التلوث الفطرى لمسحوق القهوة العربية والكشف عن الأفلاتوكسينات المنتجة

1*منى مختار مليطان*2 إلهام الزريدى *3 شريفة ونيس*4 هند بادش
(1)، (2)، (3)، (4) قسم النبات، كلية العلوم، جامعة مصراته، مصراته، ليبيا
1*E-mail: muna.mlitan.6882@gmail.com
2*E-mail:elham.zazz@gmail.com

الملخص:
أجريت الدراسة لعزل وتعريف الفطريات الملوثة لستة أنواع من مسحوق القهوة العربية والشائعة في مدينة مصراته وهى(الكولومبية، الإيطالية ، البرازيلية حبهان، البرازيلية صافية ،السورية، الهندية) وذلك باستخدام طريقة التخفيف على وسط آجار البطاطس والدكستروز PDA ووسط تشابك دوكس آجارCDA .أظهرت النتائج أن كل عينات القهوة كانت ملوثة بالفطريات حيث وصل العدد الكلى للمستعمرات الفطرية 229×10^{-1} و68×10^{-3} مستعمرة على وسط تشبك دوكس أجارCDA وآجار البطاطس والدكستروزPDA على التوالى والتى تنتمى إلى 9 أجناس فطرية أغلبها تتبع صف الفطريات الزقيةAscomycetes . بينت النتائج بأن جنس Penicillium سجل أعلى نسبة ظهور على كلا الوسطين يليه Aspergillus niger, Aspergillus flavus. كما بينت نتائج الكشف بالأمونيا أن أغلب عزلات A.flavus منتجة للافلاتوكسينات ، بينما جميع عزلات الفطر A.niger غير منتجة للأفلاتوكسينات.
الكلمات المفتاحية: التلوث الفطرى، مسحوق القهوة العربية، الأفلاتوكسينات.

المقدمة

القهوة مشروب يعد من بذور البن المحمصة ،وتتميز حبوب البن الأخضر بأنها واحدة من أكثر المنتجات الزراعية قيمة في التجارة العالمية بعد النفط الخام [1،2]. ينتمى نبات البن Coffea إلى العائلة الفويه Rubiaceae ويضم نحو 500 نوع وتسمى معظم أنواع البن باسم المنطقة التى يزرع فيها أوالميناء الذى تصدر منه ، وأشهر أنواع البن الجنس العربى Coffea arabica وتعرف Arabica وهى السائدة في التجارة العالمية حيث تمثل نحو 90% من الانتاج العالمى للبن. وهناك نوع آخر يعرف بـ C.canephora ويمثل 9% من الإنتاج العالمي للبن وتعرف Robusta وهناك أيضا C.liberica ويمثل 1% من الإنتاج العالمى للبن، وتعتبر القهوة العربية من المحاصيل الاستوائية الهامة ، وتنتج البرازيل بمفردها نحو 8- 25 % من المحصول العالمى للبن ثم تأتى فيتنام وكولومبيا فى المرتبة التالية من حيث الإنتاج وتحتل القارة الأفريقية المرتبة الثانية في إنتاج بذور البن بعد أمريكا اللاتينية [3]. وتعتبر القهوة اليوم واحدة من المشروبات الأكثر شعبية في جميع أنحاء العالم وتستهلك في كثير من الدول لما لها من مذاق جيد بالإضافة الى احتوائها على نسبة عالية من الكافيين وهى المادة المنبهة في مشروب القهوة كما أن لهذا المشروب فوائد أخرى ترتبط بتسهيل عملية الهضم كما تحتوى على مضادات الأكسدة [4،5،6،7] وتأتى الولايات المتحدة الأمريكية في المرتبة الأولى بوصفها أكبر مستهلك للبن في العالم ، فهى تستهلك خمس ما ينتجه العالم سنويا ، يليها إيطاليا والبرازيل، بريطانيا ، فرنسا ، اليابان [3] .وبسبب ارتفاع الطلب وزيادة مبيعات مشروب القهوة في جميع أنحاء العالم تهدف معظم البلدان المنتجة للبن الحصول على منتج جيد الجودة وآمن من خلال تطبيق أنظمة مراقبة الأغذية على طول مراحل الإنتاج والتجارة .ومع ذلك فإن بعض العوامل لا يمكن التحكم فيها مثل الظروف البيئية والتغيرات الغير مرغوبة في خصائص حبوب القهوة[8] والتى تؤدى الى التلوث الفطرى لحبوب القهوة[9].

