مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (6) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (6) 2015

تعريف بعض العزلات الفطرية من عينات تربة ملوثة بمياه الجفت

الدكتورة أميمة ناصر*
علا الشاخ**

(تاريخ الإيداع 18 / 6 / 2015. قبل للنشر في 8 / 11 / 2015)

□ ملخّص □

تعد منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط رائدة بإنتاج زيت الزيتون، وينتج عن عملية استخراج زيت الزيتون كمية كبيرة من المنتجات الثانوية السائلة، والتي تدعى بمياه الجفت (OMWW) لها تأثيرات بيئية مختلفة . في هذه الدراسة تم تعريف أربع عزلات من عينات تربة ملوثة بمياه الجفت ، وتتبع هذه العزلات أنواع عديدة من صف الفطريات الناقصة، وهي تتبع الأنواع:

Aspergillus flavus , Aspergillus terreus , Paecilomyces javanicus , Humicola sp.

وذلك بعزلها وتنقيتها على وسطي (PDA , CzA)، وذلك بالاعتماد على الصفات الشكلية والبيومترية وبالمقارنة مع الدراسات المرجعية.

الكلمات المفتاحية: تربة ملوثة ، مياه الجفت ، الفطريات ، الصفات الشكلية.

* مدرسة – قسم الوقاية البيئية (اختصاص أحياء دقيقة)– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
** طالبة دراسات عليا (ماجستير)– قسم الوقاية البيئية– المعهد العالي لبحوث البيئة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (37) العدد (6) 2015
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (37) No. (6) 2015

The definition of some fungal isolates from Samples of soil Polluted by olive mill wastewater

Dr. Omiema Nasser*
Ola ALshakh**

(Received 18 / 6 / 2015. Accepted 8 / 11 /2015)

□ ABSTRACT □

The Mediterranean region is world's leading olive growing area. A large amount of liquid waste results from olive oil extraction these wastewaters have a different effects an environmental . In this study, four fungal isolates from Samples of soil Polluted by olive mill wastewater ,this isolates follow to several types from deuteromycetes, they are follow to this types : *Humicola* sp.**,** *paecilomyces javanicus***,** *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus.* They isolated them on tow media (PDA, CzA) and identify them on colony character ,Biometric and compare them with reference studies.

Key word: Soil polluted , Olive Mill Wastewater, Fungi, Colony character.

***Assistant Professor- Department of Environmental Prevention (Microbiology) – Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Lattakia- Syria.**
****Postgraduate Student- Department of Environmental Prevention– Higher Institute for Environmental Research- Tishreen University- Lattakia- Syria.**

مقدمة :

تنتشر زراعة الزيتون بشكل واسع في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط، وتحتل المرتبة الأولى بزراعتها بإنتاجية تقدر بنحو (98%) من الإنتاج العالمي، ويبلغ إنتاج سوريا من زيت الزيتون بنسبة تقريبية تقدر بـ (4.9%) من الإنتاج العالمي محتلة المرتبة الخامسة عالمياً [1]

ينتج عن صناعة زيت الزيتون كمية كبيرة من المنتجات الثانوية الصلبة والسائلة، وما يصطلح تسميته بمياه الجفت Olive Mill Wastewater (OMWW)، حيث تختلف نوعية وكمية هذه المنتجات الثانوية تبعاً لعوامل عدة منها صنف الزيتون، نوع التربة، نظام الزراعة، عملية الإنتاج [2]. وتعد مياه الجفت سائل كثيف لونه بني داكن ذو رائحة قوية ودرجة حموضة قوية، ومحتوى عضوي عالي إضافة لاحتوائه مجموعة من المركبات العضوية والمركبات الفينولية [3].

ركزت العديد من الدراسات العالمية الحديثة التي تناولت مياه الجفت على الاهتمام بتحويل هذه المنتجات الثانوية التي يتم التخلص منها بشكل عشوائي إلى منتجات مفيدة، وذلك وفق عملية التحول الحيوي باستخدام كائنات حية دقيقة قادرة على الاستفادة من بعض مركبات مياه جفت في بعض عملياتها الحيوية [4].

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي هذه الدراسة كمساهمة في مجال التعامل مع الملوثات البيئية بهدف المحافظة على البيئة وحمايتها من التلوث، والهدف من هذه الدراسة هو تعريف عزلات فطرية من تربة ملوثة بمياه الجفت، وبالتالي الحصول على عزلات قادرة على النمو وتحمل هذه الأوساط والمساهمة في تحليلها.

