أمثلة نمو فطر *Aspergillus niger* المحلي وتقييم تغيراته المورفولوجية على أوساط محضرة من مواد المخلفات الزراعية والأغذية

ناديا خضر[1] ، عدنان علي نظام[2]

[1]طالبة دكتوراه [2]أستاذ دكتور: قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية

الملخص

استُعمل في هذا البحث بعض مخلفات المحاصيل الزراعية والأغذية في تحضير أوساط نمو للفطريات ذات خصائص تصنيفية، حيث اختبر نمو النوع *Aspergillus niger* ذي القدرة الاستقلابية والصناعية على هذه الأوساط وأجريت أمثلة شروط نموه، حُضرت نماذج من الوسط بتغيير قوامه عن طريق ترشيحه من الألياف أو إضافة مكونات طبيعية (مستخلص التربة، خلاصة الخميرة) ثم طبقت عليه درجات متسلسلة من الحرارة والرقم الهيدروجيني واعتمد مقياس قطر المستعمرات كدليل على الشروط الفُضلى في التنمية. أظهرت النتائج نمو النوع *Aspergillus niger* على وسط المخلفات الزراعية والأغذية وتميزه بصفات مورفولوجية خاصة وتفضيله عموماً للوسط المحتوي الألياف وبدرجة حرارة حضن 28 °م والرقم الهيدروجيني 3؛ ما يؤكد إمكان الاستفادة من المخلفات الزراعية والأغذية في تنمية بعض أنواع الفطريات ذات الفوائد الاقتصادية مثل فطر *Aspergillus*.

الكلمات المفتاحية :

المخلفات الزراعية والأغذية، أمثلة النمو، تنمية الفطريات، مورفولوجيا الفطريات.

Optimization of indigenous *Aspergillus niger* growth and estimate of morphological changes on media prepared from agro-food wastes materials

(1) Nadia Khoder (2) Adnan Ali – Nizam

(1) Ph.D. student,(2) Prof. Dr. Department of Plant Biology, Faculty of Science, University of Damascus.

Abstract

In this research, some agricultural crop residues were used in preparing fungi growth media with taxonomic characteristics. The growth of *Aspergillus niger* species, with its metabolic and industrial ability, was tested in these media and growth conditions have been optimized. Different medium models were prepared, by changing its texture by filtering from fibers or adding natural ingredients (soil extract – yeast extract), then, a series of temperature and pH degrees were applied to the medium, and the colonies diameter size was used as an indication for the optimum growth conditions. Results showed the growth of the studied species on the agricultural residues medium, characterized with special morphological characteristics. With its preference for the medium containing fibers, incubation temperature of 28 °C, and the pH of 3, which confirms the possibility of using agricultural residues in growing some fungi species with economic benefits such as *Aspergilllus*.

Key words: Agro – food wastes, growth optimization, fungi culturing, fungi morphology.

المقدّمة

المخلفات هي أي منتجات ثانوية ناتجة عن المنازل والصناعات والزراعة أو التجارة ومصادر أخرى غيرها [1]، وقد أدى الازدياد العالمي في مجال إنتاج الغذاء في السنوات الأخيرة إلى توليد الكثير من المخلفات الزراعية والتي تحمل الأضرار والمخاطر على الصحة العامة، وتسبب مشكلات بيئية مثل تلوث الهواء والتربة والمياه [2].

أكدت الدراسات إمكانية إعادة تدوير المخلفات الزراعية وتصنيع منتجات أخرى أو جديدة مفيدة، حيث تتصف المخلفات الزراعية بغناها بالمواد العضوية (السكريات، البروتينات، الألياف) التي تعدّ ركيزة طبيعية لتنمية الأحياء الدقيقة، ما يسمح بإنتاج مواد ذات قيمة مثل الوقود والأعلاف الحيوانية، وتقليل مخاطر التلوث بها [3].