يحدث التلوث الفطرى في مـراحل مختلفة من النمو ، الحصاد ،التعبئة، النقل والتخزين [9]، كما أن ارتفاع المحتوى المائى داخـل البذرة والحرارة والرطوبة تهيئ الظروف الملائمة لنمو الفطر وإفـراز السموم [10] ، فقد أوضحوا [11] أن ظروف الجفاف الشديد أو الحرارة العالية وانخفاض رطوبة التربة قبل الحصاد يزيد مـن عـدد جـراثيم فطر A. flavus في الهواء مما يؤدى إلى ارتفـاع معـدل التلوث الفطرى لحبوب البن وربما تـراكم مستوى عـالى من السموم الفطرية . والسموم الفطرية هى مركبات أيضية ثانوية تنتج بواسطة الفطريات الخيطية الملوثة للعـديد مـن المنتجات الزراعية مثل حبوب القهوة [12]، وقد أوضحت العديد من الدراسات وجـود السموم الفطرية في حبوب القهوة [13،14،15،16] وتشمل الأفلاتوكسينات AFB_1,AFB_2 ,$AFG_1$and AFG_2 والأكراتوكسين A [16].وتفرز الأفلاتوكسينات بواسطة أنواع عديدة من جنس Aspergillus مثل A. flavus [16،11] وهى عالية السمية ،مسببة للسرطان إلى حد كبير ، ومن المحتمل أن تسبب في نقص المناعة وتأخر النمو والموت للإنسان والحيوانات المنزلية [17].

يعتبر التلوث الفطرى وإنتاج السموم واحدة من المشاكل ما بعد الحصاد والتى تؤثر على نوعية حبوب القهوة ومن المحتمل أن تقلل من جودة مشروب القهوة [18،19] ، وتشمل فطريات التخزين أساسا أنواع عديدة من

جنس Aspergillus , Penicillium والتى لا تغزو البذور عند الحصاد ولكن تسبب في تلوثها عند التخزين مما يؤدى إلى فشل الإنبات أو تلوث الأجنة أو تلف البذور بالكامل [18] .كما أظهرت قياسات الرطوبة النسبية في الحاويات أثناء الشحن بأن زيادة الرطوبة عـن الحـد المسموح به يسبب في تعفن الحبوب [20]. ان امتصاص الرطوبة من البيئة يمكن أن يصل إلى مستويات قد تسمح بنمو الأعفان [21]، فقد أوضحت دراسة على البذور المخزنة في درجات حرارة منخفضة وبمحتوى رطوبة أعلى من 16% ظهور أنواع عديدة من جنس Penicillium . ومن المعروف أن المحتوى الرطوبى في بذور القهوة بين 14-15.5% ولذلك فإن زيادة 0.2% عن هذا المعدل من المحتمل أن يحدث غزو لهذه البذور بواسطة فطريات الخزن والتى تلحق الضرر لهذه البذور [22] ، ولقد أوضحت نتائج العديد من الدراسات على حبوب القهوة المخزنة تحت ظروف تخزين مختلفة تلوثها بالفطريات بشكل رئيسى من أجناسAspergillus, Penicillium, Fusarium Mucor, [23، 24 ،25 ،26] ، و بينت نتائج دراسات أخرى أيضا أن أجناس Fusarium, Penicillium Aspergillus, تعتبر ملوثات طبيعية موجودة من الحقل إلى المستودع في ثمار وبذور البن [14،27].

- كما أثبتت دراسات عديدة على حبوب القهوة المحمصة والتى تم جمعها من الأرض ومن أشجار البن وعينات من مناطق إنتاج القهوة بأن الفطريات توجد كملوثات طبيعية على سطح حبوب البن وتشمل جنسين Penicillium. Aspergillus [28،29 ،30]. وبالرغم من أن معالجة حبوب البن الخام إلى مسحوق يمكن أن تقضي على الفطريات من خلال درجة التحميص الفعالة إلا أنه لا يتم التخلص من السموم الفطرية المنتجة تماما [21]، فقد أوضح [14] أن التلوث بالأفلاتوكسينات يكون عالى عندما تخزن حبوب القهوة المحمصة في ظروف صحية أقل وحرارة التحميص تكون منخفضة ،بينما اوضحت دراسات آخرى أن التحميص لفترة طويلة قد يخفض تركيز الأفلاتوكسينات [31،15]، و لذلك يعد تحسين جودة وسلامة حبوب البن أمرا ضروريا للحد من مشكلة السموم الفطرية والتى تشكل خطرا على الصحة العامة [32] فمنها ما يؤثر على الكبد أو الكلى أو القلب أو الأعصاب ومنها ماهو مسرطن [3].

أهداف البحث:.

يهدف البحث إلى عزل وتعريف الفطريات الملوثة لمسحوق القهوة التجارى والمتاحة في مدينة مصراته ، كما يهدف إلى تحديد مقدرتها على إنتاج الأفلاتوكسينات.

الجزء العملي Eexperimental Part

المواد وطرق البحث Materials and Methods :

1 -جمع العيناتSamples Collection ::- استخدمت في الدراسة ستة أنواع من القهوة العربية الشائعة الاستخدام والمستوردة في شكل حبوب ومن دول مختلفة وهي (الكولومبية ،البرازيلية حبهان ،البرازيلية صافية ،الهندية ،السورية ، الإيطالية).وقد تم شراؤها في صورة مسحوق من أحد المحلات التجارية المعروفة بمدينة مصراته ،حيث تم وزن 100جم من مسحوق القهوة لكل نوع على حده وحفظت في أكياس معقمة ومن ثم نقلت العينات إلى المعمل لإجراء التحاليل المطلوبة .

