مجلة جامعة مصراتة للعلوم الزراعية
Journal of Misurata University for Agricultural Sciences
المجلد الثاني – العدد الأول – ديسمبر 2020
ISSN 2708-8588

عزل و تعريف الفطريّات المصاحبة من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* وتقدير السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) في عيّنات الزّبيب في منطقة طرابلس (دراسة أوّليّة)

المهدي أحمد ساسي[1*] ،سوسن الطّاهر الفيتوري[1]، الطاهر أحمد أبوحليقة[2]، محمد أحمد الرياني[3]، أحمد عمران تارسين[4]

[1]قسم علوم وتقنية الأغذية –كلّيّة الزّراعة – جامعة طرابلس ، [2]قسم وقاية النّبات –كلّيّة الزّراعة – جامعة طرابلس

[3]قسم النّبات –كلّيّة العلوم – جامعة الزنتان ، [4]مركز الرّقابة والتّفتيش على الأغذية والأدوية – فرع طرابلس

almahdi_sassi@yahoo.com

استلم البحث في 23/9/ 2020 وأجيز البحث في 2020/11/28 https://doi.org/10.36602/jmuas.2020.v02.01.06

الملخص

استهدفت هذه الدراسة الاولية تقدير محتوى الرطوبة وعزل والتعرف على بعض الفطريات التابعة لجنس *Aspergillus* و *Pencillium* المصاحبة في تسعة عشرة (19) عينة من الزبيب (10محلية و 9 مستوردة) المسوقة بمنطقة طرابلس وضواحيها، ليبيا. العينات تم اختيارها عشوائيا من عدة اسواق متفرقة بالمدينة. تضمنت الدراسة الكشف عن وتقدير السم الفطري الاوكراتوكسين (أ) المحتمل تواجده بالعينات المختارة باستخدام تقنية انزيم الربط المناعي. اشارت النتائج بان العينات المستوردة قد سجلت ادنى محتوى من الرطوبة مقارنة بالعينات المحلية (9.30 % و 20.51% على الترتيب). عينتين من الزبيب المحلي كان محتوى الرطوبة بهما اعلى من 18%.

أما فيما يتعلق بالفطريات المعزولة فقد تم الحصول على 76 عزلة من جميع العينات. وبناء على الخصائص المورفولوجية والمزرعية فقد تم التعرف على 4 انواع تابعة لجنس *Aspergillus* بينما 3 انواع كانت تابعة لجنس *Pencillium*.

باستخدام تقنية الاليزا دات الحد الادنى من الكشف (اعلى من 1.25نانوغرام/غرام)، فقد اشارت النتائج ان 10 عينات من الزبيب (26.35%) من اجمالي العينات احتوت على السم الفطري الا وكراتوكسين (أ) بمتوسط تركيز 3.10 نانوغرام/غرام.باستثناء عينتين من الزبيب المحلي دات محتوى رطوبة اعلى من 18%، فان نتائج هذه الدراسة كانت متوافقة مع المواصفة اللّيبيّة رقم 683-2013 الخاصّة بالحدود القصوى للسّموم الفطريّة في الأغذية والأعلاف وكذلك مطابقة للمواصفة القياسيّة لهيئة دستور الاغذية للزبيب رقم 67-1981.

الكلماتالمفتاحية: الأوكراتوكسين(أ) – الزّبيب – تقنية أنزيم الرّبط المناعيّ *Penicillium* spp - *Aspergillus* spp.

1. المقدمة

الزّبيب منتج يجهّز من العنب السليم المجفّف من الاصناف التي تتوافق مع خصائص *Vitis vinifera* L والتي تمت معالجتها أو تجهيزها بطريقة ملائمة من اجل الاستهلاك المباشر في شكلٍ قابلٍ للتسويق وقد يُغلّف بمكونات اختياريّة مناسبة أو من دون ذلك ويكون الزّبيب خالياً من الشوائب منزوع العنق والقلنسوة و يمكن إزالة البذور منه ميكانيكياً بالنسّبة للأنواع المحتوية على ألبذور ومجهّز من أعناب تامّة النّضج على الوجه ألصحيح ويختار الزّبيب من أنواع العنب ذات المحتوي السّكري المرتفع واللّبّ المتماسك من دون ألبذور ويُعَدُّ العنب الأبيض بأنواعه المختلفة من أفضل أنواع العنب الصّالحة لصنع ألزبيب لكونه يمتاز بقشرته الرّقيقة ونكهته ألمرغوبة ويجفّف العنب في الشّمس أو في الظلّ بطرق خاصّة أو باستخدام مجفّفات خاصّة (مواصفات الدستور الغذائي للزبيب،67 -1981).