تنتمي الفطريات إلى مملكة الفطريات، وهي أحياء حقيقية النوى ذاتية الاغتذاء مفردة أو عديدة الخلايا، وتتضمن جميع الفطريات من تلك الصالحة للأكل إلى تلك المنتِجة لمواد مهمة في الصناعة، إضافة إلى مسببات الأمراض النباتية والحيوانية، كما تساهم الفطريات بدور كبير في عمليات تحلل المخلفات واعادة تدويرها، إذ تقوّض الفطريات المركبات المعقّدة المحتوية على الكربون والنتروجين مثل السلولوز والليغنين (الخشب) lignin، وتحوّلها إلى مكونات وعناصر مفيدة للأحياء الأخرى [4].

ينتمي إلى جنس الأسبرجلوس 200 نوع، ويتميّز هذا الجنس بدور مهم في النظم البيئية والمجالات الصناعية بسبب قدرته على إنتاج العديد من الإنزيمات والمركبات خارج الخلوية والمُسْتَقلبات الثانوية Secondary Metabolites، ويُعدّ من مسببات الأمراض الانتهازية لاسيما للأشخاص ضعيفي المناعة [5].

ينتمي النوع *Aspergillus niger* إلى مجموعة من الأنواع تسمى Aspergillus section Nigri التي تسبب مرض العفن الأسود، وهو من أكثر الأعفان شيوعاً، والأكثر تلويثاً للأغذية المخزنة والأكثر إتلافاً للمحاصيل والفاكهة بعد الحصاد في جميع أنحاء العالم [6]، يوجد في جميع البيئات تقريباً وهو رمي لاجنسي، مقاوم للحرارة المتطرفة يمكنه العيش في البيئات المتجمدة والحارة جداً (الأفضل بين 6 و47 درجة

مئوية)، ويتحمّل مجالاً واسعاً من الرقم الهيدروجيني بين 1.5 إلى 9.8 (6) [5]، منافس قوي للأحياء الدقيقة الأخرى في معظم الأوساط بسبب إنتاجه الغزير للأبواغ الكونيدية التي تمتلك صبغة سوداء تحميه من أشعة الشمس والأشعة فوق البنفسجية [7]. وينتج هذا النوع العديد من البروتينات الفريدة وعديدة الاستعمال، إضافة إلى إنتاج العديد من الإنزيمات خارج الخلوية مثل الأميلاز α–amylase والأكسيداز oxidase والكَتلاز catalase والبكتيناز pectinase؛ ما سمح بتطبيقات التقانات الحيوية وإنتاج المُسْتَقلبات الثانوية ذات الأهمية الصناعية والدوائية [8].

يستطيع النوع *A.niger* النمو على العديد من المخلفات الزراعية والأغذية، وإنتاج مركبات ذات أهمية اقتصادية في الوقت نفسه، إذ يمكنه إنتاج حمض الليمون [9]، وتحويل جزيئات المخلفات الزراعية والأغذية الصلبة إلى الميتان (غاز حيوي) [10]، واستعمال مخلفات قشور البرتقال كوسط تنمية لإنتاج البروتين مفرد الخلية [3]، واستعمال المخلفات الزراعية الصناعية لإنتاج بعض الإنزيمات، مثل الليباز [11] .

أهمية وأهداف البحث

نظراً إلى وجود مواد المخلفات الزراعية والأغذية التي لا يُستفاد منها وغناها بمصادر الكربون، ومقدرة النوع *Aspergillus niger* على النمو على مختلف مواد المخلفات الزراعية والأغذية وإنتاج العديد من المركبات المهمة، وانتشاره الواسع في البيئة ودوره المميز في التدوير، فإن البحث يهدف إلى ما يأتي:

1. تحضير وسط جديد من مواد المخلفات الزراعية والأغذية.
2. أمثلة شروط نمو النوع *A.niger* المحلي على الوسط الطبيعي المحضر.
3. مقارنة التغيرات المورفولوجية للنوع المنمّى على وسطي خلاصة الشعير ومواد المخلفات الزراعية والأغذية.

