتراكيز 44 – 75 جزء من المليون (ج . م. م.) في ماء التربة المحتوية على بقايا نبات القمح الذي يصبح وسطا لنمو الفطر Penicillium expansum والذي يفرزسم الباتيوليس (13).

تهدف الدراسة الحالية الى التحري عن وجود الباتيولين في ثمار التفاح المتعفن والمتوفر في الاسواق المحلية ، وكذلك ايجاد علاقة بين قطر التعفن وكمية سم الباتيولين المفرز من الفطر P. expansum تحت ظروف

المواد والطرق Materials Methods

لغرض التحري عن وجود سم الباتيولين في ثمار التفاح المتعفن ، جمعت عينات ثمار التفاح Pyrus malus var. Starking delicious المتعفن من الاسواق المحلية ، ووضعت في اكياس بولي اثيلين .

حددت اقطار التعفن وازيلت الاجزاء المتعفنه ووزنت ، ثم ازيلت الانسجة السليمة المظهر الواقعة حول منطقة التعفن بقياس 1سم ووزنت . وضعت الانسجة ،كلاً على انفراد في دوارق زجاجية معقمة لفرض الكشف عن سم الباتيولين .

ولفرض اختبار تأثير درجة الحرارة على انتاج سم الباتيولين من قبل الفطر Penicillium ex-pansum link. فقد عقمت ثمار التفاح السليمة المظهر (ضرب ستاركنك ولشز) بـ 10٪ محلول هايبوكلوريت الصوديوم لمدة خمس دقائق ، ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ، بعدها لقحت الثمار وذلك بادخال ابرة معقمة مغطاة بسبورات عزلة منتجة للفطر P. expansum (تم تنميتها على الوسط الزرعي حصل بطاطا وكستروز اجار PDA لمدة سبعة أيام تحت درجة حرارة 25 مْ) ، وحضنت الثمار تحت درجات حرارية 9 و 18 و 23 مْ . حسبت أيام الحضانة اللازمة لبلوغ التعفن القطر المطلوب ، بعدها جمعت الاجزاء المتعفنة والانسجة السليمة المظهر ، والتي تقع حول الانسجة المتعفنة ومقياس 1 سم ، ووزنت كلا على انفراد ، ووضعت في دوارق زجاجية معقمة لفرض الكشف عن سم الباتيولين .

تم استخلاص سم الباتيولين ، من ثمار التفاح التي جمعت من الأسواق المحلية ومن ثمار التفاح التي تم تلقيحها P.expansum , وذلك بأخذ 50 جم ، من الأنسجة المتعفنه أو الأنسجة سليمة المظهر التي تقع خارج الأنسجة المتعفنة ، ووضعت في جهاز الخلط لمدة خمس دقائق ، واستخلص ثلاث مرات وذلك بأضافة 50 مل من خلات الأثيل لكل مرة ، واستخدم الهزاز Wrist- action لمدة عشر دقائق لكل مرة . ولفرض ازالة الماء ، استخدم قمع فصل سعته 250 مل ، بعدها مررت الخلات على 20 جرام كبريتات الصوديوم اللامائية لفرض ازالة الماء المتبقي ، ثم نقلت الى دورق وغسلت الكبريتات مرتين بـ 25 مل من خلات الاثيل . تم تبخير الخلات وذلك باستخدام حمام مائي 60 مْ وامرار تيار على النتروجين الى أن أصبح حجم الخلات 0.5 مل تقريبا ، ثم اضيف اليها 10 مل من محلول (25 مل خلات الاثيل + 75 مل بنزين) .

ولغرض تنقية المستخلص من الشوائب ، تم امرار المتخلص خلال عمود الكروماتوجراف (Column chromatography) (30 × 2.5) والذي يتكون من السليكاجيل 15 جم عالقة بـ 10 مل بنزين ، بعدها تم تبخير المستخلص حتى الجفاف على حمام مائي حرارته 60 مْ وأمرار تيار من النتروجين . اذيب الراسب بـ 2 مل كلوروفورم .

