جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء–كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

المعالجة الأحيائية لسم الزيرالينون المفرز من قبل الفطر *Fusarium verticillioides* الملوث لحبوب الذرة الصفراء بإستخدام البكتريا *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum*

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية الزراعة – جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الزراعة

من قبل

نور الهدى عبد المنعم العبودي

بإشراف

أ.د.سامي عبد الرضا الجميلي

1439 هـ **2018 م**

﴿ إِلَّا رَحْمَةً مِنْ رَبِّكَ إِنَّ فَضْلَهُ
كَانَ عَلَيْكَ كَبِيرًا ﴾

صدق الله العلي العظيم

سُورَة الإسراء ـ الآيَة 87

اقرار المقوم اللغوي

أشهد أنَّ الرسالة المسومة بـ "**المعالجة الأحيائية لسم الزيرالينون المفرز من قبل الفطر *Fusarium verticillioides* الملوث لحبوب الذرة الصفراء بإستخدام البكتريا *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum***" قد تم تقويمها لغويا وبعد أخذ الطالب بالتصحيحات اللازمة اصبحت جاهزة للمناقشة.

التوقيع:

الأسم:د.جاسم عبد الواحد راهي

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان:جامعة كربلاء-كلية العلوم الاسلامية

/ /2017

أقرار المشرف

أشهد أن اعداد هذه الرسالة الموسومة "المعالجة الأحيائية لسم الزيرالينون المفرز من قبل الفطر *Fusarium verticillioides* الملوث لحبوب الذرة الصفراء بإستخدام البكتريا *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum*" جرى تحت اشرافي في قسم وقاية النبات– كلية الزراعة ـ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير علوم في الزراعة ـ وقاية النبات.

التوقيع:

أسم المشرف: د.سامي عبد الرضا علي الجميلي

العنوان:جامعة كربلاء/كلية العلوم الطبية التطبيقية

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / /2017

توصية رئيس القسم

بناءً على التوصيات أرشح هذه الرسالة للمناقشة.....

التوقيع:

الأسم: د.زينب عليوي محمد التميمي

العنوان:جامعة كربلاء/كلية الزراعة

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /2017

بسم الله الرحمن الرحيم

اقرار لجنة المناقشة

نشهد باننا أعضاء لجنة المناقشة, اطلعنا على الرسالة الموسومة (المعالجة الأحيائية لسم الزيرالينون المفرز من قبل الفطر *Fusarium verticillioides* الملوث لحبوب الذرة الصفراء بإستخدام البكتريا *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus plantarum*) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ووجدنا انها جديرة بالقبول لنيل درجة ماجستير علوم في الزراعة / وقاية النبات (أمراض نبات / سموم فطرية)

رئيس اللجنة
د.صباح لطيف علوان
أستاذ
كلية الزراعة / جامعة الكوفة

عضواً
د.بهيجة عبيس حمود
أستاذ مساعد
كلية التمريض / جامعة القادسية

عضواً
د.رجاء غازي عبد المحسن
أستاذ مساعد
كلية الزراعة / جامعة كربلاء

عضواً ومشرفاً
د.سامي عبد الرضا علي الجميلي
أستاذ
كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء

صُدّقت الرسالة من مجلس كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الأستاذ الدكتور
أ.د.محمد أحمد بريهي
عميد كلية الزراعة / جامعة كربلاء

الإهداء

الى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب

الى من كلّت أنامله ليقدم لي لحظة سعادة

الى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم

الى القلب الكبير .... **(أبي الحبيب)**

الى من تتسابق الكلمات لتخرج معبرة عن مكنون ذاتها

الى رمز الحنان والحب والتضحية

الى من كانت دعواتها سر نجاحي

الى الأمل المشرق.... **(أمي الغالية)**

الى سندي وقوتي وملاذي بعد الله

الى من بهم أكبر وعليهم أعتمد

الى من هم أقرب اليّ من روحي

الى رفقاء دربي.... **(إخوتي الأعزاء)**

نور الهدى

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له والصلاة والسلام على سيد الخلق والمرسلين محمد وآله الطاهرين....

كل الشكر والتقدير الى من مهد لي طريق العلم والمعرفة وسار معي خطوة بخطوة الى أُستاذي ومعلمي الدكتور **سامي عبد الرضا الجميلي** إقتراحه موضوع الرسالة ومتابعته المستمرة ولرعايته العلمية طيلة فترة الدراسة والبحث أسأل الله أن يمده بالصحة والعافية.

شكري وتقديري الى عمادة كلية الزراعة وبالأخص قسم وقاية النبات جامعة كربلاء لما قدموا لي من مساعدة طوال فترة الدراسة.

كما أتقدم بوافر الشكر والامتنان الى رئيس وأعضاء لجنة المناقشة المحترمون لتفضلهم بقبول قراءة ومناقشة موضوع الرسالة.

كما أتقدم بالشكر والتقدير الى الدكتور **عقيل نزال الكعبي** والدكتور **عهد عبد الهادي** والدكتور **ثامر الجنابي** والدكتور **رافد عباس** والدكتور **محمد أحمد إبريهي** والدكتورة **رجاء غازي** والدكتورة **زينب عليوي** والدكتورة **هدى عبد الرضا**.

أقدم خالص الشكر والتقدير الى **م.م. ميساء صالح مهدي** و **م.م. دعاء فايق** و **م.م.مريم حسين** و **م.م.نورس كتاب**.

وأتقدم بالشكر الى الدكتور **نزار عزيز متعب** لتشخيص المقاطع النسيجية في مختبر التشخيصات النسيجية مستشفى الكفيل التخصصي ـ كربلاء.

جزيل الشكر والتقدير الى جميع منتسبي كلية العلوم الطبية التطبيقية على مساعدتهم لي خلال فترة الدراسة.

مزيداً من الشكر والتقدير الى زميلاتي في الدراسات العليا **أقبال زهو** و **زينب مسلم** و **زهراء جواد** لما أبدتاه من مساعدة لي طيلة فترة الدراسة.

وفاءاً أتقدم بالشكر والامتنان الى **م.باحث نبأ أزهر** و **م.باحث نبأ حسن** لما أبدتاه لي من مساعدة كبيرة طوال فترة البحث.

ومن الله التوفيق....

نور الهدى

Summary الخلاصة

هدفت هذه الدرسة الى عزل البكتريا المتواجدة في عينات من اللبن أكتيفيا وتقييم كفاءتها في تحطيم سم الزيرالينون في الزجاج (*In vitro*) ومن ثم أختيار فعالية أحدى العزلات البكتيرية الأكفأ في تحطيم السم خارجياً و في خفض سمية الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*)

أوضحت نتائج العزل والتشخيص ظهور الجنس *Aspergillus* spp. وبنسبة ظهور بلغت 96% وجاء الفطر *Fusarium* spp. بالمرتبة الثالثة بنسبة ظهور بلغت 32%.