المواد والطرائق Materials and Methods

1. جمع المخلفات الزراعية وتحضيرها

جُمعت مواد المخلفات الزراعية والأغذية من سوق الهال بدمشق من الشهر السادس إلى الشهر الثامن من عام 2020 وكانت كالآتي: ثمار البطاطا – ثمار الباذنجان – ثمار الكوسا – قشور ثمار البرتقال – بقايا عرانيس الذرة – قشور ثمار الفول – أوراق نبات الفول – سوق نبات الفول.

غُسلت المخلفات وجُفّفت ثم قطعت إلى أجزاء صغيرة، وجففت بالظل حتى ثبات الوزن، طحنت العينات باستعمال خلاط كهربائي، ثم غربلت ووضعت ضمن أكياس بلاستيكية نظيفة وجافة، وحفظت في درجة حرارة الغرفة في مكان جاف إلى حين الاستعمال [12].

2. **تحضير وسط المخلفات الزراعية وتنمية العفن**

حُضّر وسط المخلفات الزراعية1 Agricultural Wastes (W1) بإضافة 2 غ من كل مسحوق نباتي و7 غ من الآغار لكل 500 مل من الماء المقطر، وقيس الرقم الهيدروجيني pH للوسط، ثم أجريت عملية التعقيم بالأوتوكلاف، ووزع في أطباق بتري ثم لُقّحت الأطباق بالفطر *A.niger* (المعزول من عينات تربة حراجية جُمعت من منطقة ميسلون، بتاريخ 18/ 09/ 2020) بطريقة الوخز، وحضنت مدة 7 أيام بدرجة حرارة 25°م [13].

3. **أمثلة قوام وتركيب وسط المخلفات الزراعية والأغذية**

بعد تحضير الوسط، جرى ضبط الرقم الهيدروجيني pH 5.6، وتغيير الخواص كالآتي:

- حُضر وسط المخلفات الزراعية 2 (W2)، كما في حالة W1، ثم أُجريت عملية تصفية على الوسط لاستبعاد الألياف والشوائب بقطع الشاش المعقم.
- حضر وسط المخلفات الزراعية 3 (W3)، كما في حالة W2، ثم أُضيفت خلاصة الخميرة 2% و250 مل من مستخلص التربة المحضر من تربة حديقة كلية العلوم بجامعة دمشق، لكل 500 مل من الوسط.

4. **أمثلة الرقم الهيدروجيني pH لوسط المخلفات الزراعية والأغذية**

جرى تصميم التجربة وتوزيع وسط المخلفات الزراعية W1 وفق سلسلة متدرجة من الرقم الهيدروجيني، كالآتي: 3، 3.5، 4.0، 4.5، 5.0، 5.6، وضبطها وقياسها بجهاز pH–meter قبل التعقيم، حيث اختير الرقم الهيدروجيني 5.6 في نهاية السلسلة لمقارنتها بالوسط التجاري (خلاصة الشعير)، ولُقّحت الأطباق وحُضنت في الدرجة 25 م° مدة 7 أيام، وقُيس قطر المستعمرة النامية ولوحظ النمو وشدة التبوغ [14].

5. أمثلة درجة حرارة حضن الفطر على وسط المخلفات الزراعية والأغذية

بعد ضبط الرقم الهيدروجيني للوسط على pH 5.6، لُقّحت الأطباق وحُضنت كل مجموعة منها مدة 7 أيام في سلسلة من درجات الحرارة، كالآتي: 20، 25، 28، 30، 37م°، وقد اختُيرت الدرجة 37م° لمقارنتها بالدرجة المثلى لتنمية الجراثيم، وقيس قطر المستعمرة النامية ولوحظت شدة التبوغ [15].