أكّدت العديد من الدّراسات إمكانيّة تلوّث الفواكه الجافّة، مثل الزّبيب بالفطريّات خلال السّلسلة الغذائيّة لاحتوائها على نسبة عالية من الرُّطوبة والسّكّريّات، وبالتّالي إمكانية إنتاج سموم فطريّة (Hakobyan et al., 2017) و استهلاك هذه المنتجات الغذائيّة يشكل خطراً على صحّة الإنسان والحيوان، و هناك تقارير عديدة في أماكن كثيرة من العالم تفيد بأنّ هناك تسمّم للأوكراتوكسين (أ) بتركيزات مختلفة وهذا يدلّ على الانتشار الواسع لتعرّض الإنسان للسّموم الفطريّة وقد أمكن تقدير تركيزات هذا السّمّ في العديد من الفواكه الجافّة (Heshmati et al., 2017).

السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) عبارة عن منتج أيض ثانويّ سامّ ذي وزن جزيئيّ منخفض (403.8) صيغته الجزيئيّة (C_{20} H_{18} O_6)، ثابتة حراريّا نسبيّا، ودرجة انصهاره 169°م، يذوب في المذيبات العضويّة، مثل: الكلوروفورم، والميثانول، وقابل للذّوبان في محاليل البيكربونات المائيّة المخففة، وقليل الذّوبان في الماء (Malir et al., 2016). ينتج من قبل فطريّات جنس *Aspergillus* والّتي تشمل أنواعاً مختلفة، أهمها: *A. carbonarius A. ochraceus* ، وفطرة *A. niger* في المناطق الحارّة و فطريّات جنس *Penicillium*، والّتي تشمل أنواعاً عديدة، مثل: *P. verrucosum*، *P. viridicatum* في المناطق الباردة، وتُعَدُّ هذه الفطريّات من الملوّثات الرّئيسة للحبوب ومنتجاتها، والفواكه الجافة، والتوابل، والقهوة (Pitt et al., 2013).

في دراسة عن عزل الفطريّات المصاحبة لبعض الأغذية المحلّيّة والّتي تشمل عيّنات من الزّبيب في أسواق محافظة بابل بالعراق بيّنت التّلوّث بالفطر *Aspergillus niger* وبنسبة 66.6% و فطريّات جنس *Penicillium* وبنسبة 40% (العبودي وآخرون 2015). كَمَا أوضحت الدراسة لعدد 26 عيّنة من الزّبيب المجفّف في اليونان أنّ 100% من العيّنات تحتوي على السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) وبمدى تركيز 0.8 – 100 نانوجرام/جرام وأنّ 18 عيّنة (69.23 %) تحتوي على تركيز أعلى من 10 نانوجرام/جرام (Kollia et al., 2014).

تهدف هذه الدّراسة الأوليّة إلى عزل و تعريف الفطريّات المصاحبة من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* وتقدير الرُّطوبة وتركيز السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) في عيّنات الزّبيب المتوفّر في الأسواق المحلّيّة بمنطقة طرابلس وضواحيها.

2. المواد وطرق العمل

1.2. تجميع العيّنات

العيّنات المستخدمة في هذه الدّراسة اشتملت على عدد 38 عّينة من الزّبيب المجفّف، تتكوّن من 19 عّينة محلّيّة ليبيّة المنشأ، وعدد 19 عّينة مستوردة (9 عينات إيرانيّة و 10 عينات تركيّة المنشأ) متداولة في الأسواق المحلّيّة وصالحة للاستهلاك البشريّ حسب تاريخ الإنتاج والصّلاحيّة.

جمعت هذه العّينات عشوائيّاً من الزّبيب المجفّف المتوفّر في الأسواق المحلّيّة بمنطقة طرابلس و ضواحيها في الفترة من بداية أكتوبر 2015 إلى أبريل 2016 وبوزن لا يقل عن 250 جرام تقريبا لكل عّينة، وحفظت العّينات في أكياس بلاستيكية على درجة حرارة الثلاجة إلى حين استخدامها.

2.2. العزل والتعرف على الفطريات

عُزلت الفطريّات المصاحبة لعّينات الزّبيب المجفّف بطريقة التّلقيح المباشر (Direct Plate Method) لعدد 19 عّينة (10 عّينات محلّيّة و 9 عّينات مستوردة) أُختيرت عشوائيّاً من إجماليّ عدد 38 عينة عُقّمت سطحيّاً باستخدام محلول هيبوكلوريد الصّوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقتين ثم غُسلت بالماء المقطّر المعقّم مرّتين يتبعه التّجفيف بوضعها على ورق التّرشيح وتلقيحها مباشرة على أطباق بتري تحوي الوسط المغذّي أجار دكستروز البطاطس (PDA) والذي يحتوي على المضاد الحيوي الكلورومفينيكول لمنع أي نمو بكتيري وذلك بزراعة 4 إلى 7 حبوب في كل طبق و بعدد مكررين لكل عينة وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25°م لمدة تتراوح من 4 - 9 أيام وقبل أنّ يتداخل النّمو الفطري أُجريت عمليّة النّقل من كل مستعمرة فطريّة تظهر بصورة مستقلّة حيث نقلت الفطريّات باستخدام إبر العزل في ظروف معقمة إلى أطباق جديدة تحتوي على الوسط الغذائيّ أجار خلاصة الشعير (MEA) وحُضنت على درجة حرارة 25°م لمدة 7 أيّام وصولاً إلى مزارع نقيّة (Hakobyan et al., 2017; Malir et al., 2016).