وبينت نتائج الكشف عن قابلية عزلات الفطر *Fusarium* spp. على إنتاج سم الزيرالينون بإستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافيا Thin Layer Chromatography(TLC) وبنسبة 72.2%.

وتم تأكيد تشخيص العزلات المنتجة لسم الزيرالينون بإستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction(PCR) كما أثبتت نتائج تحليل التتابع النيوكليوتيدي لحزمة الحامض النووي المضاعفة إن العزلات المنتجة تعود لنوع الفطر *Fusarium verticillioides*. وهذه العزلة كانت متطابقة بنسبة 100% مع العزلة WSF14-SW82 والتي تم تشخيصها في الولايات المتحدة.

من جانب أخر تم عزل وتشخيص 3 أنواع بكتيرية من اللبن وهي الـ *Lactobacillus plantarum* والـ *Lactobacillus rhamnosus* والـ *Streptococcus thermophilus*.

فضلاً عن دراسة فعالية بكتريا الـ *Bacillus subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر *Fusarium verticillioides* في ظروف الخزن الطبيعية اذ إنخفضت نسبة الأصابة من 100% في الحبوب المعاملة بالفطر فقط الى 48.88% بعد مرور ثلاثة أشهر خزن الحبوب, في حين لم تبدي بكتريا *L.plantarum* حماية لحبوب الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر *F.verticillioides*.

وأظهرت بكتريا الـ *L.plantarum* فعالية كبيرة في أختزال سمية (سم الزيرالينون) خارجيا(*In vitro*) اذ أختفى تألق بقعة السم الذي تمت معالجته بالبكتريا من على لوحة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة Thin Layer Chromatography(TLC) عند تعريضها الى الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 360نانومتر, بعد ذلك تم تعزيز هذه النتيجة بنتائج الأختبارات الحيوية داخل جسم حيوانات الجرذ الأبيض والتي تمت معاملتها بلقاح بكتريا الـ *L.plantarum* واللبن كلا على انفراد متبوعا بسم الزيرالينون. اذ كانت

الخلاصة.....Summary

نتائج معايير الدم الفسيولوجية سليمة تماما في حين كانت هناك تغايرات مرضية واضحة لدى الحيوانات التي تمت معاملتها بسم الزيرالينون فقط. اذ كانت اعداد كريات الدم الحمراء في معاملة البكتريا والسم واللبن والسم 10^6X6.66كرية/ملم^3 و10^6X6.83كرية/ملم^3 على التوالي في حين إنخفضت أعدادها في معاملة السم فقط إذ بلغت 10^6X4.81كرية/ملم^3 كما بلغت أعداد الخلايا اللمفية في معاملة البكتريا والسم واللبن والسم الى 10^3X10.13خلية/ملم^3 و10^3X10.17خلية/ملم ^{3}على التوالي وتراجعت أعدادها في معاملة السم فقط الى 10^3X7.74 خلية/ملم ^{3} وأحدث سم الزيرالينون خفض واضح في كمية الهيموغلوبين(Hb) في دم الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون فقط إذ بلغت 8.5 غم/100مل وكان لبكتريا *L.plantarum* واللبن دور مهم في المحافظة على مستويات الهيموغلوبين الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة بكل منها على حدة متبوعا بسم الزيرالينون إذ بلغت كميتها 14.06غم/100مل و13.47غم/100مل على التوالي.

كما وبينت النتائج قدرة بكتريا الـ *L.plantarum* على حماية أنسجة الحيوانات المعاملة بها والتي تم تجريعها بسم الزيرلينون بعد ذلك اذ أظهرت نتائج الفحص النسيجي للمقاطع النسيجية لأعضاء القلب والأمعاء والكبد والكلى والطحال سلامتها من اي حالة مرضية في حين ظهرت تغيرات مرضية واضحة في جميع أنسجة تلك الأعضاء في الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون فقط.

قائمة المحتويات

ت	الموضوع	الصفحة
1	**المقدمة**	1
2	**مراجعة المصادر**	4
1.2	المعالجة الحيوية للسموم الفطرية الملوثة للأغذية والأعلاف	4
2.2	سم الزيرالينون	7
3.2	الفطريات المنتجة لسم الزيرالينون	8
4.2	أيض الزيرالينون	10
5.2	سمية الزيرالينون	11
6.2	مستويات تعرض الإنسان لسم الزيرالينون	14
7.2	العوامل المساعدة على نقل الـ *Fusarium* spp. المنتج للزيرالينون	15
8.2	بكتريا الـ *Bacillus subtilis*	16
9.2	البكتريا المتواجدة في الألبان	18
10.2	بكتريا *Lactobacillus plantarum*	20
3	**المواد وطرائق العمل**	**21**
1.1.3	الاجهزة و المعدات المستخدمة في الدراسة	21
2.1.3	الكواشف والمحاليل والمواد الكيمياوية المستخدمة في الدراسة	22
3.1.3	الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة	23
2.3	طرائق العمل	24
1.2.3	تحضير الأوساط الزرعية	24
2.2.3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء	26
1.2.2.3	جمع العينات	26
2.2.2.3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء	27
3.2.3	دراسة قابلية عزلات الفطر *Fusarium* spp. على أنتاج سم الزيرالينون	28
1.3.2.3	تحضير وسط الرز وتنمية الفطر *Fusarium* spp. عليه	28
2.3.2.3	أستخلاص سم الزيرالينون من وسط الرز	29
3.3.2.3	تنقية سم الزيرالينون	29

4.3.2.3	السم القياسي	30
5.3.2.3	الكشف عن سم الزيرالينون	30
4.2.3	التشخيص الجزيئي للفطر *F.verticillioides*	31
1.4.2.3	استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين(DNA)	31
2.4.2.3	تقدير تركيز الـ DNA ونقاوته	32
3.4.2.3	تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR)	33
4.4.2.3	الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis	34
5.4.2.3	تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي (DNA) للفطريات الممرضة	35
5.2.3	عزل البكتريا من اللبن	35
1.5.2.3	الصفات المظهرية	36
2.5.2.3	الصفات المجهرية	36
3.5.2.3	الإختبارات البايوكيميائية	36
4.5.2.3	الإختبارات الفسيولوجية	39
5.5.2.3	تحضير لقاح البكتريا *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus*	40
6.5.2.3	حفظ عزلات بكتريا *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus*	41
6.2.3	تقييم كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا الـ *B.subtilis* واللقاح البكتيري لبكتريا الـ *L.plantarum* في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط PDA	41
7.2.3	تقييم كفاءة اللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum* على الكتلة الحيوية للفطر *F.verticillioides* على وسط N.B.	42
8.2.3	تقييم كفاءة نوعي البكتريا *B.subtilis* و *L.plantarum* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الإصابة بالفطر *F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون تحت ظروف الخزن الطبيعي	43
1.8.2.3	تحضير لقاح عزلة الفطر *F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون	43
2.8.2.3	المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis*	43
3.8.2.3	تحضير لقاح بكتريا الـ *Bacillus subtilis*	43
4.8.2.3	تنفيذ المعاملات على حبوب الذرة الصفراء	44
9.2.3	تقييم كفاءة بكتريا الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون في الزجاج خارجياً (*In vitro*)	46