6. تقييم تغيرات مورفولوجية الفطر على وسط المخلفات الزراعية

قيّمت التغيرات المورفولوجية الظاهرة على نمو النوع *A.niger* (لون المستعمرة وقطرها) بعد زرعها على الوسط المركّب المختار للأمثلة، وقيست قدرته على تفكيك المخلفات الزراعية والأغذية المستعملة اعتماداً على شدة النمو والتبوغ ومقارنتها بالنوع النامي نفسه على وسط خلاصة الشعير الصلب Malt extract agar MEA [16].

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1. تقييم تركيب وسط المخلفات الزراعية

أظهرت نتائج زرع المعزولات على الأوساط المختلفة بالتركيب تفوّق وسط خلاصة الشعير في تنمية النوع *A.niger* على وسط المخلفات الزراعية، ويمكن أن يعود ذلك إلى أن الوسط التجاري يتصف بتركيب كيميائي دقيق ومضبوط مختبرياً ويحتوي على مكونات بسيطة سهلة الاستقلاب على عكس وسط المخلفات W1، أما فيما يخص مقارنة تراكيب

مختلفة لوسط المخلفات الزراعية والأغذية فقد أظهر وسط المخلفات الزراعية W1 تفوّقاً نسبياً في التنمية على باقي الأوساط، من حيث قياس قطر المستعمرة، وكثافة الأفطورة Mycelia، وشدة التبوغ (الجدول 1)، ويمكن أن يعود ذلك إلى استعمال المعزولات لألياف الوسط كمصدر غني بالكربون، وتخالف هذه النتائج تلك المرتبطة بمخلفات زراعية مختلفة أخرى، مثل: دكستروز فول الصويا ودكستروز الفول السوداني، إذ تبيّن أن فول الصويا يتفوّق على الوسط التجاري دكستروز البطاطا بسبب احتوائه على نسبة عالية من الكربوهيدرات والبروتين والدهون والمغذيات الأخرى [17]، وقد يعود الاختلاف بين نتائج هذا البحث ونتائج البحث الآخر إلى تدعيم وسط المخلفات بسكر الدكستروز الذي جعل منه وسطاً نصف طبيعي.

الجدول 1. قطر مستعمرات *A.niger* النامية على وسطي خلاصة الشعير والمخلفات الزراعية والأغذية.

الوسط المختبر	MEA	W1	W2	W3
قطر المستعمرة، سم	0.4± 8	0.1± 5.3	0.2± 5.2	0.4± 2.9

2. أمثلة الرقم الهيدروجيني pH لوسط المخلفات الزراعية والأغذية

أظهرت نتائج أمثلة الرقم الهيدروجيني pH لوسط المخلفات الزراعية تفضيل النوع *A. niger* للوسط ذي الرقم 3 (الجدول 2) وخالفت هذه النتائج نتائج دراسة قام بها كالياني وزملاؤه حيث فضل هذا النوع الرقم الهيدروجيني 6، ويمكن أن يعود الاختلاف إلى اختلاف المعزولة ووسط التنمية المستعمل حيث استُعمل وسط سابورد دكستروز وهو وسط تجاري مصمم برقم هيدروجيني 5.6، وخالفت دراسة أخرى لحسان وزملائه أجريت على وسط طبيعي مركب من مخلفات قشور الرز والحمص وألياف القطن في تنمية النوع *A. niger* وأمثلة إنتاجه للغليكوأميلاز حيث كان الرقم الهيدروجيني الأمثل لنموه 6 [18]، وفي دراسة ثالثة للسيلفييرا وزملائها استعمل وسط نخالة الرز المدعم وأظهرت النتائج تفضيل النوع *A. niger* للنمو وتحسن إنتاجيته للغليكوأميلاز ضمن الرقم

الهيدروجيني 4.5 [19]، فأكدت جميع الدراسات اختلاف الرقم الهيدروجيني الأمثل للنوع الواحد باختلاف تركيب وسط التنمية المستعمل.