3- تقدير نسبة الرطوبة في عينات مسحوق القهوة العربية:.

تم تقدير النسبة المئوية للرطوبة لعينات مسحوق القهوة بطريقة التجفيف في فرن عند درجة 105م ،لمدة24ساعة في مختبر محطة مصراته للبحوث الزراعية.

-محلول الببتون الملحى أو مايسمى (Maximum Recovery Diluent(MRD:-

يستخدم هذا المحلول معمليا لاسترداد الكائنات الدقيقة من مصادر متعددة ويتركب من :

1جم ببتون Peptone ، كلوريد الصوديوم Sodium chloride 8.5جم،pH 7±0.2 عند درجة حرارة 25 م°، وتم تحضيره معمليا بإذابة 9.5 جم من الوسط في لتر ماء مقطر وخلط جيدا وعقم في جهاز التعقيم عند درجة حرارة 121 م° ولمدة 15 دقيقة .تم استخدامه لتنشيط مسحوق القهوة [32].

3-الأوساط الزراعية Culture media :-

أ- وسط أجار البطاطس والدكستروز Potato Dextrose Agar (PDA):-

حضر حسب الطريقة المذكورة في المرجع [33] وذلك بأخذ 200جم من مستخلص البطاطس بعد غسلها وتقطيعها إلى قطع صغيرة وضعت في دورق زجاجي ثم أضيف إليها لتر من الماء المقطر ، وغليت لمدة 20 دقيقة وبعدها تم هرس البطاطس ثم رشحت بواسطة قطعة شاش نظيفة ثم أضيف إلى الراشح 20 جم من الدكستروز و15 جم آجار وأكمل الوسط إلى 1 لتر بإضافة الماء المقطر وعقم بجهاز التعقيم عند درجة حرارة 121م° ولمدة 15-20 دقيقة، ثم برد إلى 45م° وأضيف له المضاد الحيوي(Amoxicillin)500mg/ L.استخدم هذا الوسط لعزل وتعريف الفطريات المدروسة.

ب-وسط تشابك دوكس أجار :-Czapek Dox Agar(CDA)

حضر الوسط تبعا لتعليمات الشركة المصنعة بإذابة 45.45 جرام من الوسط في 1 لتر من الماء المقطر بعدها عقم بجهاز التعقيم بدرجة 121 درجة مئوية لمدة 15- 20 دقيقة ثم برد إلى 45 م° بعدها أضيف إليه المضاد الحيوي Amoxicillin 500 mg/L. استخدم الوسط لغرض عزل وتعريف الفطريات .

ج- وسط مستخلص جوز الهند Coconut Extract Agar:-

حضر الوسط بوزن 100 جم من مبروش جوز الهند وأضيف إليه 300 مل من الماء المقطر وسخن لمدة 20 دقيقة بعدها تم ترشيحه باستخدام الشاش المعقم وأضيف إلى الراشح 15 جم أجار وأكمل الحجم إلى 1000مل ماء مقطر، بعدها عقم الوسط في جهاز التعقيم (Autoclave)عند درجة حرارة 121 درجة مئوية ولمدة 15-20 دقيقة ، استخدم هذا الوسط لغرض الكشف عن الأفلاتوكسينات [34].

4-عزل الفطريات Fungi Isolation:-

استخدمت طريقة التخفيف لعزل الفطريات من مسحوق القهوة حسب الطريقة الموصى بها في المرجع [32] ، حيث تم وزن 20 جم من مسحوق القهوة لكل عينة على حده ووضع في كيس بلاستك معقم وأضيف له 100مل من محلولMRD وخلط لمدة دقيقتين ،أخذ 1مل من المعلق ونقل إلى أنبوبة الاختبار وأضيف إليه 9مل من محلول MRD ليتم التركيز الأول10^{-1} ورج باستخدام جهاز Vortex لمدة 1دقيقة واحدة ،تم أجراء سلسلة من التخفيفات (10^{-1}،10^{-2}، 10^{-3})، ثم نقل 1مل من كل تخفيف (10^{-1}،10^{-2}، 10^{-3}) إلى أطباق بتري تحتوي على وسط الـ PDA وأطباق أخرى تحتوي على CDA وبمعدل ثلاث مكررات لكل طبق ، حضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 ±2 م° لمدة 14 يوما. وبعد الانتهاء من فترة التحضين تم تقدير العدد الكلي للمستعمرات النامية (Colony forming Units)(CFU) .