1.9.2.3	تحضير سم الزيرالينون	46
2.9.2.3	معاملة سم الزيرالينون بلقاح بكتريا الـ *L.plantarum*	46
10.2.3	اختبار فعالية لقاح بكتريا الـ *L.plantarum* المعزولة من اللبن في حماية النظم الحيوية الأبيض من التأثيرات السمية لسم الزيرالينون داخلياً(*In vivo*)	47
1.10.2.3	تهيئة الحيوانات	47
2.10.2.3	معاملة الحيوانات	47
11.2.3	المعايير المدروسة	48
1.11.2.3	قياس المعايير الفسلجية	48
2.11.2.3	الدراسة النسيجية	49
12.2.3	التحليل الأحصائي	51
4	**النتائج والمناقشة**	52
1.4	عزلات الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء	52
2.4	دراسة قابلية عزلات الفطر .*Fusarium* spp على أنتاج سم الزيرالينون	53
3.4	تشخيص عزلة الفطر .*Fusarium* spp المنتجة لسم الزيرالينون	55
1.3.4	التشخيص المظهري والمجهري لعزلة الفطر النامي على وسط PDA	55
2.3.4	التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *F.verticillioides*	57
4.4	تشخيص بكتريا الـ *L. plantarum* و *L.rhamnosus* و*S.thermophilus*	60
1.4.4	دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *L. plantarum*	60
2.4.4	دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *L.rhamnosus*	61
3.4.4	دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *S.thermophilus*	61
4.4.4	الإختبارات البايوكيميائية والفسيولوجية لبكتريا *L. plantarum* و *L.rhamnosus* *S.thermophilus*	61
5.4	تقييم كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا الـ *B.subtilis* واللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum* في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط PDA	62
6.4	تقييم كفاءة اللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum*في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط Nutrient Broth	64
7.4	تقييم كفاءة نوعي البكتريا *B.subtilis* و *L. plantarum* في حماية حبوب الذرة	66

	الصفراء من الإصابة بالفطر *F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون تحت ظروف الخزن الطبيعي	
8.4	تقييم كفاءة بكتريا الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون خارجياً (*In vitro*)	69
9.4	تقييم فعالية بكتريا الـ *L. plantarum* واللبن في تحطيم سم الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*) وبشكل وقائي في معايير الدم الفسلجية	71
1.9.4	اعداد كريات الدم الحمراء RBCs	71
2.9.4	اعداد كريات الدم البيض WBCs	72
3.9.4	معدل اعداد الخلايا اللمفية Lymphocyte	73
4.9.4	قياس الهيموغلوبين (Hb)	74
5.9.4	اعداد الصفيحات الدموية platelets	75
6.9.4	حساب مكداس الدم (PCV)(HTC)	76
7.9.4	حساب اعداد الخلايا وحيدة النواة Monocyte	77
8.9.4	حساب متوسط وزن كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء (MCH)	78
9.9.4	حساب متوسط حجم كرية الدم الحمراء MCV	79
10.9.4	متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء MCHC	80
10.4	تقييم فعالية بكتريا الـ *L. plantarum* واللبن في تحطيم سم الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*) وبشكل وقائي في أنسجة الأعضاء الحيوية لذكور الجرذ الأبيض	81
5	**الإستنتاجات والتوصيات**	89
1.5	الإستنتاجات	89
2.5	التوصيات	90
6	**المصادر**	91
1.6	المصادر العربية	91
2.6	المصادر الأجنبية	94

قائمة الجداول

ت	عنوان الجدول	الصفحة
1	مواد تفاعل البلمرة المتسلسل	33
2	برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)	34
3	تنفيذ المعاملات على الذرة الصفراء	44
4	نسب ظهور وتردد أجناس الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء	53
5	يوضح قابلية عزلات الفطر .*Fusarium* spp على أنتاج سم الزيرالينون	54
6	مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء والعزلات الأخرى العائدة لنفس الفطر والمسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI)	60
7	الأختبارات البايوكيميائية لبكتريا الـ *L. plantarum* و *L.rhamnosus* و *S.thermophilus*	62
8	كفاءة بكتريا *L.plantarum* و المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في تثبيط نمو فطر *الفطر F . verticillioides* على الوسط الزرعي PDA	64
9	كفاءة بكتريا *L.plantarum* في تثبيط نمو فطر *الفطر F. verticillioides* على وسط الـ N.B.	66
10	تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء بالمستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F.verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن	68
11	تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء مستحضر بكتريا *B.subtilis* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F.verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن	68
12	تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء بلقاح بكتريا *L.plantarum* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F . verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن	69

قائمة الأشكال

ت	العنوان	الصفحة
1	الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر *F.verticillioides* النامي في وسط PDA بدرجة حرارة 25±2م° لمدة خمسة أيام	56
2	ناتج الحامض النووي(DNA) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الفطر *F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء	57
3	التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي المضاعفة من الفطر *F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء والمشخصة من قبل تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)	58
4	التحطيم الحيوي في الزجاج (*In vitro*) لسم الزيرالينون	70
5	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم الحمر لذكور الجرذ الأبيض	72
6	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم البيض لذكور الجرذ الأبيض	73
7	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الأبيض	74
8	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية هيموغلوبين الدم لذكور الجرذ الأبيض	75
9	تأثير بكتريا *L.plantarum* والبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الأبيض	76
10	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية مكداس الدم لذكور الجرذ الأبيض	77
11	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في أعداد الخلايا وحيدة النواة لذكور الجرذ الأبيض	78
12	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في متوسط وزن كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض	79
13	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في حجم كرية الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض	80

14	تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في متوسط تركيز الهيموغلوبين في كرية الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض	81
15	تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في قلب ذكور الجرذ الأبيض	84
16	تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في أمعاء ذكور الجرذ الأبيض	85
17	تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في كلى ذكور الجرذ الأبيض	86
18	تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في كبد ذكور الجرذ الأبيض	87
19	تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في طحال ذكور الجرذ الأبيض	88