طرائق البحث و مواده:

1) جمع العينات:

جمعت عينات التربة الملوثة بمياه الجفت من موقعين (القنجرة ، بكسا) في محافظة اللاذقية، وضعت ضمن عبوات من البولي ايتيلين المعقمة، ثم أحضرت إلى المختبر لإجراء الدراسة الحيوية.

2) تحضير أوساط مياه الجفت المعدلة (OMWW) :

تم تحضير أوساط معدلة لمياه الجفت من خلال استبدال الماء المقطر المعقم بمياه الجفت المعقمة، حيث تم إذابة (3.75)غ من مسحوق الآغار في (250) مل من مياه الجفت في أرلنماير بعد ترشيحه، ثم تم إغلاق فوهته بإحكام، وبعدها التعقيم في جهاز الأتوغلاف عند درجة حرارة °C (121) لمدة (15 – 20) دقيقة .

3) تحضير محاليل التربة:

أخذ ما يعادل (1)غ تربة جافة من عينات التربة المدروسة، ووضعت في أنبوب اختبار معقم يحوي(9) مل ماء مقطر معقم، ثم حرك بشكل جيد للحصول على محلول أم بتركيز (10/1) من التربة، ثم أخذ (1) مل من هذا التركيز ووضع ضمن أنبوب اختبار يحوي (9) مل ماء مقطر ومعقم للحصول على تركيز (100/1) تكررت العملية نفسها لتحضير التركيز (1000/1). ووضع (0.5) مل من كل تركيز على سطح الطبق المتضمن أوساط معدلة لـ (OMWW)تم تحضيره مسبقاً، وفرشت بشكل جيد على كامل الطبق ، نفذ الاختبار بمعدل (3) مكررات لكل تركيز تركت الأطباق نصف ساعة ليجف ماء العينة، ثم حضنت بالدرجة °C (25) لمدة 7 أيام.

4) تعريف المستعمرات الفطرية النامية على وسط مياه الجفت المعدل:

تم تعريف المستعمرات الفطرية النامية على الوسط المعدل لـ (OMWW) باستخدام وسط زرعي مغذي تفريقي خاص هو وسط البطاطا ديكستروز أغار (PDA) ووسط التشابك (CzA)، ويتم تحضير وسط (PDA) بإذابة (18.5)غ من المسحوق في (500) مل ماء مقطر في أرلنماير، وأغلقت فوهته بسدادة قطنية وبورق من السلوفان ، ثم عقمت بجهاز الأوتوغلاف بالدرجة °C(121) لمدة (15– 20) دقيقة وصبت بأطباق بتري معقمة، ويحضر وسط التشابك (CzA) بإذابة (24.5)غ من المسحوق في (500) مل من الماء مقطر في أرلنماير، ثم تراعى شروط وخطوات التحضير السابقة، حيث تمت زراعة كل مستعمرة فطرية على طبق بتري يحوي وسط الزراعة المغذي باستخدام إبرة زرع خاصة، وحضنت في الحاضنة في الدرجة °C(25) لمدة (14) يوم وكررت العملية حتى حصلنا على مستعمرات فطرية نقية.

5) تعريف المستعمرات الفطرية المعزولة:

تم تعريف العزلات الفطريات المعزولة بالاعتماد على الصفات الشكلية والقياسات المجهرية، وبالمقارنة بالدراسات المرجعية، وتتضمن لون المستعمرة على كلا الوجهين، سرعة النمو، صفاتها (طبيعة نمو المسيليوم على الوسط)، الحوامل و الأكياس البوغية والأبواغ (أبعادها وأشكالها).

النتائج والمناقشة :

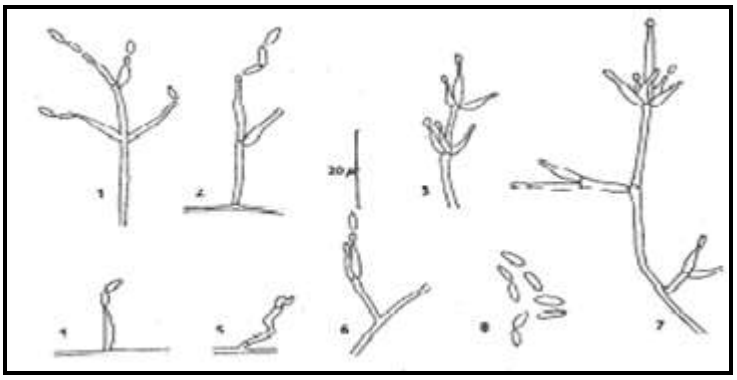
تم عزل الفطريات من عينات التربة الملوثة بمياه الجفت، وفيما يلي الأجناس التي تم عزلها وتصنيفها *Aspergillus flavus , Aspergillus terreus , Paecilomyces javanicus , Humicola* sp.

1) الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *Paecilomyces javanicus* :

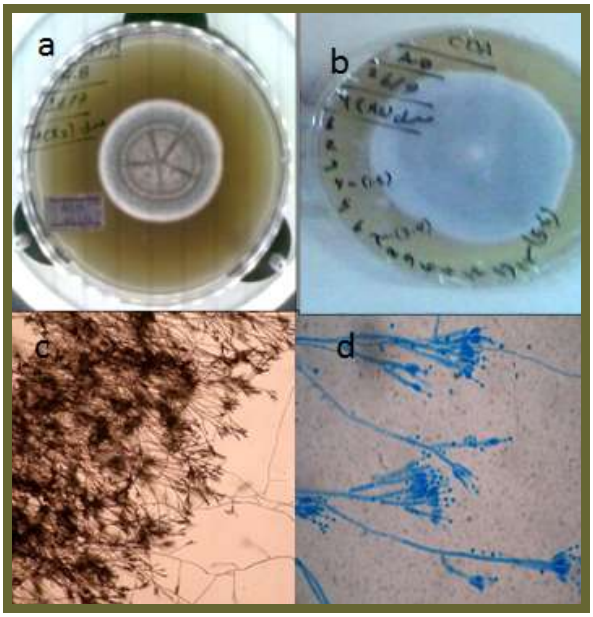
بلغ معدل نمو المستعمرة الفطرية على وسط (PDA) في اليوم السابع cm(4) وفي اليوم الرابع عشر cm(8.2) ظهر الوجه العلوي بلون أخضر زيتوني، أما الوجه السفلي فقد ظهر بلون كريمي غامق، كما بلغ معدل نمو المستعمرة الفطرية على وسط (CzA) في اليوم السابع cm(3.4)، وفي اليوم الرابع عشر cm(5.6)، وظهر الوجه العلوي بلون أزرق سماوي وحواف بيضاء مع التقدم بالعمر تصبح المستعمرة بلون رمادي مزرق وذات ملمس قطني، وظهر الوجه السفلي بلون كريمي باهت. كما هو موضح بالشكل (2)

تم أخذ القياسات البيومترية على وسط الزرع (PDA)، تبين أن المسيليوم مقسم، وظهر الحامل الكونيدي مقسم وقائم، طوله µm (100–40)، الفياليد ذو شكل قارووري أبعاده µm (20–6)، والأبواغ الكونيدية بيضوية أو شبه كروية، ملساء، أبعادها µm (5–3).

تبين بالمقارنة مع الدراسة المرجعية (Brown 1957) التشابه في الخصائص كما هو موضح بالشكل(1). [5]



الشكل(1) *Paecilomyces javanicus* (Brown 1957)



الشكل (2): الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *P. javanicus*
(a,b) المستعمرة الفطرية نامية على وسطي الزرع (PDA, CzA)، (c) الشكل المجهري للمستعمرة الفطرية
(d) الشكل المجهري للمستعمرة ملونة.

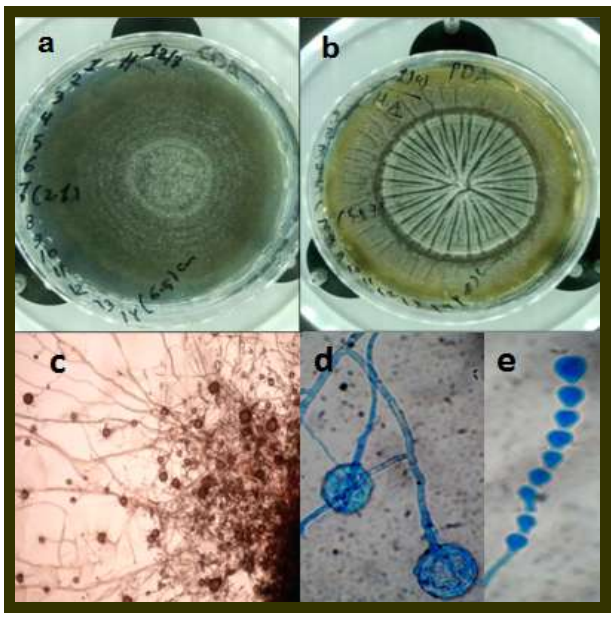
2) الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *Humicola* sp. :