5-تشخيص الفطريات Fungi Identification:-

بعد التحضين شخصت العزلات النامية على الأوساط الغذائية وعرفت على أساس الصفات المظهرية والميكروسكوبية وصفات الجراثيم وفق ماتوفر لدينا من المراجع المتوفرة [35،36]. بعد التحضين والتعريف ،تم حساب النسبة المئوية للظهور والعدد الكلي للمستعمرات الفطرية وفقاً للمعادلات التالية:-

$$\text{النسبة المئوية للظهور \%} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهرفيها النوع الواحد}}{\text{عدد العينات الكلي}} \times 100$$

العدد الكلي للمستعمرات الفطرية = متوسط عدد المستعمرات × مقلوب عامل التخفيف

6- الكشف عن الأفلاتوكسينات باستخدام محلول:

تم الكشف عن قدرة Aspergillus flavus وAspergillus niger على إنتاج الأفلاتوكسين وذلك باستعمال وسط جوز الهند المحضر يصب في أطباق ذات قطر 8 سم ثم لقحت ثلاث مكررات بأقراص من عزلات الفطر النامية على الوسط PDA وبقطر 5ملم وبعمر أسبوع في مركز الطبق وكررت العملية على جميع العزلات ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 درجة مئوية ولمدة أسبوع . تم الكشف عن العزلات القادرة على إنتاج الأفلاتوكسين باستعمال محلول الأمونيا بتركيز 20% من خلال استعمال أوراق ترشيح مشبعة بمحلول في غطاء الطبق ثم حضنت الأطباق بطريقة مقلوبة لمدة أسبوع ،وبدرجة حرارة 25 درجة مئوية . إن حدوث تغير في لون المستعمرات من اللون الشفاف إلى الوردي أو الأحمر أو الأصفر أو البرتقالى يدل على قدرة العزلات على إنتاج الأفلاتوكسينات[34].

التحليل الاحصائى

حللت النتائج إحصائيا باستخدام برنامج Minitab حيث تم استخدام اختبار Chi squared لتحليل النتائج.

النتائج والمناقشة

جدول (1):- النسبة المئوية للرطوبة في عينات مسحوق القهوة

	نوع القهوة	نسبة الرطوبة
1	الإيطالية	% 3.07
2	الهندية	% 2.81
3	برازيلية حبهان	% 2.28
4	برازيلية صافية	% 2.21
5	الكولومبية	% 2.04
6	السورية	% 1.79

نلاحظ من خلال النتائج في الجدول(2) والشكل (1) أن أغلب الفطريات المعزولة على كلا الوسطين تنتمى إلى قسم الفطريات الأسكية Ascomycetes ،حيث ظهرت 9 أجناس فطرية وقد كان جنس Penicillium هو السائد في جميع عينات القهوة على كلا الوسطين حيث ظهرت عدة أنواع من هذا الجنس ،يليه جنس Aspergillus favus ،Aspergillus niger ، وهذا يتفق مع ماتوصل إليه [32] من خلال دراستهم لمسحوق القهوة التجارى في ماليزيا ،. كما تتفق مع العديد من الدراسات التى أوضحت أن Aspergillus و Penicillium من الملوثات الطبيعية للبن وتنتقل من الحقل إلى التخزين[37،38،27، 39] ، وبذلك فإن ظهور مستعمرات Penicillium وAspergillus في مسحوق القهوة الذى تمت دراسته هو مؤشر واضح على تلوث الهواء وقد يرتبط تلوث هذه الفطريات في منتجات القهوة بمعالجة حرارية غير مؤثرة أثناء التحميص أو بعد المعالجة بالحرارة أو أثناء التعبئة أو التخزين أو النقل أو بسبب الظروف البيئية الغير صحية[32].

كما نلاحظ من الجدول أيضاً ظهور مستعمرات جنس Cladosporium بنسبة 83.33% على وسط CDA ، ويعتبر هذا الجنس من ملوثات الهواء الشائعة ومن المحتمل أن تكون موجودة في جدار مبانى تصنيع القهوة وخاصة المبانى التى لم يتم تنظيفها وتعقيمها بشكل فعال [32].فالمواد عالية السليلوز تشجع من نمو CladosporiumوPenicilliumوأنواع Aspergillus [40،41]، كما تتفق تقريبا مع توصل إليه[43،42] بأن الفطريات الأكثر ظهورا في المبانى كانت جنس (96%) Penicillium و(89%) Cladosporium .

كما أوضح[44] أن جنس Cladosporium من المحتمل أن يلوث حبوب القهوة الجافة ولكن نمو هذا الفطر يثبط عند وجود Aspergillus و Penicillium و Fusarium وهذا قد يفسر عدم ظهوره على وسط PDA .