تمّ فحص وتعريف الفطريّات من خلال دراسة الخصائص التّركيبيّة والشّكل الظّاهريّ و المجهريّ الدّقيق، باستخدام المجهر الضّوئيّ و التّعرّف على الشّكل الهيفيّ والوحدات التّكاثريّة الجنسيّة واللاجنسيّة للفطريّات بتنميتها على الأوساط التفريقيّة، والاستعانة بمفاتيح التّعريف بالمراجع العلميّة المتخصّصة حسب الطّرق المعتمدة في وصفها و تعريفها.

(Samson et al., 2010; Pitt & Hocking, 2009; Ellis et al., 2007; Pitt 1979; Raper & Fennell, 1965; Moubasher, 1993).

ومن تم حساب نسبة التواجد أو الظهور للفطريات المعزولة (العبودي وآخرون 2015) وفقا للمعادلة التالية

$$\text{نسبة التواجد او الظهور }\% = \frac{\text{عدد العزلات لكل نوع}}{\text{العدد الكلي لجميع العزلات}} \times 100$$

3.2. تقدير الرُّطوبة

قدرّت الرُّطوبة لعدد 19 عّينة أُختيرت عشوائيّاً (10 عّينات محلّيّة و 9 عّينات مستوردة) لوزن معلوم من العينة (5-10 جرام) باستخدام الفرن عند درجة حرارة °105م±°2م لمدّة 4 - 7 ساعة وإلى حين ثبات الوزن Lokhande & Sahoo, 2016).

4.2. استخلاص وتقدير السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ)

تعتمد طريقة استخلاص وتقدير السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) باستخدام تقنية أنزيم الرّبط المناعيّ (ELISA) حسب الطّريقة الموصي بها من قبل الشّركة المصنّعة R-Biopharam AG, Germany باستخدام (Rida Screen OchratoxinA30/15 kit)

أُجْرِيَت عملية الاستخلاص بمعامل قسم علوم وتقنية الأغذية بكلّيّة الزّراعة جامعة طرابلس، والتقدير بمعامل مركز الرقابة والتفتيش على الأغذية والأدوية بطرابلس ليبيا لعدد 38 عّينة من الزّبيب، وذلك بأخذ 5 جرامات من العّينة، أُضيف إليها 100 مل من كربونات الصوديوم الهيدروجينية بتركيز 0.13M عند pH 8.1 ونقلت إلى جهاز هزّاز لمدة 15 دقيقة لتجانس العّينة، بعد ذلك أُجريت عمليّة التّرشيح باستخدام ورق ترشيح (Whatman No. 1).

أُخذَ من الرّشح حجم 50 ميكرو ليتر وحُقِنت في الثّقوب المخصّصة للكشف وأُستكملت التّجربة حسب الطّريقة الموصي بها من قبل الشّركة المصنّعة، و تّم قياس نسبة الامتصاص عند طول موجيّ 450 نانومتر باستخدام جهاز الطّيف الضوئيّ الخاصّ بتقنية أنزيم الرّبط المناعيّ، وذلك بقراءة نسبة الامتصاص للمحلول القياسيّ والعّينة بعد الحصول على منحنى المعايرة باستخدام تراكيز عياريّة مختلفة للسّمّ الفطريّ (0، 50، 100، 300، 900، 1800 نانوجرام/ كيلوجرام)، ومن ثّم حساب تركيز السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ).

5.2. تصميم التجربة والتحليل الاحصائي

حللت بيانات التجربة إحصائيا باستخدام برنامج التحليل الاحصائي Statistical Analysis System (SAS, 2002) وفقا لاختبار t في مجاميع (Snedecor and Cochran, 1980).

3. النتائج والمناقشة

أُجري الكشف الظاهريّ لعّينات الزّبيب المستخدمة في هذه الدراسة، وأَظهرت نتائج الكشف أنّها مجهّزة من عّينات تامة النّضج على الوجه الصّحيح حسب ما تبيّن من اللّون والقوام وخالية من الشّوائب، والأعناق، والمواد النّباتية الغريبة، ومن أي رائحة كريهة، ومتجانسة في الحجم.