بلغ معدل نمو المستعمرة الفطرية على وسط (PDA) في اليوم السابع (5.1)cm وفي اليوم الرابع عشر (8.6)cm، ظهر الوجه العلوي بلون كريمي كامد إلى بني باهت مجعد قطني الملمس، أما الوجه السفلي فقد ظهر لون المركز بلون بني غامق والحواف بني باهت، إن المستعمرة الفطرية أبطئ في نموها على وسط الـ (CzA)، وبلغ معدل نموها في اليوم السابع (2.1)cm، وفي اليوم الرابع عشر (6.5)cm، وظهر الوجهان العلوي والسفلي بلون أبيض شفاف، قطني الملمس. كما هو موضح في الشكل (3)

تم أخذ القياسات البيومترية على وسط الزرع (PDA)، حيث تبين أن المسيليوم مقسم، وظهر الحامل الكونيدي مقسم وأملس، وقد بلغ طوله (100–40)، ولوحظ ظهور نمطين من الأبواغ هما:

الأبواغ من النمط Phialoconidia: مرتبة بشكل سلسلة لها شكل بيضوي، ملساء، أبعادها µm (5–3).

الأبواغ من النمط Aleurioconidia : لها شكل كروي إلى شبه كروي، تمتد منها زوائد دقيقة يبلغ قطرها (35– 50) µm. [6]



الشكل (3): الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية .*Humicola* sp

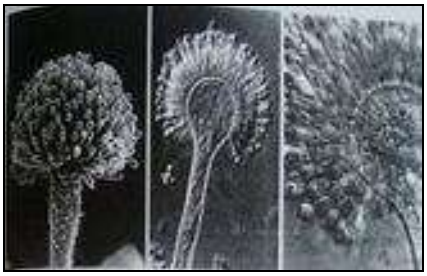
(a,b) المستعمرة الفطرية نامية على وسطي الزرع (CzA, PDA)، (c) الشكل المجهري للمستعمرة الفطرية ، (d) الأبواغ من النمط Aleurioconidia ، (e) الأبواغ من نمط الـ Phialoconidia

3) الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *Aspergillus flavus*:

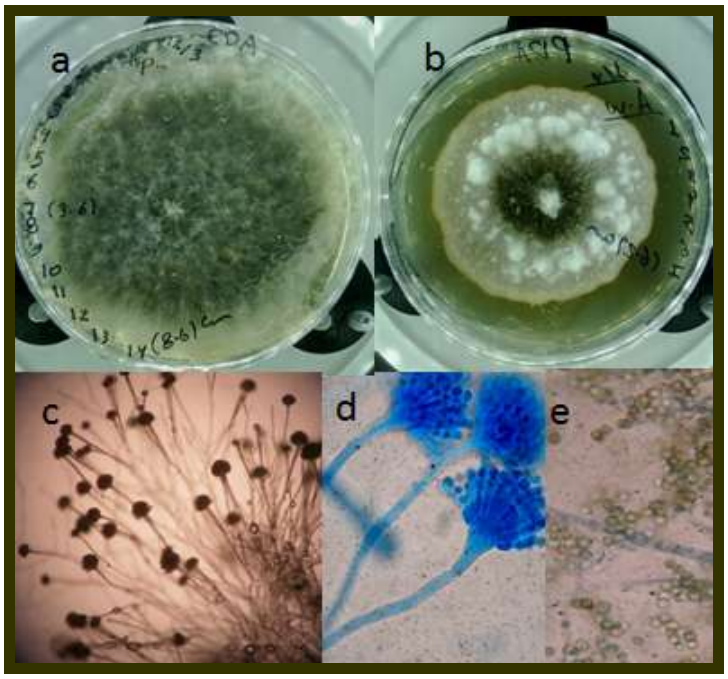
بلغ معدل نمو المستعمرة الفطرية على وسط (PDA) في اليوم السابع cm(6.2) ، وفي اليوم الرابع عشر cm(8.6)، ظهر الوجه العلوي بلون أخضر عشبي والحواف بيضاء، أما الوجه السفلي فقد ظهر بلون كريمي، و مع تقدم عمر المستعمرة أصبح لون المستعمرة بني غامق، أما على وسط (CzA)، فقد كانت متوسطة النمو، وبلغ معدل نموها في اليوم السابع cm(3.6)، وفي اليوم الرابع عشر cm(8.2)، وظهر الوجه العلوي بلون أبيض مخضر، أما الوجه السفلي فقد ظهر بلون كريمي فاتح. كما هو موضح بالشكل (5)