الجدول2. أقطار مستعمرات نوع *A.niger* المنمى على وسط المخلفات الزراعية والأغذية ضمن أرقام هيدروجينية مختلفة.

pH	3	3.5	4	4.5	5	5.6
قطر المستعمرة سم	6.9 ±0.1	6.6 ±0.05	6.6 ±0.6	6.4 ±0.1	5.9 ±0.4	6.3 ±0.1

3. أمثلة درجة الحرارة لوسط المخلفات الزراعية والأغذية

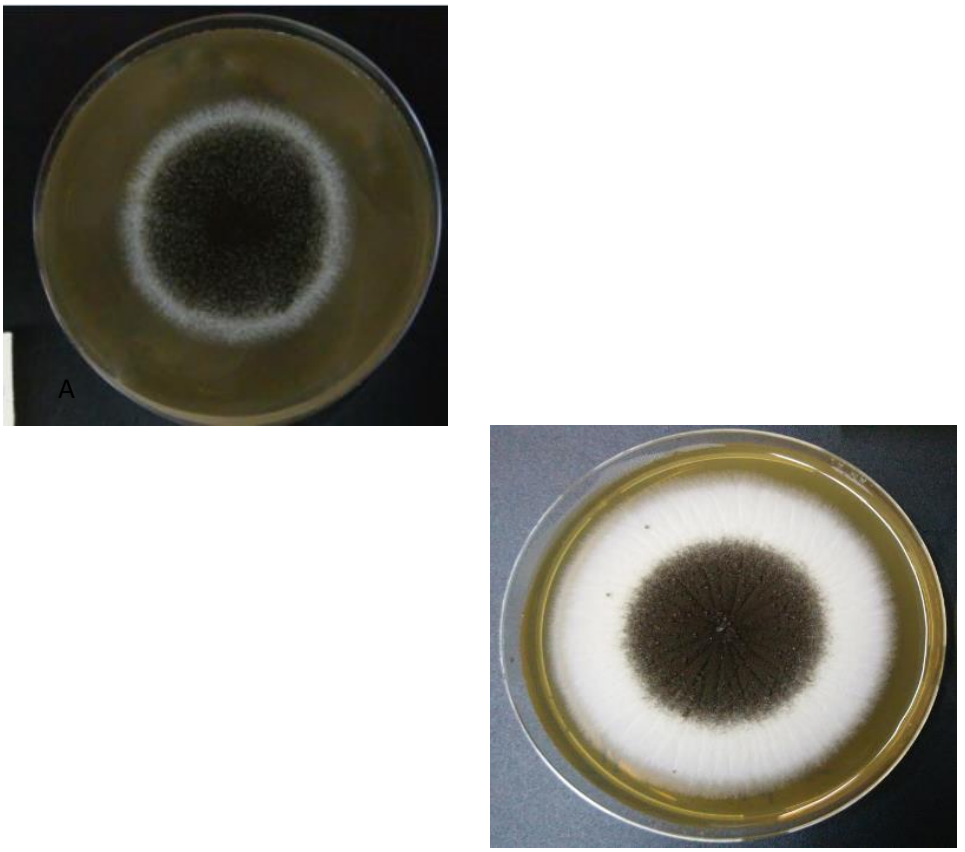
أظهرت نتائج أمثلة الحرارة تفضيل النوع *A. niger* للدرجة 28 م° مع إمكان نموه في درجات الحرارة العالية نسبياً 30 – 37 م°، وهذا يطابق بحث بالاسيوس وزملائه، حيث زرع النوع *A. niger* على ثلاثة أوساط تجارية وكانت درجة نموه المثلى أعلى من 30 م°، وهذ يؤكد كون هذا النوع متحملاً للجفاف [20]، وفي دراسة أخرى أجريت على أمثلة نمو وإنتاجية النوع *A. niger* للبكتيناز كانت درجة الحرارة المثلى هي الدرجة 30 م°، ويمكن أن يعود الاختلاف الطفيف في تفضيل درجة الحرارة إلى اختلاف الوسط المستعمل في التنمية [21].

الجدول3 . أقطار مستعمرات النوع *A.niger* المنمى على وسط المخلفات الزراعية والأغذية ضمن درجات حرارة حضن مختلفة.