أوضحت نتائج العزل و التعرّف للفطريّات المصاحبة من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* لعدد 19 عيّنة (10 عيّنات محليّة و 9 عيّنات مستوردة) أُختيرت عشوائيّاً من العيّنات المستخدمة في هذه الدّراسة من الزّبيب المتوفر في الأسواق المحليّة بمنطقة طرابلس وضواحيها الحصول على عدد 76 عزلة ويتكون إجماليّ هذه العزلات من 7 أنواع فطريّة منهم:4 أنواع تتبع لجنس *Aspergillus* وبنسبة تواجد 76.68%، و ثلاثة أنواع تابعة لجنس *Penicillium* بنسبة تواجد 23.32%، وكانت أعلى نسبة تواجد للفطريّات المعزولة من جنس *Aspergillus* للفطر *A. niger* وبنسبة 43.36% وأقل نسبة تواجد سجلت كانت للفطرين *A. terreus* و *A. ochraceus* بنسبة 6.66% لكل منهما، كذلك كانت أعلى نسبة تواجد للفطريّات من جنس *Penicillium* للفطر *P. chrysogenum* وبنسبة 10% وأقل نسبة تواجد سجلت كانت للفطرين *P. megasporum* و *P. waksmanii* وبنسبة 6.66% لكل منهما (جدول 1).

جدول (1) الأنواع الفطرية المعزولة من عينات الزبيب المحلي والمستورد ونسبة التواجد او الظهور.

ت	النوع الفطري	نسبة التواجد او الظهور %
1	*Aspergillus niger* van Tieghem	43.36
2	*A. carbonarius* (Bainier) Thom	20
3	*A. ochraceus* Wilhelm	6.66
4	*A. terreus* Thom	6.66
5	*Penicillium chrysogenum* Thom	10
6	*P. megasporum* Orpurt and Fennell	6.66
7	*P. waksmanii* Zaleski	6.66
	المجموع	% 100

نتائج هذه الدّراسة تتفق مع بعض الدّراسات الأخرى حول العالم والتي كان من ضمن أهدافها معرفة الفطريّات المصاحبة من جنس *Aspergillus* و *Penicillium* لعّينات الزّبيب والتي ذكرت أنّ بعض هذه الأنواع التّي تمّ عزلها في هذه الدّراسة هي من أهمّ الأنواع الفطريّة المصاحبة للزّبيب والمحتمل إنتاجها للسّم الفطريّ الأوكراتوكسين (أ)، استنتجت دراسة عن الفطريّات السّامة والمصاحبة لعّينات من العنب جمعت من مناطق مختلفة في تونس بأن الأنواع الفطرية السائدة هي *A. niger* و *A. carbonarius* وبنسبة تواجد 75% و 22% على التوالي، وأكّد أنّ 3% و 97% من الفطريّات المعزولة منتجة للسّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) (Lasram et al., 2012). كما أوضح من خلال دراسة لتواجد الفطريّات المحتمل إنتاجها للسّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) لعدد 87 عيّنة جمعت من الأسواق العامّة ومصانع إنتاج الزّبيب الجاف عزل 27 نوعاً تتبع 5 أجناس فطريّة أهمّها فطريّات جنس *Aspergillus* وبنسبة تواجد 48 %، وأن الأنواع الفطريّة السّائدة هي *A. niger* و *A. carbonarius* و بنسب تواجد 73% و 59% على التوّالي (Hakobyan, 2015). كذلك أكّد الباحث في الدراسة نفسها لعدد 81 عيّنة من العنب الطّازج جمعت عشوائيّاً