استخدمت صفائح السليكاجيل الرقيقة TLC plates، المجهزة من شركة E. MERK الألمانية ، لتحديد كمية سم الباتيولين ، حيث وضعت بقع المستخلص والمحلول القياسي لسم الباتيولين الذي جهز من (Pohland, A.E. Division of Food Chemistry and Technology, Food and Drug Administration, Washington , D.C. 20204) . على الصفائح واستخدم محلول التظهير (تولوين – خلات الاثيل – 90٪ حامض الفورميك بنسب 1: 3: 6 : على التوالي) . قدر سم الباتيولين الموجود في المستخلص باستخدام جهاز UV طول موجته القصيرة 2537 انجستروم والطويلة 3000 انجستروم ،

ومقارنة كمية السم الموجود في المستخلص بالمحلول القياسي . بالعين المجردة . حيث استخدمت هذه الطريقة من قبل كرستوفر (Christopher, 1979)(14) .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

أوضحت نتائج الدراسة (شكل 1) الى وجود كميات من سم الباتيولين في الاجزاء المتعفنة لثمار التفاح ، الذي جمع من الاسواق المحلية ، وبكميات تراوحت من 1 – 18 مايكروجرام باتيولين /جرام من وزن الانسجة المتعفنة، وقد جاءت هذه النتيجة مقارنة لماحصل عليه نورثولت و آخرون (Northolt et al., 1978) (15) حيث وجد 1 – 16 مايكروجرام باتيولين / جم من الانسجة المتعفنة . ويعزى الاختلاف في كميات السم الموجود في البقع المتعفنة الى اختلاف الفطريات المفرزة للسم ، أو الى اختلاف العزلات الفطرية ، أو الى وجود فطريات على ثمار غير مفرزة للسم تنافس الفطريات المفرزة للسم وبالتالي الى تباين كمية السم ، حيث تم عزل فطريات الى الاجناس Alternaria و Cladosporium و Aspergillus و Fusarium و Helminthosporium و Monosporium و Penicillium و Rhizopus و Trichothecium و Yeast. ويعتبر Penicillium أكثر الفطريات تواجدا على ثمار التفاح ، كما ان فطر Penicillium expansum أكثر الفطريات إفرازا للسم (نتائج غير منشورة) كما اظهرت الدراسة وجود (0 – 1.2 مايكروجرام باتيولين /جم نسيج) في الانسجة السليمة المظهر والواقعة حول منطقة التعفن ، وهذا يدل على انتشار السم الى الانسجة المحيطة بالانسجة المتعفنة، في حين ذكر بيوكانان واخرون (Buchanan et al. 1974) (16) ولوفيت وآخرون (Lovett et al. 1975) (17) الى ان 99٪ من سم الباتيولين يمكن ازالته وذلك بازالة الانسجة المتعفنة .

أشارت نتائج الدراسة الحالية (جدول 1) ، الخاصة بايجاد علاقة بين درجة الحرارة وكمية السم المفرز في بقع التعفن المختلفة للثمار ، الى وجود كميات من سم الباتيولين تراوحت من 2.9 – 3.2 ، 4.2 – 12.4 ، 5 – 8.6 مايكروجرام باتيولين /جرام من النسج المتعفن للثمار بفعل منتجه للفطر Penicillium expansum تحت درجات الحرارة 9 و 18 و 23 مْ على التوالي، وتتناسب كمية سم الباتيولين تناسبا طرديا مع قطر التعفن ، ويشير التحليل الاحصائي الى وجود فروقا معنوية بين كمية السم المفرز ضمن البقع المختلفة تحت الدرجة الحرارية الواحدة . ان درجة الحرارة تؤثر على سرعة نمو القطر وبالتالي الى اختلاف عدد ايام الحضانة لبلوغ قطر التعفن المطلوب (شكل 2) وهذا يؤدي الي تباين كمية السم المنتج لنفس قطر التعفن لقد ذكر سومير وآخرون (Sommer et al., 1974) (18) الى ان عدد ايام الحضانة اللازمة لبلوغ قطر التعفن 2 سم على ثمار التفاح Gravenstein هو خمسة أيام تحت درجة حرارة 20 مْ و 36 يوما تحت