قائمة المختصرات

الرمز	الأسم	
FAO	Food and Agriculture Organization	منظمة الغذاء والزراعة
PCR	Polymerase chain reaction	تفاعل البلمرة المتسلسل
TLC	Thin Layer Chromatography	طبقة الكروماتوغرافيا الرقيقة
PDA	Potato Dextrose Agar	وسط البطاطا دكستروز آكار
N.A.	Nutrient Agar	وسط الأكار المغذي
N.B.	Nutrient Broth	وسط المرق المغذي
RBCs	Red Ball Cell	كريات الدم الحمراء
WBCs	White Ball Cell	كريات الدم البيض
Hb	Hemoglobin	هيموغلوبين الدم
PCV(HTC)	Packed Cell Volume(Haematocrit)	كمية مكداس الدم
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	متوسط وزن كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء
MCV	Mean Corpuscular Volume	متوسط حجم كرية الدم الحمراء
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء

1.المقدمة Introduction

تعد الذرة الصفراء (*Zea mays L.*) من محاصيل الحبوب المهمة في العراق والعالم, وتأتي أهميتها من خلال تعدد أستعمالاتها اذ تدخل في غذاء الأنسان بصورة مباشرة أو غير مباشرة, من خلال أستعمالها كمكون أساسي في العليقة الحيوانية, فضلاً عن الأغراض التصنيعية الأخرى و تعد ثالث أكبر محصول أنتشاراً في العالم مما يجعله يحظى بإهتمام كثير من الباحثين (الأسودي, 2002).

وقدرت المساحة المزروعة بهذا المحصول في العراق 378.1 الف دونم لعام 2015(الجهاز المركزي للأحصاء). وقد أشارت الدراسات الى أن 25% من محاصيل الغذاء العالمي سنوياً ملوثة بمستويات متغيرة من السموم الفطرية وذلك حسب تقدير منظمة الغذاء والزراعة الدولية (FAO)(2004) في نسبة المحصول العالمي الملوث بالسموم الفطرية. إذ يصيب الفطر *Fusarium* النباتات في جميع مراحل نموها, وهو من الفطريات القاطنة في التربة ويصيب جميع أجزاء نبات الذرة الصفراء ومنها البذور فيصيب الجذور وقواعد السيقان ويسبب تعفنها وموتها فضلا عن أن بعض الأنواع تصيب الأوعية الناقلة وتؤدي الى ذبول النباتات وموتها.(Ahmad وآخرون, 1997). كما انه يصيب الذرة الصفراء في الحقل ويسبب تعفن العرنوص Ear rot وتستمر معها عند الخزن ولاسيما اذا كانت هناك رطوبة تساعد على انتشار الفطر في المخازن مما يؤدي الى تلوث الحبوب بالأفرازات السامة للفطر (Yatesوآخرون, 2003). والفطر *Fusarium* ليس مسبباً مرضياً يسبب خسائر كبيرة في المحاصيل الأقتصادية فحسب وإنما يتعداه الى تسببه في حالات مرضية للأنسان وحيواناته عند تناولها أغذية وأعلاف ملوثة بسموم هذا الفطر ومن ضمن السموم التي تفرزها الأنواع المختلفة للجنس *Fusarium* هي Fusaric acid و Deoxynivalenol وZearalenone وFumonisin وT-2 Toxin التي تمثل مجموعة من المركبات السامة(Tamuraوآخرون, 2015). وأشار(Verma وآخرون, 2002) الى أخطار السموم الفطرية في كونها لاتستحث الجهاز المناعي و لاتتحطم بدرجات الحرارة العالية اي مقاومة للحرارة, و ذات اوزان جزيئية واطئة والزيرالينون هو مركب سام ذو طبيعة فينولية إذ ينتج من قبل العديد من الأنواع العائدة للجنس *Fusarium* أهمها *F.culmorum* و *F.graminearum* و *F.verticillioides* و *F.moniliforme* و*F.equiseti*, المسار التخليقي لهذا السم هو The acetate polymalonate pathway والذي يؤدي الى تكوين polyketide والذي بدوره يمكن ان يتحول الى سم الزيرالينون

(الجميلي, 2014). إذ ان وزنه الجزيئي هو 318.36 دالتون وهو مركب ثابت لايتحطم في درجات الحرارة العالية بسهولة, والزيرالينون مجموعة تضم عدداً من مشتقاته ومنهاα–Zearalenone و ß– Zearalenone التي قد تزيد أو تقل درجة أنصهارها عن 178م°الى 180م°(Mirocha وآخرون, 1976).

ويشبه سم الزيرالينون الى حد كبير تركيب هرمون 17ß–estradiol البشري وبذلك يستطيع الأرتباط مع مستقبلات هرمون الأستروجين (Kuiper وآخرون, 1987) إذ يعمل على تأخير الحمل وحصول حالات اجهاض ومشاكل في الأنجاب وضعف المقاومة ضد الأمراض(El–Nezami وآخرون, 2002) بالأضافة الى حدوث حالات سرطان وتحسس في الجلد(Bennet وKlich, 2003).

أستعملت الطرق الفيزيائية والكيميائية في حماية الأغذية من التلوث بالسموم الفطرية ولكن هذه الطرق لها مخاطر جانبية محتملة وكلفتها عالية نسبياً وعليه إتجهت البحوث العلمية حول إستعمال الطرق الحيوية والتي تعمل فيها أنواع البكتريا والخمائر أو استعمال أنظمة إنزيمية متخصصة تعمل على إبطال فعالية السم الفطري من خلال عملية التحولات الحيوية التي تؤدي الى تحطيم جزء من تركيبة السم و بالتالي الى فقدان سميته وفعاليته أو يحدث أدمصاص للسم على الجدار الخلوي أو احد مكونات الخلية وهذا يؤدي الي تقييد جزيئات السم وابطال مفعوله(Blanc وآخرون, 1995).

وفي السنوات الأخيرة تم اجراء العديد من الدراسات حول قدرة وكفاءة أنواع من البكتريا في السيطرة على الأمراض الفطرية والبكتيرية (Laura وEric, 1998 ؛Kazmar وRobert, 2000).

ووجد ان نوع *Bacillus subtilis* يكون ذات فعالية عالية في تثبيط العديد من المسببات المرضية وتقليل نشاطها ونموها, وان استعمالها ادى الى حدوث زيادة معنوية في النمو والحاصل (Yuming وآخرون, 2003) كما أنَّ لبكتريا الـ *B.subtilis* القدرة على تحطيم سمية الأفلاتوكسين AFB1 داخل وخارج جسم الكائن الحي (Al–Saad, 2014), ووجد الهاشمي(2014) أن بكتريا الـ *Lactococcus lactes* لديها القدرة على أختزال سمية الأفلاتوكسين AFB1 في داخل وخارج جسم الكائن الحي.