جدول (2):-النسبة المئوية للفطريات المعزولة من أنواع القهوة على وسط PDA ,CDA :

أنواع الفطريات	على وسط CDA	على وسط PDA
A.flavus	% 83.33	% 83.33
Penicillium spp.	% 100	% 83.33
A.niger	% 50	% 66.6
Rhizoctonia sp.	%16.66	%33.33
Cladosporium sp.	% 83.33	%0
Paecilomyces sp.	%16.66	%0
Alternaria spp.	%33.33	%0
Aspergillus ochraceus	%33.33	%0
Trichoderma sp.	%0	% 33.33
Chaetomium sp.	%0	% 33.33
sp. Fusarium	%0	%16.6

توضح الجداول (3-أ،3-ب ،3-ج) العدد الكلى للمستعمرات الفطرية على وسط CDA بطريقة التخفيف(10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}). نلاحظ من الجداول أن كل عينات مسحوق القهوة كانت ملوثة بالفطريات والعدد الكلى للمستعمرات على وسط CDA كان 229×10^{-1} مستعمرة ، حيث بينت نتائج اختبار Chi squared وجود

اختلاف واضح في نسبة التلوث الفطرى بين أنواع القهوة حيث كانت جميع قيم P-value في جميع التخفيفات أقل من 5% ، فقد سجلت القهوة البرازيلية صافية والسورية أعلى عدد للمستعمرات الفطرية في جميع التخفيفات، بينما كانت القهوة الإيطالية والبرازيلية حبهان والكولمبية الأقل تلوث. الأجناس الفطرية السائدة كانت Aspergillus, Penicillium, Cladosporium وتتفق هذه النتيجة تقريبا مع ماتوصل إليه [32]، حيث سجل فطر Cladosporim أعلى عدد للمستعمرات في كل التخفيفات إذ وصلت عدد مستعمراته في التخفيف الأول إلى 161×10^{-1} ، بينما سجل فطر A.ochraceus أقل عدد للمستعمرات الفطرية 1×10^{-1}.

جدول (3-أ):متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط CDA بطريقة التخفيف $\times10^{-1}$

المجموع	أنواع القهوة						أنواع الفطريات
	الايطالية	السورية	الهندية	البرازيلية حبهان	البرازيلي صافية	الكولومبي	
14	1	0	0	1	1	11	**Aspergillus flavus**
44	4	6	6	8	6	14	**Penicillium spp.**
4	1	2	0	1	0	0	**Aspergillus niger**
16	0	54	50	0	57	0	**Cladosporium sp.**
1	1	0	0	0	0	0	**Alternaria spp.**
4	0	0	0	4	0	0	**Rizoctonia sp.**
1	0	0	0	1	0	0	**Aspergillus chraceus**
22	**7**	**62**	**56**	**15**	**64**	**25**	**المجموعCFU**
Test=84.75 P-value=0.000							

جدول (3-ب): متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط CDA بطريقة التخفيف $\times10^{-2}$

المجموع	أنواع القهوة						أنواع الفطريات
	الايطالية	السورية	الهندية	البرازيلية حبهان	البرازيلية صافية	الكولولمبية	
4	2	1	0	1	0	0	Aspergillus flavus
32	4	7	5	0	11	5	Penicillium spp.
3	0	1	0	2	0	0	Aspergillus niger
98	0	3	31	0	33	0	Cladosporium sp.
2	0	0	0	2	0	0	Alternaria spp.
2	0	0	0	2	0	0	Paecilomyces sp.
1	0	0	0	0	0	1	Aspergillus chraceus
$10^{2}\times142$	6	4	36	7	44	6	المجموعCFU
Test=77.80 P-value=0.000							

جدول (3-ج): متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط CDA بطريقة التخفيف $\times10^{-3}$

المجموع	أنواع القهوة						أنواع الفطريات
	الايطالية	السورية	الهندية	البرازيلية حبهان	البرازيلية صافية	الكولومبي	
3	1	1	0	1	0	0	Aspergillus flavus
23	2	3	5	0	11	2	Penicillium pp.
2	1	1	0	0	0	0	Aspergillus niger
67	0	28	1	1	24	1	Cladosporim sp.
3	1	0	0	2	0	0	Alternaria spp.
1	0	0	0	1	0	0	Aspergillus ochraceus
$10^{3}\times99$	5	33	1	5	35	3	المجموعCFU
Test=64.45 P-value=0.000							

تظهر نتائج الجداول (4-أ،4-ب ، 4-ج) العدد الكلى للمستعمرات الفطرية على وسط PDA بطريقة التخفيف حيث كان العدد الكلى للمستعمرات أقل من عدد المستعمرات على وسط CDA في كل التخفيفات حيث وصل

في التخفيف الأول إلى 68×10^{-1} . كما نلاحظ أيضا أن عدد المستعمرات الفطرية في أنواع القهوة كان متقارب وبينت نتائج التحليل الاحصائى بأنه يوجد اختلاف طفيف ولكنه ليس معنوى لأن قيمة P-value أكثر من 5% سجل الفطر A.favus أكثر الفطريات سيادة حيث وصلت عدد مستعمراته إلى 37×10^{-1} مستعمرة ،بينما أقل المستعمرات عدداً كان فطرFusarium في التخفيف الثالث1×10^{-3}. فى حين نلاحظ عدم ظهور فطرCladosporium في جميع عينات القهوة.