الحرارة (درجة مئوية)	20	25	28	30	37
قطر المستعمرة سم	4.4 ±0.1	6.3 ±0.2	8.4 ±0.05	8 ±0.3	8.3 ±0.1

4. تقييم تغيرات مورفولوجية الفطر على وسط المخلفات الزراعية والأغذية

تتميز مستعمرة *A.niger* المنماة على وسط خلاصة الشعير الصلب بمركز أسود ذو انثناءات وحافة بيضاء منتظمة وبأفطورة مسطحة ومتناثرة وذات تحدب صغير، بينما تميز النوع *A.niger* المنمى على وسط W1 والمعرض لشروط الأمثلة السابقة بنقصان أقطار مستعمراته عن النوع المنمى على وسط خلاصة الشعير الصلب، ويمكن أن يعود السبب لإحتواء الوسط W1 على تراكيز عالية من الفينولات [22] التي يمكن أن تسبب تثبيط نسبي لنمو المستعمرة [23]، كما تميزت على نحو واضح بغياب انثناءات المستعمرة وصغر الحافة البيضاء المحيطة بها مع زيادة في شدة التبوغ ويمكن أن يكون بسبب احتواء وسط W1 على كميات كبيرة من الكربوهيدرات المتنوعة [24] بالإضافة لنقصان في كثافة الأفطورة السطحية نظراً لكون تركيب الوسط غير متجانس (الشكل 1)، وافقت النتيجة البحث الذي قام به شارما والذي يؤكد تغير صفات المستعمرة وتبوغها مع تغير الوسط المستعمل للتنمية [25].



الشكل 1. مستعمرات النوع *A.niger* على وسط خلاصة الشعير الصلب (A) وعلى الوسط W1 (B).

الاستنتاجات Conclusion

1- إمكان استعمال المخلفات الزراعية والأغذية كوسط طبيعي بدون إضافات لتنمية الفطريات وبديلاً للأوساط التجارية المكلفة مادياً.

2- تفوق الوسط التجاري بقدرته على التنمية عن وسط المخلفات الزراعية.

3- تميز النوع *Aspergillus niger* المنمى على وسط المخلفات الزراعية بصفات مورفولوجية خاصة.

4- تفضيل النوع *Aspergillus niger* المنمى على وسط المخلفات الزراعية والأغذية للوسط المحتوي على الألياف مع الرقم الهيدروجيني 3 ودرجة حرارة حضن 28 م°.

التوصيات Recommendation

1- تطوير وسط المخلفات الزراعية وضبط مكوناته للحصول على وسط طبيعي منافس للأوساط التجارية.

2- دراسة مقدرة أجناس أخرى من الفطريات النمو على وسط المخلفات الزراعية والأغذية.

3- توصيف النموات الفطرية على الأوساط المحضّرة، واقتراح استعمالها اعتماداً على الخواص المورفولوجية المميزة لكل نوع.

References المراجع

.1 Ezejiofor, T.I.N., U.E. Enebaku, and C. Ogueke, *Waste to wealth-value recovery from agro-food processing wastes using biotechnology: a review.* Biotechnology Journal International, 2014: p. 418-481.

.2 Elijah, A. and V. Edem, *Value addition to Food and Agricultural wastes: A Biotechnological approach.* Nig. J. Agric., Food Environ, 2017. **13**(1): p. 139-154.

.3 Azam, S., et al., *Production of single cell protein from orange peels using Aspergillus niger and Saccharomyces cerevisiae.* Global Journal of Biotechnology & Biochemistry, 2014. **9**(1): p. 14-18.

.4 Boddy, L., *Fungi, ecosystems, and global change*, in *The Fungi*. 2016, Elsevier. p. 361-400.

.5 Bennett, J.W., *An overview of the genus Aspergillus*. 2010: Caiser Academic Press, Portland.

.6 Gautam, A.K., et al., *Diversity, pathogenicity and toxicology of A. niger: an important spoilage fungi.* Research Journal of Microbiology, 2011. **6**(3): p. 270-280.