كما وبين El–Taee(2015) أن قدرة بكتريا الـ *Lactococcus lactes cremoris* على التخلص من سمية الزيرالينون داخل جسم الكائن الحي.ونتيجة لإصابة المحاصيل الزراعية بالفطر *Fusarium* بالحقل وأثناء الحصاد وإنتقالها مع المحاصيل الى المخازن وبالنظر لعدم توفر مخازن كافية لخزن حبوب الذرة الصفراء ذات مواصفات فنية تمنع اصابة الحبوب بالفطر *Fusarium* وتلوثها بالسموم الفطرية في العراق فقد تم إقتراح هذا البحث والذي يتمحور حول إمكانية توظيف بعض أنواع البكتريا في حماية بذور الذرة الصفراء من الأصابة بالفطر *Fusarium* في المخزن فضلاً عن إمكانية إستعمال بعض أنواع البكتريا المعزولة من الألبان في تقليل سمية سم الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*) ولتحقيق ذلك تم أعتماد المحاور الأتية في هذه الدراسة:

1. عزل وتشخيص بعض الفطريات المرافقة لعينات الذرة الصفراء المحلية.
2. الكشف عن قدرة عزلات الفطر *Fusarium* spp. على إنتاج سم الزيرالينون.
3. تقييم كفاءة بكتريا *Bacillus subtilis* في حماية بذور الذرة الصفراء في المخزن.
4. إختبار فعالية أحد أنواع البكتريا المعزولة من اللبن في خفض سمية سم الزيرالينون في الزجاج (*In vitro*) وداخل الجسم الحي (*In vivo*).

1.2.المعالجة الحيوية للسموم الفطرية الملوثة للأغذية والأعلاف

يمكن اعطاء توصيف لمفهوم المعالجة الحيوية للسموم الفطرية كون عملية ازالة السموم الفطرية الملوثة للسلع الغذائية المختلفة والأعلاف الحيوانية بإستخدام طرق امينة لاتؤثر سلباً على القيمة الغذائية والصفات المرغوبة فضلاً عن امكانية استخدام مواد طبيعية واخرى حيوية لمعالجة السموم الفطرية داخل الجسم الحي وخارجه.

استعمل Bacon وآخرون(2001) بكتريا الـ *Bacillus subtilis* في منع تراكم سم الـ Fumonisins المنتج من قبل الفطر *Fusarium moniliforme* عن طريق تثبيط ميكانيكية التخليق الحيوي لهذا السم. كما تم استخدام بكتريا الـ*Bacillus thuringiensis* في خفض تراكيز سموم الـ Fumonisins عن طريق نقل بروتين CryIAP من البكتريا الى الذرة (Clements وآخرون, 2003). ووجد Megharaj وآخرون (1997) ان بكتريا *Pseudomonas flourescence* لديها القدرة على تحطيم سم الزيرالينون في الأوساط السائلة بنسبة 100%. كما أن لبكتريا الـ *Lactobacillus rhamnosus* القدرة على تحطيم سم الزيرالينون في الأوساط السائلة بنسبة 100%, بالإضافة الى مقدرة بعض من هذه السلالات على ازالة سمية Trichothecene من الوسط السائل(El-Nezami, 2002). كما استعملت بكتريا الـ *L.rhamnosus* ضد نوعين من الفطر *Fusarium* وهي *F.verticillioides* و*F.proliferatum* وبالتالي تقليل كمية السم المنتجة بنسبة بلغت 62.3%(Stiles و Bullerman, 2002). وأشار Teniola وآخرون (2005) الى فعالية بكتريا الـ *Mycobacterium fluoranthenivorans* في اختزال سم الأفلاتوكسين AFB1 وبنسبة 80% بعد 36 ساعة وبعد مرور 72 ساعة أصبح من غير الممكن الكشف عنه وذلك بسبب فعل الخلايا الحرة البكتيرية. كما ان معاملة بذور الذرة الصفراء ببكتريا

Bacillus amyloliquefaciens و *Enterobacter hormaechei*ادت الى خفض الإصابة بأنواع الفطر *Fusarium* وخفض تراكم سموم Fumonisins والـ Zearalenone (Pereira وآخرون, 2010). وبين الأسدي (2013) الى القدرة التضادية لعزلات بكتريا الـ *B.subtilis* حيث استخدم المستحضر الحيوي بتركيز 0.1 غم/لتر حيث اظهر المستحضر الحيوي كفاءة عالية في حماية بذور الحنطة والشعير والذرة الصفراء من الإصابة بالفطرين *A.flavus* و *A. parasiticus* والتلوث بسم الأفلاتوكسين AFB1 مع حصول زيادة في الإنبات في الحبوب المعاملة بالمستحضر. وتوصلت دراسة حول امكانية اختزال كمية سم الـ AFB1 بإستخدام بكتريا *L.plantarum* و*Lactococcus lactis* حيث بلغت كمية السم المختزلة في الاولى 46% اما الثانية 27% في الوسط السائل خارج جسم الكائن الحي وعند مزج النوعين كانت نسبة تحلل المادة السامة 59%(Sezer وآخرون, 2013). وبين الساعدي (2014) قدرة بكتريا *Bacillus polymyxa* حماية جيدة من الإصابة بالفطر *Aspergillus niger* و*Aspergillus parasiticus* كلاً على حدة واشار ايضاً الى قدرة بكتريا *Lactobacillus acidophilus* في حماية انسجة الجرذ الأبيض من الأثار السمية لسموم الفطر *A.niger*. وذكر الخفاجي (2014) ان المستحضر الحيوي المصنع من *B. subtilis* فعالية جيدة في حماية حبوب الذرة الصفراء والحنطة من الإصابة بالفطر *F. graminearum* تحت ظروف الخزن الطبيعي كما وأشار الى قدرة البكتريا المقتولة حرارياً في اختزال سمية الزيرالينون وحماية اناث الجرذ الابيض من تاثيراته السمية. من جانب اخر أظهرت سلالات *L. rhamnosus GG* و *L. rhamnosus LC705* فعالية عالية في ازالة سم AFB1 من الوسط وبنسبة 80% حيث عملت على تقليل تجمع الأفلاتوكسين في الامعاء بواسطة الزيادة في عملية الطرح من خلال تكوين معقد (بكتريا-الافلاتوكسين)(Kankaanpaa وآخرون, 2000). وبين الهاشمي(2014) أمتلاك بكتريا الـ *Lactococcus lactis* فعالية عالية في تحطيم سم AFB1 خارج جسم الكائن الحي *In vitro* و داخل جسم الكائن الحي *In vivo* كما حافظت البكتريا على فعاليتها التحطيمية لسم AFB1 بعد معاملتها حرارياً.