جدول (4-أ): متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط PDA بطريقة التخفيف× 10^{-1}

أنواع الفطريات	أنواع القهوة						المجموع
	الكولومبية	البرازيلية صافية	البرازيلية حبهان	الهندية	السورية	الإيطالية	
Aspergillus flavus	6	6	0	10	6	9	37
Penicillium spp.	0	5	1	0	0	1	7
Aspergillus niger	4	0	0	6	0	0	10
ichoderma sp.	0	0	9	0	0	0	9
Rhizoctonia sp.	0	0	0	0	5	0	5
CFU المجموع	10	11	10	16	11	10	$10^{-1}\times68$
Test=2.41 P-value=0.790							

جدول (4-ب): متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط PDA بطريقة التخفيف× 10^{-2}

أنواع الفطريات	أنواع القهوة						المجموع
	الكولومبية	البرازيلية صافية	البرازيلية حبهان	الهندية	السورية	الإيطالية	
Aspergillus flavus	0	1	0	9	7	9	26
Penicillium spp.	1	1	0	0	0	0	2
Aspergillus niger	3	0	1	0	1	0	5
Trichoderma sp.	6	0	6	0	0	0	12
Chaetomium sp.	1	0	0	0	0	1	2
Rhizoctonia sp.	0	0	0	5	0	0	5
CFU المجموع	11	2	7	14	8	10	$10^{-2}\times52$
Test=9.62 P-value=0.087							

جدول (4-ج): متوسط عدد المستعمرات الفطرية من أنواع مسحوق القهوة على وسط PDA بطريقة التخفيف× 10^{-3}

أنواع الفطريات	أنواع القهوة						المجموع
	الكولومبية	البرازيلية صافية	البرازيلية حبهان	الهندية	السورية	الإيطالية	
Aspergillus flavus	0	0	0	1	5	5	11
Penicillium spp.	0	0	1	1	0	4	6
Aspergillus niger	1	0	0	0	1	0	2
Trichoderma sp.	4	0	0	0	0	0	4
Fusarium sp.	0	1	0	0	0	0	1
CFUالمجموع	5	1	1	2	6	9	$10^{-3}\times24$
Test=2.33 P-value=0.506							

بينت نتائج الكشف الكيميائى عن الأفلاتوكسينات من عزلات A.favus وA.niger باستخدام وسط جوز الهند بأن أغلب عزلات A.flavus كانت منتجة للسموم حيث حدث تغير في لون المستعمرات ، بينما جميع عزلات A.niger كانت غيرمنتجة للسموم الفطرية، وقد أوضحت العديد من الدراسات ظهور السموم الفطرية مثل الأفلاتوكسينات G_1,G_2,B_2,B_1 وPatulin و Sterigmatocystin في حبوب القهوة تحت ظروف

المعالجة والظروف البيئية المختلفة[15]، ومع ذلك أكثر السموم الفطرية التى درست في حبوب القهوة كان سموم Ochratoxin A الذى ينتج بواسطة A.niger و A.ochraceus [14 ،28، 31، 45]، إن إنتاج السموم الفطرية ومنها الأفلاتوكسين كنواتج أيض ثانوية تابعة للجنس Aspergillus لا تتكون في جميع حالات نمو هذه الأنواع ولا يعنى عزل هذه الفطريات وجود السموم فيها إلا ضمن ظروف بيئية محددة مثل ارتفاع الرطوبة مع درجات حرارة الملائمة [46].كما أوضحت نتائج دراسة [47]بارتفاع معدل التلوث الفطرى خلال المعالجة الرطبة و المعالجة الميكانيكية ،وأثناء عمليات التجفيف لحبوب القهوة ولكن لم تكن كل السلالات منتجة للسموم المسرطنة. كما بينت دراسة بأن التحميص لفترة طويلة قد يخفض تركيز الأفلاتوكسين ،ومع ذلك أوضحت نتائج دراسة أخرى بأن تحميص حبوب القهوة من المحتمل أن يسبب في تكوين مركبات متداخلة تؤثر على تشخيص الأفلاتوكسينات بواسطة الطرق التحليلية المعتادة، كما بينت الدراسة أن محتوى الكافيين في القهوة يرتبط مع تركيزات أقل من الأفلاتوكسينات في حبوب القهوة. بالإضافة إلى أن مجموعة متنوعة من القهوة من المحتمل أن تلعب دورا في خفض الأفلاتوكسينات وغيرها من السموم الفطرية في حبوب القهوة[13].

المراجع

1. Esquivel, P. and Jimenez, V.M. (2011). Functional properties of coffee and coffee by-products. Food Res. Int. Article in press .

2. Villanueva, C.M.(2006).Total and specific fluid consumption as determinants of bladder cancer risk. Int.J.cancer.118(8):2040-2047.

3. السماحي ،صلاح كامل ؛ شطا، أبوبكر؛ يوسف ،خالد محمد (2015) . تكنولوجيا الأغذية ،دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة ،الطبعة الأولى، عمان ، الأردن.