درجة الصفر المئوي ، في حين اظهرت الدراسة الحالية (شكل 2) الى 28 يوما لبلوغ قطر التعفن 6 سم تحت درجة حرارة 9 م° و 13 يوما تحت درجتي 18° م و 23° م وقد اظهر التحليل ازحصائي وجود ارتباطا معنويا بين قطر التعفن وعدد أيام الحضانة (شكل 2) . يلاحظ من النتائج ايضا ان النمو البطئ للفطر تحت درجة 9° م يؤدي الى تكوين كميات كبيرة من السم .

أوضحت الدراسة الحالية (جدول 1) الى عدم وجود السم بالانسجة المحيطة ببقع التفعن ذات الاقطار 1 و 2 سم تحت الدرجات الحرارية 9 و 23 م°،

و 1 و 2 و 3 سم تحت الدرجة الحرارية 18° م ، في حين وجد السم في الانسجة الواقعة خارج الانسجة المتعفنة وبكميات تراوحت من 0.3 – 6.3 مايكروجرام باتيولين /جم نسيج ، وهذا يشكل نسبة اقصاها 19 ٪ من مجموع سم الباتيولين في الانسجة المتعفنة تنتشر الى الانسجة السليمة المظهر ، وهذا يدل على ان السم لايمكن ازالته من الثمار المتعفنة عند ازالة الانسجة المتعفنة فقط ، في حين ذكر بيوكانان (16) و آخرون ولوفيت و آخرون (17) الى ان السم ينفذ الى الانسجة السليمة بكميات قليلة جدا لا تتعدى 2٪ من مجموع السم المنتج .

ان انتشار السم الى الانسجة السليمة المظهر والمحيطة للانسجة المتعفنة يمكن تفسيره الى وجود مسافات بينية في انسجة الثمار تسمح الى انتشار السم أو الى نمو الخيوط الفطرية التي تفرز السم ، حيث تم عزل الفطريات من الانسجة السليمة المظهر الواقعة حول منطقة التعفن .

References

1 - Collee, J.S. 1976. Applied Medical Microbiology. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK.

2 - Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelbery, E.N.1987. Review of Medical Microbilogy. 17th. ed. Prentice - Hall International Inc. U.S.A.

3 - Mims, C.A., Playfair, J.HL., Roitt, I.M., Wakelin, D. and Williams, R. 1993. Medical Microbiology. Mosby, London.

4 - Woodward, R.B. and Singh. G. 1949.The structure of patulin. J.Am. Chem. Soc 71:750.

5 - Lovett, J. and Thompson, R.G.1978. Patulin production by species of Aspergillus and Penicillium at 1.7, 7.2 and 12.8C. J. Food Prot., 41(3): 195.

6 - Ciegler, A., Detroy, R.W. and Lillehoj, E.B.1971. Patulin, Penicillic acid and other carcinogenic lactones. In Microbial Toxins, V1, ed. by Ciegler, A., Kadis, S. and Ajil, S.J. PP. 409 - 434. Academic Press, N.Y., London.

7 - Khilbas, J.S. 1980. Investigation the presence of patulin on apples and some foodstuff. M.Sc. Thesis. college of Science, Univ. of Baghdad. Iraq.

8 - Moreau, C. 1979. Moulds, Toxins and Food. John Wiley and Sons. N.Y.

9 - Gattani, M.L. 1957. Studies on the control of damping off of safflower with antibiotics. Plant Dis. Rept. 41:160.