وأظهرت مجموعة من سلالات البكتريا العائدة لـ *B. subtilis* انخفاضاً في نسبة الـ AFB1 في حبوب الذرة الصفراء وكان هناك تفاوتاً فيما بينها بسبب الإختلاف الوراثي للسلالات. واستطاعت بكتريا الـ *L. acidophilus* خفض سمية الزيراليون في النظم الحيوية لإناث الجرذ الأبيض (Ali وآخرون, 2015). واشار El-Taee(2015) الى قدرة بكتريا *Lactococcus lactis cremoris* المقتولة حرارياً في تقليل الآثار السمية لسم الزيرالينون في النظم الحيوية لإناث الجرذ الامهق. كما تم عزل بكتريا *L. plantarum* والـ *L. rhamnosus* من الحليب حيث اختبرت قدرة العزلات البكتيرية على تحطيم سم AFM1 حيث اظهرت عزلة الـ *L. plantarum* قدرة على ربط السم تراوحت بين 16.1–78.6% بواسطة جهاز الـ HPLC كما اظهرت بكتريا *L. rhamnosus* قدرة على ربط السم 15.3–95.1% حيث اظهرت الاخيرة قدرة ربط اقوى من الاولى كما اظهرت نتائج في خفض سمية AFM1 في داخل جسم الكائن الحي(Abbes وآخرون, 2013). اختصت هذه الدراسة بقدرة سلالات من بكتريا حامض اللاكتيك على ازالة السموم في الاوساط السائلة حيث اختبرت 12 سلالة ضد الافلاتوكسين AFB1 وعُملت مع السم حيث كانت سلالات حية ومقتولة حرارياً وبالحامض حيث استطاعت سلالة *L.rhamnosus GG* و *L. LC705* *L. rhamnosus* ازالة 71% من السم وذلك عن طريق جهاز الـ HPLC (Haskard وآخرون, 2001). كما اختبرت قدرة ثمان عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك في خفض سمية الأفلاتوكسين في الأوساط السائلة حيث اظهرت بكتريا *L.rhamnosus* قدرة عالية على اختزال سم الأفلاتوكسين مقارنة مع *Bifidobacterium longum* و *L.bulgaricus* و *L. halveticus* و *L.acidophilus*على التوالي وبنفس الوسط وأظهرت ربط اقل للـ AFM1 وعند دمجها مع بعضها اظهرت انخفاضاً للأفلاتوكسينات AFM1 و AFB1 بنسبة بلغت 69.5% و 75.5% على التوالي بواسطة جهاز الـ HPLC (Motawee و El-Ghany, 2011).

2.2.سم الزيرالينون

السموم الفطرية Mycotoxins هي عبارة عن مجاميع مختلفة من المركبات السامة وهي نواتج لعمليات الايض الثانوي Secondary metabolism لبعض الأنواع من الفطريات قبل الحصاد وفي المخزن(Tamuraوآخرون, 2015) اذ أشار Pestka و Bondy (1990) بأن مجاميع السموم الفطرية المهمة والمؤثرة في صحة الأنسان هي الأفلاتوكسينات والترايكوثسينات وسموم الأوكراتوكسين والباجيولين والزيرالينون. وأنواع فطر *Fusarium* في طليعة الفطريات المنتجة للسموم ومنها سم الزيرالينون(Zearalenone)(Bankole وAdebanjo, 2003).

وتشير البحوث السابقة الى أن الزيرالينون Zearalenone يفرز من قبل بعض أنواع الفطر *Fusarium* في كثير من المحاصيل الزراعية كالذرة الصفراء والشعير والرز والقمح والشوفان وبذور السمسم والبصل والأعلاف (Peraica وآخرون، 1999). يشتق سم الزيرالينون من حامض لاكتون الرسورسيسليك Resorcyclic acid lactone (R A L) والرابطة المزدوجة بين1-2 (en) والكيتون (one) ليأخذ الأسم zearalenone, كما يطلق عليه Resorcyclic acid lactone (R A L) أو Fermentation Estrogenic Substance (F E S) وأشير له بالرمز F-2 عام 1965، وسمي بالإسم الأخير من قبل عدد من الباحثين في جامعة منيسوتا الأمريكية (Caldwell وآخرون, 1970) إذ يعد من من المركبات الفينولية ويتم تصنيفه أعتمادا على أصل تكوينه الحيوي ضمن مجموعة الكيتايدات المتعددة، وهو مركب بلوري أبيض اللون تبلغ كتلته الجزيئية النسبية 318 دالتون ودرجة أنصهاره 146م° أو 145م° ويكون لون الفلورة المنبعث من مركب الزيرالينون ازرق مخضرا عند تعرضه الى الموجات الطويلة 360 نانوميتر من الأشعة فوق البنفسجية، ويعطي لونا أخضر غامقا عند تعرضه للموجات القصيرة 260 نانوميتر من الأشعة نفسها (ابراهيم والجبوري, 1998). ومن أهم مشتقات سم الزيرالينون هي Zearalanol و Zeralenol و Dideoxyzeralane و Tetrahydrozearalane و

Dimethylzearalenone و o–Methylzearalenone و p– Methylzearalenone و Dideoxyzearalanone و 2–Deoxyzearalanone و 4–Deoxyzearalenone و 5– Hydroxyzearalanone و zearalanone و Zearalanol (Wyllie وMorehouse, 1977).

3.2.الفطريات المنتجة لسم الزيرالينون

ينتج سم الزيرالينون عن طريق العديد من الأنواع العائدة للجنس *Fusarium* فأنواع الفطر *Fusarium* من المسببات المرضية واسعة الأنتشار على الذرة في المناطق المعتدلة وشبه الأستوائية،حيث يصيب الفطر الجذر والساق والعرانيص ويؤدي الى أنخفاض كبير في الحاصل يتراوح بين 10%–30% فضلاً عن أن بعض السلالات قادرة على أنتاج السموم الفطرية والتي يمكن أن تصيب النباتات في الحقل أي مرحلة ماقبل الحصاد أو أثناء خزن المحصول إذ أن أكبر أصابة للفطر تحدث عندما يصيب العرنوص مؤدياً في كثير من الأحيان الى تلوث حبوب الذرة بالسموم ومنها Zearalenone و Deoxynevalenone (Lew وآخرون, 1997).كما أن إصابة الورقة ينتج سم الـ Nivalenol (Niv) وعند أصابة النبات بالكامل فإنه ينتج عنه سم (Zen) (Oldenburg, 1993).

إذ تعتبر السموم المنتجة من قبل أنواع الفطر *Fusarium* هي الأكثر أحتمالا بالتشكل في الذرة الصفراء عندما يتأثر النبات بالعديد من العوامل مثل الحراثة والظروف البيئية غير المناسبة والأنماط الجينية للنبات (Eriksen وAlexander, 1998).

أن أنواع الـ *Fusarium* تسبب تعفن العرنوص في الذرة في جميع أنحاء العالم إذ يكون سريع الأنتشار كما أشير الى عزل 9 أنواع من الـ *Fusarium* من جزء واحد من الأنسجة المصابة والتي تعتبر ممرضة للنبات وهناك أنواع من الـ *Fusarium* تكون أقل أمراضية لكنها قادرة على أنتاج كميات كبيرة من السموم وبالتالي يمكن تحديد الأنواع الفطرية المنتجة للسموم ليس فقط من خلال الأنواع الممرضة السائدة

وأنما من خلال الأنواع الأقل أمراضية ايضا أي التي لاتنتشر في جميع أجزاء النبات (Bottallico, 1997).