إمكانيّة تلوث العنب في الحقل خلال مرحلة النّضج والحصاد بالفطريّات وبالتّالي إمكانيّة تواجد الفطريّات في الزّبيب المجفف حيث تم عزل 19 نوعاً تتبع 5 أجناس فطريّة منهم 8 أنواع تتبع جنس *Aspergillus* أهمها *A. niger* و *A. carbonarius* كذلك أكّدت دراسة عن الفطريّات المصاحبة لعدد 167 عّينة من الزّبيب الجاف المحليّ والمستورد في أرمينيا عزلهم لعدد 75 فطراً منهم 15 عزلة من النوع *A. niger* من ضمنها 6 عزلات سامّة ومنتجة للسّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) و 30 عزلة من النوع *A. carbonarius* منهم 20 عزلة سامّة ومنتجة للسّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) و 3 عزلات من النوّع *A. ochraceus* ضعيفة السّمّية بالإضافة إلى عزلات أخرى منتجة للسّمّ الفطريّ الأفلاتوكسين (Hakobyan et al., 2017). كذلك أظهرت نتائج تقدير الرُّطوبة لعدد 19 عّينة أُختيرت عشوائياً (10 عّينات محلّيّة و 9 عّينات مستوردة) أنّ مدى الرُّطوبة لعّينات الزّبيب المحلّيّة يتراوح ما بين 9.80 - 20.51% وبمتوسط رطوبة 14.71% وكان مدى الرّطوبة لعّينات الزّبيب المستوردة 9.30 - 13.40% وبمتوسّط رطوبة 11.13% على التوالي وأنّ أقل رطوبة سُجّلت في الزّبيب المستورد وأعلى رطوبة سُجّلت في الزّبيب المحليّ (جدول 2)، كذلك أوضحت النتائج أنّ عدد 2 عّينة (28%) من العّينات المحلّيّة المستخدمة لتقدير الرُّطوبة تجاوزت الحدود المسموح بها حسب مواصفات الدستور الغذائي للزبيب (مواصفات الدستور الغذائي للزبيب، 67 -1981) والتي تفيد بأنْ لا تتجاوز الرُّطوبة 18%، لأنّ ارتفاع الرُّطوبة في الزّبيب تعمل على إتاحة وسط ملائم لنمو الفطريّات وبالتّالي إنتاج تركيزات عالية من السّموم الفطريّة الضّارة للإنسان والحيوان (Hakobyan et al., 2017). وتجدر الإشارة هنا إلى أن أعلى تركيز للسّمّ الفطريّ في هذه الدّراسة سجل في عّينات الزّبيب المحليّ المرتفعة الرُّطوبة وهو 5.72 وبمتوسط تركيز 3.52 نانوجرام/جرام مقارنة برطوبة عّينات الزّبيب المستورد وأوضحت نتائج التّحليل الإحصائيّ لبيانات الرُّطوبة في عّينات الزّبيب المحليّ والمستورد أنّ قيمة مستوى المعنوية (*P*-value) كانت 0.010 مما يدلّ على وجود فروق عالية المعنويّة وربما يرجع هذا إلى اختلاف طرق التجفيف (Lokhande and Saho, 2016).. .

جدول (2) مدى ومتوسّط الرُّطوبة في عّينات الزّبيب المحليّ والمستورد.

العينة	عدد العّينات	المدى (%)	المتوسّط %
زبيب محليّ	10	20.51 – 9.80	1.10 ± 14.71
زبيب مستورد	9	13.40 -9.30	0.51 ± 11.13
الإجماليّ	19	20.51 – 9.30	12.92

كذلك أوضحت نتائج هذه الدّراسة لعدد 38 عّينة من الزّبيب مختلفة المصدر وجود الأوكراتوكسين (أ) في عدد 10 عّينات (26.35%) من إجماليّ العّينات المستخدمة وبتركيز يتراوح ما بين 2.50 - 5.72 نانوجرام/جرام، وبمتوسّط تركيز 3.10 نانوجرام/جرام عند معدل كشف أعلى من 1.25 نانوجرام/جرام ومن خلال مصدر العّينات أوضحت

النّتائج لعدد 19 عّينة محليّ أنّ 6 عيّنات تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) بتركيز يتراوح من 2.54-5.72 نانوجرام/جرام وبمتوسّط تركيز 3.51 نانوجرام/جرام والمستوردة لعدد 19 عيّنة أوضحت أنّ 4 عيّنات تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) بتركيز يتراوح ما بين 2.50 – 3.14 نانوجرام/جرام وبمتوسّط تركيز 2.68 نانوجرام/جرام (جدول 3).

جدول (3) مدى ومتوسّط تركيز السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) في عيّنات الزّبيب المحليّ والمستورد.

نوع العينة	عدد العينات	عدد العيّنات الموجبة للسّمّ	المدى (نانوجرام/جرام)	المتوسّط (نانوجرام/جرام)
محليّ	19	6 (31.57%)	2.54 – 5.72	3.51 ± 0.49
مستورد	19	4 (21.05%)	2.50 – 3.14	2.68 ± 0.15
الإجماليّ	38	10 (26.35%)	2.50 – 5.72	3. 10