تم أخذ القياسات البيومترية على وسط الزرع (PDA)، المسيليوم مقسم، الحامل الكونيدي ذو لون زهري باهت الربع الاخير فيه خشن طوله µm (100–700)، ظهر الحويصل بشكل كروي قطره µm (15–40) تتوزع الذنيبات في صفين، الأبواغ الكونيدية كروية أو شبه كروية، جدرها خشنة، أبعادها µm (3–7) .[7]

تبين بالمقارنة مع الدراسة المرجعية (Gray 1821) التشابه في الخصائص كما هو موضح بالشكل(4)



الشكل(4): *Aspergillus flavus* (Gray 1821)



الشكل (5): A. flavus الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *A. flavus*

(a,b) المستعمرة الفطرية نامية على وسطي الزرع (CzA, PDA) ,(c) الشكل المجهري للمستعمرة الفطرية

(d) الحويصل والذنيبات، (e) الأبواغ الكونيدية

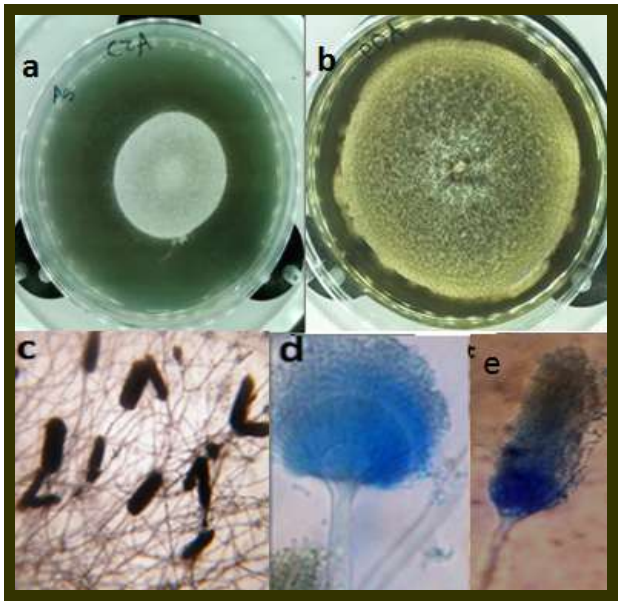
4) الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *Aspergillus terreus* :

بلغ معدل نمو المستعمرة الفطرية على وسط (PDA) في اليوم السابع cm(4.8) ، وفي اليوم الرابع عشر cm(7.5)، ظهر الوجه العلوي بلون أصفر باهت إلى بني، ومع مرور الوقت أصبح بلون القرفة وذو ملمس رملي، وظهر الوجه السفلي بلون برتقالي باهت، أما على وسط (CzA) فقد كانت المستعمرة الفطرية متوسطة النمو، بلغ معدل نموها في اليوم السابع cm(4.2)، وفي اليوم الرابع عشر cm(7.3) ظهر الوجهان العلوي والسفلي بلون أبيض، وكانت ذو ملمس قطني، .كما هو موضح بالشكل (7)

تم أخذ القياسات البيومترية على وسط الزرع (PDA)، المسيليوم مقسم، طول الحامل الكونيدي (300–40) µm ظهر الحويصل بشكل كروي قطره µm (20–6.5) الرأس الكونيدي يترتب عمودياً، تتوزع الذنيبات في صفين، الأبواغ الكونيدية كروية ، جدرها ملساء، أبعادها µm (2.5–1.8) .[8].

تبين بالمقارنة مع الدراسة المرجعية (Thom 1918) التشابه في الخصائص كما هو موضح بالشكل(6)

الشكل (6): *Aspergillus terreus* (Thom 1918)



الشكل (7): الصفات الشكلية والبيومترية للعزلة الفطرية *A. terreus*

(a,b) المستعمرة الفطرية نامية على وسطي الزرع (CzA, PDA)، (c)الشكل المجهري للمستعمرة الفطرية