.7 Krijgsheld, P., et al., *Spatially resolving the secretome within the mycelium of the cell factory Aspergillus niger.* Journal of proteome research, 2012. **11**(5): p. 2807-2818.

.8 Lima, M.A.S., et al., *Aspergillus niger: a hundred years of contribution to the natural products chemistry.* Journal of the Brazilian Chemical Society, 2019. **30**(10): p. 2029-2059.

.9 Dutta, A., et al., *A comparative study of citric acid production from different agro-industrial wastes by Aspergillus niger isolated from mangrove forest soil*.

.10 Mlaik, N., et al., *Production and characterization of β-glucosidase from Aspergillus niger fermentation: Application for organic fraction of municipal solid waste hydrolysis and methane enhancement.* Biotechnology Progress, 2020. **36**(1): p. e2902.

.11 Putri, D.N., et al., *Optimization of Aspergillus niger lipase production by solid state fermentation of agro-industrial waste.* Energy Reports, 2020. **6**: p. 331-335.

.12 Saheed, O.K., et al., *Utilization of fruit peels as carbon source for white rot fungi biomass production under submerged state bioconversion.* Journal of King Saud University-Science, 20 :(2)28 .16p. 143-151.

.13 Christabel, O., E. Dorcas, and U. Elizabeth, *Suitability of food crop wastes in the formulation of laboratory media used for the cultivation of soil fungi*.

.14 Reihani, S.F.S. and K. Khosravi-Darani, *Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review.* Electronic Journal of Biotechnology, 2019. **37**: p. 34-40.

.15 Kalyani, P., S. Geetha, and K. Hemalatha, *Optimization of cultural conditions for improved production and bioactive metabolites by Aspergillus niger (MTTC-961).* European Journal of Pharmaceutical and Medical Research, 2016. **3**(10): p. 255-260.

.16 Diba, K., et al., *Identification of Aspergillus species using morphological characteristics.* Pakistan journal of medical sciences, 2007. **23** :(6)p. 867.

.17 Ikechi-Nwogu, C.G. and E.N. Elenwo, *Comparative evaluation of growth media for the cultivation of fungal cultures.* J Plant Pathol Microbiol, 2012. **3**: p. 3-6.

.18 Hassan, B.A., M.A. Jebor, and Z.M. Ali, *Optimization of the growth conditions for maximum production of the glucoamylase by Aspergillus niger*.

.19 Silveira, S.T., et al., *Optimization of glucoamylase production by Aspergillus niger in solid-state fermentation.* Applied biochemistry and biotechnology, 2006. **128**(2): p. 131-139.

.20 Palacios-Cabrera, H., et al., *Growth of Aspergillus ochraceus, A. carbonarius and A. niger on culture media at different water activities and temperatures.* Brazilian Journal of Microbiology, 2005. **36**(1): p. 24-28.

.21 Nsude, C., et al., *Optimization of Condition for Pectin's Production by Aspergillus niger in a Citrus Pectin based Submerged Fermentation Medium.* Ann Clin Immunol Microbiol. 2019; 1 (1). **1005**.

.22 Castrica, M., et al., *Total phenolic content and antioxidant capacity of agri-food waste and by-products.* Italian Journal of Animal Science, 2019. **18**(1): p. 336-341.

.23 Abd El-Zaher, E.H., Y.A. Mahmoud, and M.M. Aly, *Effect of different concentrations of phenol on growth of some fungi isolated from contaminated soil.* African Journal of Biotechnology, 2011. **10**(8): p. 1384-1392.

.24 Eajendra, K.G. and R.D. Bansal, *The Effect of Carbohydrates on Growth and Sporulation of Aspergillus flavus and their carry over for subsequent Spore Germination.* Sydowia, 1969. **Vol. XXIII**.

.25 Sharma, G., *Influence of culture media on growth, colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes.* Journal of yeast and fungal research, 2010. **1**(8): p. 157-164.