4. مصطفى، كامل مصطفى ، خليل، إبراهيم خليل (1999).تكنولوجيا النشا والسكريات والمنتجات الخاصة، المكتبة الأكاديمية، دار الفجر للنشر والتوزيع ،القاهرة.

5. Ramalakshmi, K., Rao,L. J. M., Takano-Ishikawa, Y. and Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. Food Chem. 115: 79-85.

6. Liang, N. and Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action Molecules.19: 19180-19208.

7. Gornas, P., Dwiecki, K., Siger, A. Tomaszewska-Gras, J., Michalak, M., and Polewski, K. (2016). Contribution of phenolic acids isolated from green and roasted boiled-type coffee brews to total coffee antioxidant capacity. Eur. Food Res. Technol. 242: 641-653.

8. Palacios-Cabrera,H., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C. and Iamanaka, B.T.(2004). The production of ochratoxinA by Aspergillus ochraceus in raw coffee at differentequilibrium relative humidity and under alternating temperatures. Food Cont. 15: 531-535.

9. Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, J.K.F., Frisvad, C.& Samson, R.A. (2008). Isolation , identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing Aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand. Int.J.Food Microbiol. 128:197-202.

10. الحساس ، فهد بن محمد (2011) . مبادئ سلامة الأغذية ، مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST، المملكة العربية السعودية .

11. Zhang,H., He,J., Li,B.,Xion,H.,Xu,W., Meng,X.(2011).Aflatoxin contamination and research in China. In: Torres-Pacheco I, editor.Aflatoxins-detection,measurement and control.[cited2013Apr 3].Available from:http://cdn.intechopen.com/pdfs/22030/ In Tech-Aflatoxin_contamination_and_research_in_China.pdf.

12. Culliao ,A.G.L. and Barcelo, J.M.(2015). Fungal and mycotoxin contamination of coffee beans in Benguet province, Philippines, Food Additives & Contaminants: Part A:32(2): 250-260

13. Soliman, K. (2005). Effect of variety, locality and processing of coffee beans on the detection and determination of aflatoxin. Int .J. Agric Biol. 7:5–10.
14. Bokhari, F.M.(2007). Mycotoxins and toxigenic fungi in Arabic coffee beans in Saudi Arabia. Adv. Biol. Res. 1:56–66.
15. Bokhari, F.M,& Aly, M.M. (2009). Evolution of traditional means of roasting and mycotoxins contaminated coffee beans in Saudi Arabia. Adv Biol Res. 3:71–78.
16. Oliveira, C.A.F., Bovo, F., Corassin, C.H., Jager, A.V, Reddy, K. R.(2013). Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. 2013. [cited 3 Apr 2013]. Available from: http://dx.doi.org/10.5772/51120.
17. USAID (2012). Technical Report: Value chain approach - aflatoxin (Groundnuts) Final Report. Gaborone, Botswana
18. Malaker,J.C., Rahman, M.M., Haque, M.S. and Malaker, S.K. (2008). Composition and diversity of tree species in Jaus and Beribaid bits of Madhupur Sal forest. Bangladesh J. Agric., 1: 51-57.
19. Barcelo, J.M ., Barcelo, R .C., Alvarez, A. A.(2017). Ochratoxin A, fungal contamination and antioxidant property of defective Arabica coffee in Benguet Philippines, Emir. J. food Agric., .29(1):10 -17.
20. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2006). Spotlight:Safercoffee.FAO.Magazine.onlineathttp:/*www.fa.org/ag/magazine/0607sp1.htm*.
21. Raters, M.& Matissek, R.(2008). Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. Mycotoxin Res.24:130-134.
22. Christensen, C.M. & Kaufman, H.H. (1969). Grain Storage:The Role of Fungi in Quality Loss. University of Minnesota Press, Minneapolis, USA.,ISBN-13: 9780816605187, Pages: 153.
23. Urbano, G.R., Taniwaki,M.H., Leitao, M.F.F and Vicentini, M.C. (2001). Occurrence of ochratoxin Aproducing fungi in raw Brazilian coffee. J. Food Prot.,64: 1226-1230.
24. Batista, L.R., Chalfoun, S.M. Prado, G., Schwan, R.F. and Wheals, A.E. (2003). Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (Coffea arabica L.).Int. J. Food Microbiol., 85: 293-300.
25. Abdullah Al-Abdalall, A. H. and Al Talib, E. J.(2012). Incidence and Distribution of Filamentous Fungi during Storage of Coffee Beans in Eastern Region,
26. Kingdom of Saudi Arabia, Int. J. Agric. Res., 7(2) : pp. 83-98.
27. lemessa, F. Abera, A. Aduga, G. and Garedew,W.(2015). Association of Mycoflora with coffee (Coffea arabica L.)Beans at limmu Coffee Plantation ،Southwestern Ethiopia .Plant pathol. J.,14 (3) :136-141
28. Silv, C.F., Schwan, R.F., Dias E.S. and Wheals, A.E. (2000). Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of Coffea arabica in Brazil. Int. J. Food Microbiol., 30: 251-260.
29. Taniwaki, M.H., Pitt, J.I., Teixeira, A.A. and Iamanaka,B.T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing Methods. Int. J.Food Microbiol., 82: 173-179.