(d) الحويصل، (e) الرأس الكونيدي

يتبين من الجدول (1) أن أوساط الزراعة التفريقية المستخدمة (PDA–CzA) لتفريق المستعمرات الفطرية المعزولة من تربة ملوثة بمياه الجفت أثرت بشكل واضح على معدل نمو العزلات الفطرية ولون وشكل المستعمرة [10,9]، حيث تم حساب النسب المئوية لمعدل نمو العزلات الفطرية على وسطي الزرع (PDA, CzA) بالمقارنة مع قطر طبق الزرع البالغ (9cm)، فقد لوحظ أن العزلتين الفطريتين *Humicola sp.*, *A. flavus* كانتا سريعتي النمو على وسط PDA، فقد بلغت النسبة المئوية لمعدل نموهما في اليوم الرابع عشر (95.55%)، أما على وسط CzA فقد كانت العزلة الفطرية *A. flavus* سريعة النمو فكانت النسبة المئوية لمعدل نموها (91.11%)، بينما كانت العزلة الفطرية *Humicola sp.* متوسطة النمو بنسبة نمو بلغت (72.22%)، أما العزلة الفطرية *A. terreus* ، فقد لوحظ أن معدل نموها على وسطي الزرع متقاربة، فقد بلغت النسبة المئوية لمعدل النمو على وسط الـ PDA (83.33%) في اليوم الرابع عشر و (81.11%) على وسط CzA، أما العزلة الفطرية *P. javanicus* ، فقد كانت سريعة النمو على وسط الزرع PDA ، حيث بلغ نسبة نموها (91.11%) في اليوم الرابع عشر، ومتوسطة النمو على وسط CzA بنسبة نمو بلغت (62.22%) في اليوم الرابع عشر.

الجدول 1 : النسب المئوية لمعدل نمو العزلات الفطرية على وسطي الزرع (PDA, CzA)

العزلة الفطرية	وسط الزرع PDA		وسط الزرع CzA	
	بعد(7) أيام	بعد (14) يوم	بعد (7) أيام	بعد (14) يوم
P. javanicus	44.44%	91.11%	37.77%	62.22%
A. terreus	53.33%	83.33%	46.66%	81.11%
A. flavus	68.88%	95.55%	40.00%	91.11%
Humicola sp.	56.66%	95.55%	23.33%	72.22%

الاستنتاجات والتوصيات:

1) تم عزل أربع عزلات فطرية نقية من تربة ملوثة بمياه الجفت تنتمي لأنواع فطرية مختلفة.

2) نمت العزلات المدروسة على وسطي الزرع، وتميز وسط الـ PDA بأنه الوسط الأفضل لنمو معظم الفطريات المعزولة .

3) يمكن الاستفادة من العزلات الفطرية في تطبيقات المعالجة الفطرية لتخفيف الأثر البيئي لمياه الجفت ومجال التحول الحيوي للحصول على مركبات ذات قيمة اقتصادية .

المراجع :

1) ALAA, A.; ADNAN, A.; NIZAM and NIZAR, I. *Quantitative Analysis of Phenolic Compounds in Syrian Olive Mill Wastewater by Spectrophotometry and HPLC.* Egyptian Journal of Pure and Applied Science, 2013, 009-014.

2) AZBAR, N.; BAYRAM, A.; FILIBELI, A.; MUEZZINOGLU, A.; SENGUL, F.; OZER, A. *A review of waste management options in olive oil production*. Crit, Rev, Env, Sci, Technol, 2004, 209-247. .

3) NIAOUNAKIS, M.; HALVADAKIS, C. P. *Olive-Mill Waste Management: Literature Review and Patent Survey*. Greece, 2004, 23-64.

4) EL-KHATEEB, M.A.; BILAL,A.; ABDULHAFEEZ,M.; SHAIK, R. *phenotypic characterization of phenol degrading microorganisms isolated from olive mill waste.* African Journal of Microbiology Research, Vol. 8, No. 21, 2014, 2131-2136.

5) BROWN,S.;GEORGE,S. *The genus Paecilomyces and its perfect stage Byssochlamys westling*. 1957, 66-67.

6)DOMSCH, K. H.; GAMS,W. *Compendium Of Soil Fungi*. Vol.1. 1980, 394-396.

7) GRAY. *Compendium Of Soil Fungi* .Vol. 1, 1821, 90-94.

8) SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI,M. G. *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore. 1998, 3715-3716.

9) SAHA, A.; MANDAL, P.; SAHA, D. *Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of Lasiodiplodia theobromae.* Griffon and Maubl. J. Environ Biol, Vol. 29, No.3, 2008,407-410.

10) OKUNOWO,W.O.; GBENLE,G.O.; OSUNTOKI, A. A.; ADEKUNLE, A. A.. *Media studies on Myrothecium roridum Tode: A potential biocontrol agent for water hyacinth*. J. Yeast Fungal Res, VoL. 1, No.4, 2010, 55-61.