10 - Al-Atabee, J.S. and Al-Rubaiee, A.A. 1996. The effect of Patulin mycotoxin on Ipomoea cairica (Convolvulaceae). Tech. Res. J. 9(32):55.

11 - Lindroth, S. and Niskanen, A. 1978. Comparison of potential patulin hazard in home made and commercial apple products, J. Food Sci., 43(2): 446.

12 - Thurm, V., Paul, P. and Koch, C.E. 1979. On the hygienic significance of patulin in foods. Part II. On the occurrence of patulin in fruit and vegetable. Nahr. Chem. Biochem. Microbiol. Technel. 23(2):131.

13 - Norstadt, F.A. and McCalla, T.M.1968. Phytotoxic substance from a species of Penicillium. Science 140:410.

14 - Christopher, Y.J. 1979. Fluorescence detection and determination of patulin by TLC of its amiline imine. J. Environ. Sci. Health. B14(1):15.

15 - Northolt, M.D., Van Egmond, H.P. and Paulsch, W.E.1978. Patulin production by some fungal species in relative to water activity and temperature. J.Food Prod, 41(11):885.

16 - Buchanan, J.R., Sommer, N.F., Fortlage, R.J., Maxi., E.C., Mitchell, F.G. and tlsieh, D.P.H. 1974. Patulin from Penicillium expansum in store fruits and pears. J.Am. Soc. Hort. Sci. 99: 262.

17 - Lovett, J., Thompson, R.G. and Boutin, B.K. 1975. Trimming as means of removing patulin from fungus - rotted apples. JAOAC. 58(5):909.

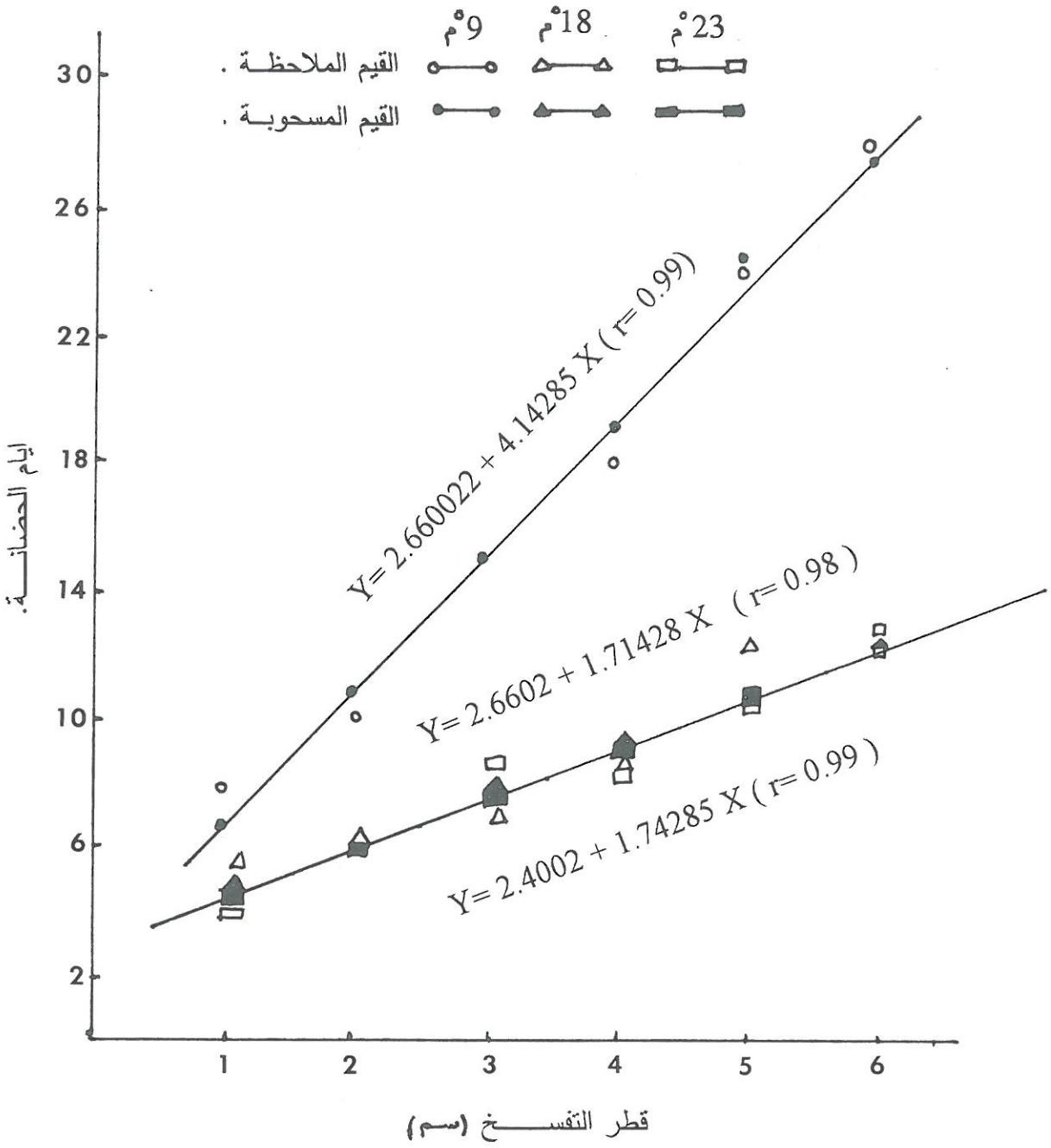
18 - Sommer, N.F., Buchanan, J. R. and Fortlage, R.J. 1974. Production of patulin by Pencillium. expansum. Appl. Environ. Microbiol 20(4):589.