نتائج هذه الدّراسة تتّفق مع بعض الدّراسات الأخرى حول العالم عن وجود السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) في الزّبيب المجفّف حيث أوضحت الدّراسة العلميّة لعدد 56 عيّنة من الزّبيب في الأسواق الصّينيّة جمعت خلال العام 2012 أنّ 33 عيّنة (58.9%) تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) بتركيز يتراوح ما بين 0.07 – 12.83 نانو جرام/جرام وبمتوسط تركيز 0.99 نانوجرام/جرام (Zhang et al., 2014). أوضحت دراسة في ولاية كاليفورنيا لعدد 40 عيّنة من الزّبيب المجفّف أنّ 37 عيّنة (92.5%) من العيّنات تحتوي على السّمّ الفطريّ وبتركيز يتراوح ما بين 0.60 – 11.40 نانوجرام/جرام (Palumbo et al., 2011). وفي دراسة أخرى لعدد 40 عيّنة من الزّبيب جمعت في 2009 – 2011 من الأسواق الإيرانيّة أوضحت أنّ 4 عيّنات تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) و بأعلى تركيز 2.99 نانوجرام/جرام (Feizy *et al.*, 2012). كذلك أوضحت دراسة لعدد 66 عيّنة جمعت في الفترة من أكتوبر 2012 إلى مارس 2013 بمقاطعة حمدان بإيران أنّ 39 عيّنة (59%) تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) بتركيز يتراوح ما بين 0.16 – 8.40 نانوجرام/جرام وبمتوسّط تركيز 2.98 نانوجرام/جرام (Heshmati & Nejad, 2015). و أكّدت دراسة لعدد 38 عيّنة لتقدير الأوكراتوكسين (أ) في الزّبيب أنّ 17 عيّنة (44.7%) تحتوي على الأوكراتوكسين (أ) بتركيز يتراوح ما بين 2.9 – 18.2 نانوجرام/جرام وبمتوسّط تركيز 7 نانوجرام/جرام، (Rahimi & Shakerian, 2013). وأجرت دراسة لتقدير تركيز السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) لعدد 50 عيّنة من الزّبيب المجفف جمعت من أسواق مختلفة في مدينة إسطنبول خلال الفترة من 2008 – 2009 أكّدت أنّ 46 عيّنه (90%) تحتوي على تركيز وبمدى 0.19 – 2.59 وبمتوسّط تركيز 1.15 نانوجرام/جرام (Akdeniz *et al.*, 2013). كما أوضحت دراسة لعدد 41 عيّنة من الزّبيب المجفّف جمعت من مناطق مختلفة غرب اليونان أنّ 30 عيّنة (73%) تحتوي على السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) وبمدى تركيز 0.1 – 98.2 نانوجرام/جرام وان 15% من العيّنات تحتوي على تركيز أعلى من 10 نانوجرام/جرام وهو

الحدّ الأقصى المسموح به في الاتّحاد الأوربي بالإضافة إلى ذلك وجود السّمّ الفطريّ الفومونيزين B_2 في 12 عيّنة (29%) وبمدى تركيز 7.1 - 25.5 نانوجرام/جرام (Perronea et al., 2013).

كذلك أوضحت نتائج التّحليل الإحصائيّ لتركيز السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين(أ) في عيّنات الزّبيب المحليّ والمستورد أنّ قيمة مستوى المعنوية (*P*-value) كانت 0.040 ممّا يدل على وجود فروق معنوية و ربّما يرجع ذلك الاختلاف إلى أنّ عيّنات الزّبيب المستورد معاملة باستخدام ثاني أكسيد الكبريت حسب البيانات التّوضيحيّة الموجودة على العبوّات مما قد يؤثّر على نشاط الفطريّات المصاحبة وإنتاج السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) كذلك إلى ارتفاع الرُّطوبة في الزّبيب المحليّ وطول فترة التجفيف الشمسي التي قد تصل الي 5 - 14 يوم والتي قد تساعد علي نمو الفطريات وإنتاج السم الفطري (Valero et al., 2005).

تُعَدّ نتائج هذه الدّراسة الاولية التّي تفيد بوجود الأوكراتوكسين (أ) في عيّنات الزّبيب مطابقة للمواصفة القياسيّة اللّيبيّة للحدود القصوى للسّموم الفطريّة (الأوكراتوكسين- أ) في الأغذية والأعلاف (المواصفة القياسيّة اللّيبيّة رقم683 - 2013) ومواصفة الاتحاد الاوربي لبعض ملوثات الأغذية (EC, 1881 - 2006) والتّي تشير إلى أنّ الحد الأقصى المسموح به من تركيز الأوكراتوكسين (أ) في الزّبيب لا يزيد عن 10 نانوجرام/جرام لكن لا يعني هذا عدم وجود أيّ تأثيرات لهذا السّم بحكم وجوده في بعض العيّنات بتركيزات منخفضة خاصة للأطفال حيث إن أكثر من 99 % من هذا السّمّ يرتبط مع بروتين الدّم وبالتّالي يضمن فترة نصف عمر بيولوجيّة طويلة تصل تقريبا إلى 35 يوماً (Poor et al., 2012). ويُعَدّ هذا السّمّ ذا تأثير مسرطن، وَ صُنِّفَ من قبل الوكالة العالميّة لأبحاث السّرطان في المجموعة B2 (مسرطن للحيوان ويحتمل أن يكون مسرطناً للإنسان) (IARC, 1993) وذا تأثيرٍ كلويّ (Nephrotoxic) و طفريّ (Genotoxicity) ويسبب تشوهاً خلقياً (Terato-genicity) وإخمادًا مناعياً (Immunotoxicity) (Mally, 2012)، وحيث ان الزّبيب يُستخدم في الحلويّات، وأغذية الأطفال، و منتجات الألبان، فان استهلاك هذه الأغذية بصفة عامّة وبتركيزات منخفضة من السّمّ الفطريّ الأوكراتوكسين (أ) ولفترة طويلة قد يؤثر على صحة الإنسان.