30. Pardo, E., Marin, S. Ramos, A. J. and. Sanchis, V. (2004). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin a in green coffee from different origins. Food Sci. Technol., 10: 45-49.
31. Girma, A., Bayeta, B., Tesfaye, S., Endale, T. and Taye, K. (2008). Group discussions, synthesis and recommendations. Coffee diversity and knowledge. Proceedings of the 4th National Workshop Decades of Coffee Research and Development in Ethiopia, Ghion Hotel, Addis Ababa, Ethiopia, pp: 505-510.
32. Graziani, G., Santini, A., Ferracane, R., Ritieni, A. (2012). Microwave assisted extraction of ochratoxin A from roasted coffee beans: an alternative analytical approach. J. Food Res.1:121–127.
33. Abdul Rahim, S .H., Ayob, M. K. and Ramli, N. (2011) Fungal contamination of commercial coffee powder. Bandung Indonesia .
34. Collee,J.G., Fraser, A.G ; Marmion, B.P. and Simmons, A.(1996).Practical Medical Microbiology. Mackie and Macarthey pearson professional Limited.14th ed.
35. Satio,M. and Machida, S.(1999).Arapid identification method for aflatoxin producing strains A.flavus and A. parasiticus by ammonia vapor. Mycoscience,40:205-208.
36. المراغى، سعد شحاته محمد (1994). مقدمة في علم الفطريات ، منشورات جامعة عمر المختار، البيضاء، الطبعة الأولى.
37. Pitt, J.I. and Hocking, A. D. (2009): Fungi and food spoilage. Third Edition. Springer Science and Business Media, London, New York.
38. Mislivec, P.B., Bruce, V.R. & Gibson, R. (1983).Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. J. Food Prot. 46: 969-973.
39. Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. and Ueno, Y. (1997).Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. . Food Agric. Immunol.; 9: 77-83.
40. Bucheli, P. and Taniwaki, M.H. (2002). Research on the manutacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. Rev. Food Addit. Contam. 19: 655-665.
41. Gravesen, S., Nielsen, P.A., Iversen, R. & Nielsen,K.F. (1999). Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. Environ. Health Perspect 107: 505–508.
42. Karunasena, E., Markham, N., Brasel, T., Cooley،J.D. & Straus, D.C. (2001). Evaluation of fungal growth on cellulose-containing and inorganic ceiling tile. Mycopathologia, 150: 91–95.
43. Hunter, C.A., Grant, C., Flannigan, B. & Bravery,A.F. (1988). Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. Int. Biodeterior. 24: 81–101
44. Grant, C., Hunter, C.A., Flannigan, B. & Bravery, A.F. (1989). The moisture requirements of moulds isolated from domestic buildings. Int. Biodeterior.25: -259 284.
45. Magan, N. & Lacey, J. (1984). Effect of water activity,temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., 82: 83-93
46. Leoni, L.A.B, Furlani, R.P.Z, Soares, L.M, Oliveira, P.L.C. (2001).Ochratoxin A in Brazilian green coffee. Ciênciae Tecnologia de Alimentos Campinas. 21:105–107.
47. أحمد، محمد على والنواوى، محمد عبدالرزاق(1999). الفطريات الصناعية،الدار العربية للنشر.
48. Suarez-Quiroz, M., Gonzales-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud ,J.P.(2004). Study of ochratoxin A-producing strains in coffee processing. Int. J. Food Sci Technol. 39:501–507.

Fungal contamination of Arabic coffee powder and detection of aflatoxins produced

*(1)Muna , M. Mlitan * (2)) Elham , A. Elzredi (3)Sharifa wanes, (4)Hind Badish,
(1),(2),(3),(4)Faculty of science , plant department , Misurata University – Libya
1*E-mail: muna.mlitan.6882@gmail.com
2*E-mail:elham.zazz@gmail.com

Abstract:
This study was carried out to isolate and identify contaminated fungi of six types of Arabic coffee powder common in Misurata City, include(Colombian, Italian , Brazilian, Brazilian with Cardamom , Syrian and Indian coffee) using the Standard dilution plate mehod on Potato Dextrose Agar and Czapek Dox Agar . The results showed that all coffee samples were contaminated by fungi where the total number of fungal colonies reached to 229 $\times 10^{-1}$ and 68×10^{-1} colony respectively, which belonging to 9 genera mostly belong to Ascomycetes ,also results showed Penicillium spp recorded the highest percentage of appearance on both media followed Aspergillus flavus , Aspergillus niger . Ammonia test showed all isolates of A.flavus produced aflatoxins while, isolates of A.niger are non-productive for aflatoxins,

Key word: Fungal contamination, Arabic coffee , Aflatoxi