وقد تم وصف تلوث المحاصيل بالسموم الفطرية على أنها عملية من ثلاث مراحل وهي أصابة المحصول باللقاح الفطري يليه نمو الفطريات في الأنسجة النباتية وأخيرا انتاج السموم الفطرية (Magan و Olsen, 2004).

كما تنتشر أنواع الـ *Fusarium* على نطاق واسع في التربة والأجزاء النباتية الهوائية وعلى مخلفات النبات والمواد العضوية في التربة (Agrios, 2005). ومن أهم الأنواع العائدة للجنس *Fusarium* التي تنتج سم الزيرالينون هي *F. culmorum* و *F. equiseti* و *F. graminearum* و *F. moniliform* (الجميلي, 2014). كما تنتج فطريات *F. oxysporium* و *F. roseum* و *F.tricinctum* سم الـ Zen في حبوب الشعير وعلائق الحيوانات(Wyllie و Morehouse, 1977). يتواجد الفطر *F. graminearum* بنطاق واسع في الذرة والقمح والشوفان والذرة الرفيعة والسمسم وكذلك في القش و السيلاج والتي تعتبر من المكونات الرئيسية في العديد من المنتجات الغذائية للانسان والحيوان. وله القابلية على أنتاج سم الزيرالينون بكمية أكبر من باقي الأنواع وخاصة النوعين *F .roseum* و *F moniliform*. في وسط وشمال الولايات المتحدة وقد وجد أن كمية الـ DON والـ Zen هي الأكبر في الحبوب التي تصاب بمرض لفحة الرأس الفيوزارمي إذ سجلت نسبة تلوث بلغت 100%(Balazi وآخرون, 2006). كما وجد أن انواع فطر الـ *Fusarium* لها القدرة على أنتاج مجموعة من السموم الفطرية في آنٍ واحد وهذا يعني زيادة التسمم في الكائنات الحية (Pacin وآخرون, 2001).

وأشار Jimenez وآخرون(1997) الى أمكانية انتاج سم الـ Zen من انواع الفطر *Fusarium* والمعزولة من الموز. كما ذكر Blaney وDodman(2002) أن الفطر *Fusarium pseudograminearum* والذي تم عزله من تفرعات Tillers للحنطة والشعير من منطقة جنوب كوينزلاند في أستراليا و الفطر *F. graminearum* والمعزول من حبوب الحنطة والذرة البيضاء والسمسم من شمال كوينزلاند أنهما منتجين لسم الـ Zen الى جانب سموم الـ DON وNIV. وبين Pallaroni (2003) أن الأطوار الجنسية للفطر *Fusarium* لها القابلية على أنتاج سم الـ Zen وهي الـ *fujikouri Gibberella* و *Gibberella zeae*. وسجل مغلس(2004) أن أكثر أنواع الفطر *Fusarium* وجودا في حبوب الذرة الصفراء لعام 2003 هو نوع الفطر *Fusarium moniliform* بنسبة تراوحت بين 55-86%.

4.2.أيض الزيرالينون

سم الزيرالينون سريع الإمتصاص من قبل جسم الحيوانات المختبرية عند أعطائه عن طريق الفم. إذ إن موضع التأيض لهذا السم يكون في الكبد فيتحول الى نظيرين isomers مختلفين للزيرالينون هما الفا زيرالينون وبيتا زيرالينون فضلاً عن Zeralenol ويمكن أن يحدث هذا التأيض في الغدة النخامية والأمعاء الدقيقة في الخنازير فضلاً عن أمكانية تحوله الى مركب β-estradiol-17(الجميلي, 2014).

كذلك أظهرت الدراسات المختبرية تحولات للسم في كل من كريات الدم الحمر والغشاء المخاطي في الأمعاء الدقيقة (Miksicek, 1994). أن سم الزيرالينون يخضع أثناء عمليات التحول الثانوي (الأيض) للعديد من تفاعلات الأرتباط وأنتاج الـ glucuronide، وقد لوحظت أختلافات تعتمد على نوع الحيوان المعاملة بالسم ففي الخنازير لوحظ وجود أختلاف في الـ glucuronide الناتج من تحول الـ Zearalenone والـZeralenol -α في المقابل فأن معظم الزيرالينون الموجود في الجرذان هو مركب حر

او يكون على شكل glucuronid. كما لوحظ أن هناك أختلافات في مسارات الطرح للسم ونواتجه, فالطرح في الجرذان والفئران عن طريق المرارة. أما في الأرانب والخنازير والأنسان فيكون أثناء طرح البول.وبناءً على ذلك فانَّ هناك أختلافات في نصف حياة الزيرالينون وعمليات الأيض له إذ إن أختفائه يكون بطيء في الحيوانات،ووجد أن أفرازه في المقام الأول يكون عن طريق البول بدلاً من المرارة.

الزيرالينون وأيضه يكونان مرتبطان هيكلياً وأيضاً في الفعالية السمية إذ إن تأثيرها يكمن في قدرتها على التشكل الجزيئي المماثل لـ 17−β−estradiol والتي ثبت قدرتها على الإرتباط بمستقبلات هرمون الأستروجين في عدد من الأنظمة النسيجية في المختبر كالرحم وغدد الثدي والكبد في الأنواع المختلفة من الحيوانات المختبرية. إذ أشارت التقارير الى أن التعرض الى 17−β-estradiolيؤدي الى حدوث سرطان الثدي كون الزيرالينون يؤدي في زيادة التأثير على الإستروجين العام في النساء(Ahamed وآخرون, 2001؛ Shier وآخرون,2001). ويعتبر الزيرالينون وعناصره أقل كفاءة في الأرتباط بمستقبلات هرمون الاستروجين من الأسترادول إذ إن الكفاءة النسبية (1−0.01). كما وجد أختلاف في كفاءة الأرتباط بين الزيرالينون وعناصره مع هرمون الأستروجين في المستقبلات الحشوية للرحم في الفأر فكان α- Zearalenone< β- Zearalanol < Zearalanol(Magan و Olsen, 2004).