4. الخلاصة

تُعَدّ نتائج هذه الدّراسة الاولية لتقدير تركيز الأوكراتوكسين (أ) في عيّنات الزّبيب مطابقة للمواصفة القياسيّة اللّيبيّة للحدود القصوى للسّموم الفطريّة الأوكراتوكسين (أ) في الأغذية والأعلاف، و وجود هذا السّمّ الفطريّ يعد دليلاً على تلوّث العيّنات بالفطريّات خلال إحدى مراحل السلسلة الغذائيّة، و استهلاك هذه الأغذية بتركيزات منخفضة من السّم قد يؤثر على صحة الإنسان، وللأهميّة نوصي بإصدار مواصفات قياسيّة ليبيّة خاصة بالزّبيب، وتطويرها دوريا وإجراء المزيد من الدّراسات الشّاملة والمعمّقة باستخدام أكثر عدد من العيّنات ومن مناطق ومصادر مختلفة أخرى محلية ومستوردة وباستخدام طرق تحليل أكثر حساسية للكشف عن السّموم الفطريّة الآخري مثل الأفلاتوكسين، الفومونيزين التي قد تكون

مصاحبة للأوكراتوكسين وتطبيق الممارسات الزراعيّة الجيدة وإتباع قواعد التصنيع الجيد ونظام تحليل المخاطر وتطوير طرق حفظ الأغذية لمنع تواجد هذه السموم الفطرية خلال تجهيز وتصنيع المنتجات الغذائيّة خاصة التّجفيف والتغليف والتخزين وضرورة تطوير نظام المراقبة والتفتيش علي الأغذية ودراسة معدل الاستهلاك اليومي من السموم الفطرية وتوعية المستهلك بأخطار تواجد هده السموم الفطرية.

5. المراجع

العبودي، س، ع، م.، الحسيني، أ، م، ع.، و عبيد، ح، ج. (2015). عزل وتشخيص الفطريّات المنتجة لسّموم الأفلاتوكسين B_1 من بعض الأغذية المحلّيّة في أسواق محافظة بابل. مجلة جامعة بابل – العلوم الصرفة والتطبيقية، 3: 925 – 938.

المواصفة القياسيّة اللّيبيّة للحدود القصوى للسّموم الفطريّة (الأوكراتوكسين– أ) في الأغذية والأعلاف رقم 683 – 2013. المركز الوطني للمواصفات والمعايير القياسيّة– ليبيا.

مواصفات الدستور الغذائيّ للزّبيب رقم 67 – 1981. هيئة دستور ألأغذية – منظمة الأغذية والزراعة العالميّة.

Akdeniz, A, S., Ozden, S and Alpertunga, B (2013). Ochratoxin A in dried grapes and grape-derived products in Turkey. Food Additives and Contaminants. Part B, 4: 265 - 269.

Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R and Bartley, R (2007). Description of medical fungi. 2nd ed. Mycology, Women’s and children’s hospital unit. North Adelaide, Australia.

European Commission (EC). Commission regulation No; 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Union. L., 364: 1 - 25.

Feizy, J., Beheshti, H, R and Asadi, M (2012). Ochratoxin A and aflatoxins in dried vine fruits from the Iranian market. Mycotoxin Research. 4: 237 - 242.

Hakobyan, L, L (2015). Detection of toxicity of filamentous fungi isolated from dried vine fruit by biotest method. Biological Journal of Armenia. 67: 6 - 10.

Hakobyan, L., Grigoryan, K and Trchounian, K (2017). The dynamics of ochratoxigenic fungi contents through different stages of dried grape production. 40th World Congress of Vine and Wine, Bulgaria. 9: 1- 6.

Heshmati, A and Nejad, A, S, M (2015). Ochratoxin A in dried grapes in Hamadan province, Iran. Food Additives and Contaminants. Part B. 4: 255 - 259.

Heshmati, A., Zohrevand, T., Khaneghah, A, M., Nejad, A, S, M and Sant, A, S (2017). Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. Food and Chemical Toxicology. 106: 202 - 208.

International Agency for Research on Cancer (IARC). (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon - France. IARC Press, 56: 489 - 521.

Kollia, E., Kanapitsas, A and Markaki, P (2014). Occurrence of aflatoxin B_1 and ochratoxin A in dried vine fruits from Greek market. Food Additives and Contaminants. 7: 11 - 16.

Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorbel, A., Silar, P and Chebil, S (2012). Ochratoxin A and ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. Food Control. 25: 75 - 80.

Lokhande S, M and Sahoo A, K (2016). Effect of drying on grape raisin quality parameters. International Journal of Innovative Research in Science and Technology. 2: 86 - 95.

Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J and Toman, J (2016). Ochratoxin (A) 50 Years of Research. Toxins. 8: 1 - 49.