جدول : تأثير درجة الحرارة علي انتاج سم الباتيولين المتكون من قبل فطر Penicllium على ثمار التفاح ضرب ستاركنك ولشز .

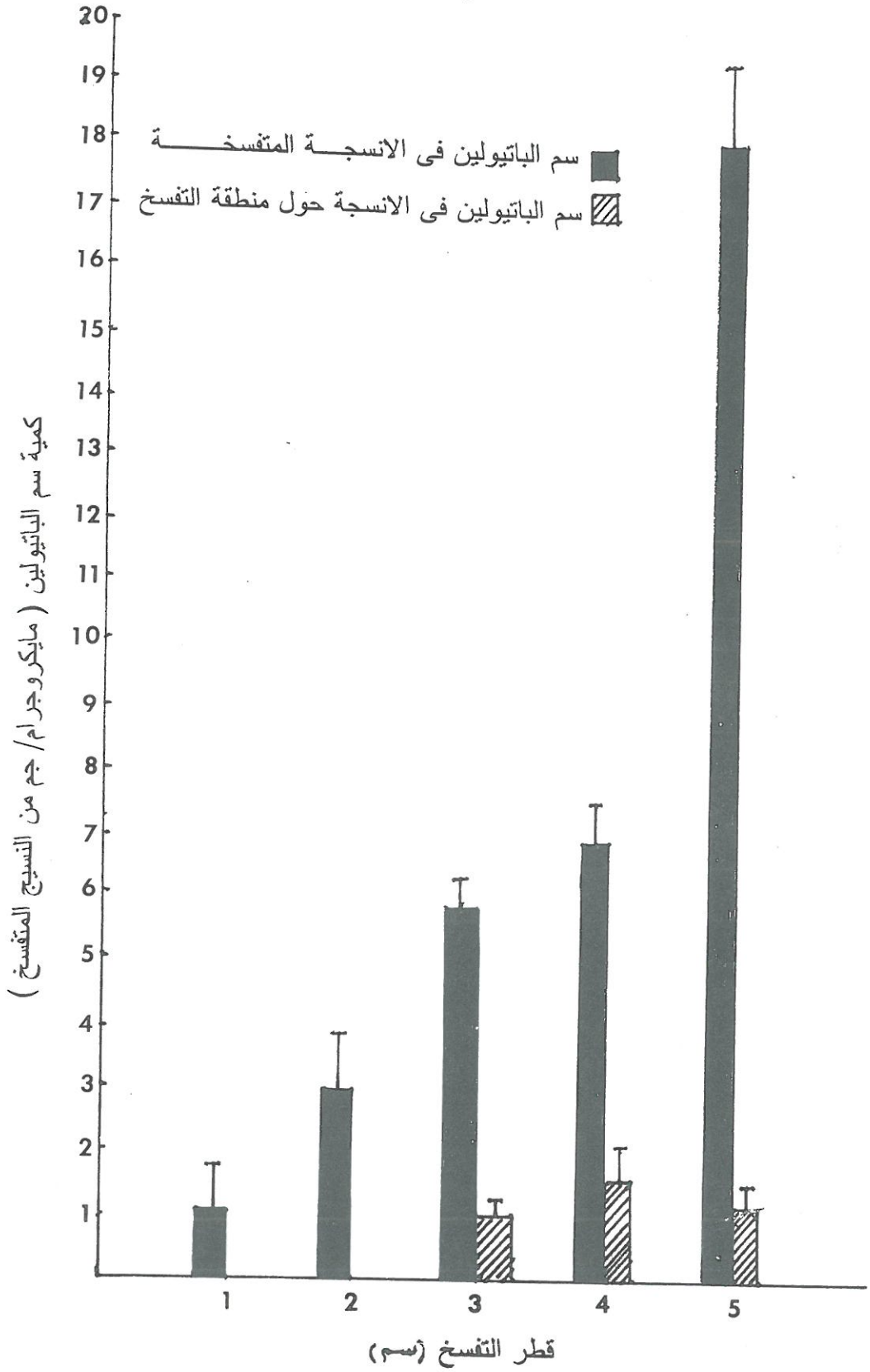
درجة الحرارة (م°)	قطر التعفن(سم)	كمية سم الباتيولين في النسيج المتعفن (مايكروجرام/جرام)	كمية سم الباتيولين في النسيج حول المتعفن (مايكروجرام/جرام)
9	1	2.9× أ	0.0 أ
	2	3.4 أ ب	0.0 أ
	3	5.0 أ ب ج	0.9 أ ب
	4	9.2 هـ	0.9 أ ب
	5	18.3 ز	3.1 د هـ
	6	32.0 ح	6.3 و
18	1	4.2 أ ب	0.0 أ
	2	4.7	0.0 أ
	3	5.3 ب ج د	0.0 أ
	4	9.1 هـ	0.3 أ ب
	5	11.9 و	3.0 د هـ
	6	12.4 و	3.7 هـ
23	1	5.0 أ ب ج	0.0 أ
	2	7.0 ج د هـ	0.0 أ
	3	7.0 د هـ	1.0 أ ب ج
	4	8.4 هـ	1.4 ب ج
	5	8.5 هـ	2.2 ج د
	6	8.6 هـ	3.0 د هـ

كل رقم يمثل متوسطا حسابيا لـ 20 مكررا لكل تجربة . كررت التجربة ثلاث مرات .

لا توجد فروقا معنوية بين البيانات التي تشترك بنفس الحرف و التي تقع ضمن العمود الواحد حسب اختبار (Fعند مستوى احتمال 5٪ .



شكل 2- العلاقة بين قطر التعفن وعدد ايام الحضانة عند تلقيح ثمار التفاح ستاركنك دلشر بالفطر Penicillium expansum .


سم الباتيولين فى الانسجة المتفسخة
سم الباتيولين فى الانسجة حول منطقة التفسخ
كمية سم الباتيولين (مايكروجرام/ جم من النسيج المتفسخ)
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
1
2
3
4
5
قطر التفسخ (سم)