Mally, A (2012). Ochratoxin A and mitotic disruption: mode of action, analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. Toxicological Sciences. 127: 315 - 330.

Moubasher, A. H (1993). Soil fungi of Qatar and other Arab countries. Doha, Qatar. The Scientific and Applied Research Centre, University of Qatar, 566 pp.

Palumbo, J, O., Keeffe, T, L., Vasquez, S، J and Mahoney, N, E (2011). Isolation and identification of ochratoxin A-producing *Aspergillu*s section Nigri strains from California raisins. Letters in Applied Microbiolog. 52: 330 - 336.

Perronea, G., De Girolamoa, A., Sarigiannisb, Y., Haidukowskia, M, E and Viscontia, A (2013). Occurrence of ochratoxin A, fumonisin B_2 and black aspergilli in raisins from Western Greece regions in relation to environmental and geographical factors. Food Additives and Contaminants. Part A. 30: 1339 - 1347.

Pitt, J, I and Hocking, A, D (2009). Fungal and food spoilage. Springer. Verlag, USA.

Pitt, J, I., Taniwaki, M, H and Cole, M, B (2013). Mycotoxins production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing with emphasis on the achievement of food safety objectives. Food Control. 32: 205 - 215.

Pitt, J, I (1979). The genus *Penicillium* and its telemorpic states Eupeniciltum and Talarormyces. London Academic Press.

Poor, M., Kunsagi-Mate, S., Bencsik, T., Petrik, J., Vladimir-Knezevic, S and Koszeg, T (2012). Flavonoid aglycones can compete with ochratoxin A for human serum albumin: A new possible mode of action. Int J Biol Macromol. 51: 279 - 283.

Rahimi, E and Shakerian, A (2013). Ochratoxin A in dried figs, raisins, apricots, dates on Iranian retail market. Health. 5: 2077 - 2080.

Raper, K, B and Fennell, D, I (1965). The genus *Aspergillus*. Baltimore Williams and Wilkins, USA.

Samson, R., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J, C and Andersen, B (2010). Food and indoor fungi. CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands.

Snedecor, G, W and Cochran, W, G (1980). Statistical methods. Iowa State University Press, USA.

Statistical Analysis System 9.00 (2002). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Valero, A., Marın, S., Ramos, A, J and Sanchis, V (2005). Ochratoxin A-producing species in grapes and sun-dried grapes and their relation to ecophysiological factors. Letters in Applied Microbiolog. 41: 196 - 201.

Zhang, X., Li, J., Zong, N., Zhou, Z and Ma, L (2014). Ochratoxin A in dried vine fruits from Chinese markets. Food Additives and Contaminants. 7: 157 - 16.

Isolation and identification of associated fungi of Aspergillus and Penicillium genus and quantification of ochratoxin(A) in raisins samples in Tripoli Area (Preliminary study)

Almahdi Ahmed Sassi[1], Sawsen Altaher Alfetouri[1], Altaher Ahmed Abouhleqa[2], Mohamed Ahmed Alryani[3], Ahmed Omran Tarsean[4]

[1]Department of Food Sciences and Technology - Faculty of Agriculture - University of Tripoli
[2]Department of Plant Protection - Faculty of Agriculture - University of Tripoli
[3]Department of Botany - Faculty of Science - Al-Zentan University
Food and Drug Control and Inspection Center - Tripoli Branch[4]

almahdi_sassi@yahoo.com

https://doi.org/10.36602/jmuas.2020.v02.01.06 Received: 23/9/2020; Accepted: 28/11/2020

Abstract

This preliminary study aimed to determine the moisture content and isolation and identification of some fungi- genus of Aspergillus and Penicillium in 19 raisins samples (10 locals and 9 imported) randomly collected from different local markets in Tripoli city, Libya. The study included the detection and quantification of ochratoxin (A) that could be present in the selected raisins samples using enzyme-linked immunosorbent assay technique.

Results indicated that the imported samples recorded the lowest moisture content vs. local samples (9.30% and 20.51%, respectively). Study results indicated that only two "%" local raisins samples having more moisture content than 18%. As far as fungi isolates, 76 fungi isolates were detected in all samples. Based on morphological and cultural characteristics, four species of such isolates belong to the genus Aspergillus while 3 species belong to the genus Penicillium. Using ELISA technique with a detection limit higher than 1.25 ng/gram, results revealed that 10 raisins samples (26.35%) contained ochratoxin (A) with an average concentration of 3.10 ng/gram.

With the exception of two local c raisins samples that their moisture level was more than 18%, generally, results of this study were in confirm with Libyan Specification number 683-2013 set for the maximum permitted level of ochratoxin (A) in food and animal feed. In addition to codex standard number 67-1981

Keywords: Ochratoxin (A) - raisins – enzyme - linked immunosorbent assay - *Aspergillus* spp - *Penicillium* spp.