5.2.سمية الزيرالينون

يتعرض الإنسان والحيوان للسموم الفطرية بطرق مباشرة عن طريق الملامسة المباشرة مع الجلد او الإستنشاق او الإستهلاك المباشر لغذاء ملوث بالسموم الفطرية, أو غير مباشر من خلال إستهلاك منتجات حيوانية تكون ملوثة بالسموم الفطرية أو مشتقاتها كالحليب أو البيض أو لحوم الحيوانات التي تغذت سابقاً على أعلاف ملوثة بالسموم الفطرية (Peraica وآخرون, 1999). وبينت الدراسات التي نفذت على الحيوانات المختبرية(جرذان بيض, خنازير , ارانب, فئران) أن السمية الحادة Acute toxicity لسم

الزيرالينون تكون منخفضة إذ يحتاج لاحداثها في الحيوان الى جرعة عالية تتراوح بين 4000-20000 ملغم/كغم عند إعطائها عن طريق الفم(Hidy وآخرون, 1977). اما السمية المزمنة Chronic toxicity فتنتج عن طريق قدرة هذا السم على الإرتباط بمستقبلات هرمون الإستروجين, مما يؤدي الى ظهور اعراض مرضية مختلفة, تتمثل بإنخفاض الخصوبة وزيادة موت الأجنة ونقصان في وزن الحيوانات المعاملة بهذا السم وصغر حجم الجنين(Machey وJones, 2000) ووجد Edwards وآخرون(1987) أن الخنازير اكثر حساسية لسم الزيرالينون من القوارض إذ إن التركيز 40 مايكروغرام/كغم كافي لإحداث التسمم فيها. ويُعَد التسمم المزمن اشد خطورة من التسمم الحاد بسبب احتمال حدوث السرطانات والطفرات الوراثية في هذا النوع من التعرض. وقد أثبتت دراسات السمية المزمنة طويلة الأمد(لمدة سنتين) أن استهلاك الزيرالينون(0, 50, 100) ملغم/كغم لمدة 103 اسبوع يؤدي الى حدوث الأورام في الكبد والغدة النخامية في الفئران(NTP, 1982). ووجد Dailey وReese (1980) وجود أعلى نسبة لسم الزيرالينون كانت في اكباد الدواجن وبصورة اقل في العضلات والهيكل العظمي كما بين وجود اكثر من 90%من مشتقات ايض الزيرالينون في صفار البيض الذي تضعه. وفي دراسة اخرى عند تغذية الدواجن بجرعة عالية (100 ملغم/كغم) وجد ان السموم الفطرية تراكمت بكمية اكبر في الكبد وبصورة اقل في العضلات والهيكل العظمي(Mirocha وآخرون, 1982). وأظهرت بعض الدراسات امكانية تراكم سم الزيرالينون في كل من الانسجة الحيوانية ومنتجاتها, حيث تم العثور على الزيرالينون في اكباد الخنازير والتي تم تغذيتها على الزيرالينون في ظروف تجريبية(James وSmith, 1982). كما تم العثور على الزيرالينون في اكباد وحليب الخنازير عند تغذيتها على حبوب ملوثة بالفطر الذي يفرز السم ولاحظ حصول التهاب الفرج في الخنازير التي تم تغذيتها على اعلاف مخزونة والتي كانت ملوثة بالزيرالينون (Sandor, 1984). وذكر Gaumy وآخرون(2001) أن الخنازير الأكثر حساسية للزيرالينون بجرع السم الحادة بينما تعتبر الدواجن الأكثر مقاومة, كما تم العثور على آثار الزيرالينون في الخيول والدواجن والماشية (Bloomquist وآخرون,

1982؛ Gimeno و Quintanilla, 1983؛ Branton وآخرون, 1989). وذكر Tomaszweski وآخرون(1998) ان السموم الفطرية غالباً مايتم الكشف عنها في انسجة بطانة الرحم في النساء اللاتي يعانين من وجود غدد في بطانة الرحم كما لوحظ حصول تفكك بانسجة بطانة الرحم بينما لم يتم الكشف عن الزيرالينون في عينات مأخوذة من نساء اصحاء. كما ان التقييم الذي اجرته منظمة الأغذية والصحة العالمي(JECFA)(2000) كشف عن حصول تضخم في الجينات يحتاج الى جرعات تتجاوز بكثير الجرعات التي تؤثر على الهرمونات واشار ايضا الى ان حدوث الأورام يرجع الى تأثر هرمون الإستروجين من السموم الفطرية. واستناد الى هذه البيانات اقترح كمية قصوى مقبولة قدرها 0.2 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم يومياً. ووجد Friend وآخرون(1990) ان الزيرالينون يؤدي الى حدوث اورام في الجرذان التي عاشت أكثر من سنة خاصة في الغدة النخامية والرحم. ان استهلاك المواد الاستروجينية التأثير كالزيرالينون بكميات كبيرة في الأغذية الملوثة خطير جداً لأنه لايؤثر جنسياً فقط انما يؤدي الى سرطان الكبد وتشوهات خلقية في الأجنة وجلطات(Thromboembolia) وذلك بسبب وجوده في حليب المواشي والبيرة المصنوعة من الذرة (Malekinejad وآخرون, 2007). ووجد Feng وآخرون(2008) ان التركيزات الواطئة من الزيرالينون واحد جزء بالمليون يمكن أن تؤدي الى التأثير في هرمون الإستروجين في الخنازير والتركيزات الأعلى يمكن ان تسبب العقم وإنخفاض الدافع الجنسي وصغر حجم الجنين والإجهاض. وفي دراسة عن تأثير سم الزيرالينون و α-Zearalenol في الحيوانات المنوية في الخنازير حول تأثير السم في هيكل كروماتين الحيمن وحركته حيث أثر السم سلباً على استقرار هيكل الكروماتين في حين كان تأثيرالـ α-Zearalenol أكثر على حركة الحيوانات المنوية وتعتبر حركة الحيوانات المنوية واحدة من اهم المعايير في تقييم قدرة الحيوانات على الإخصاب كما وجد انه يؤدي الى تضخم الغدد الثدية وحصول حالات تورم في قلفة الذكور (Benzoni, 2008). وادى معاملة فئران الألبينو بالزيرالينون بجرعتين (10,5)غم/كغم الى حدوث اختزالاً في الإنقسام المايتوزي ثبت ان سم الزيرالينون مادة سامة خلوياً(El-Makawy

وآخرون,2001). ووجد Collins وآخرون(2006) ان الزيرالينون يسبب امراض في القلب والدماغ والكلى والمبيض في الفئران عند معاملتها بالسم. كما ان سم الزيرالينون يؤثر على الميكروبات إذ أثر على بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* وادى الى حصول طفرات وراثية, كما انه لايؤثر على الخميرة *Saccharomyces cerevisiae*, واثر في الإنقسام الثنائي في بكتريا الـ *Bacillus subtilis* وحفز البكتريا على تكوين مواد سامة مختلفة قوية وضعيفة حسب السلالات إذ اجريت التجربة على هذه السلالات في المختبر وادى الى حصول تغيير في كروموسوم الخلية واختلاف في الكروماتيدات المتشابهة(Kuiper وآخرون, 1987).

6.2.مستويات تعرض الإنسان لسم الزيرالينون

حددت مستويات تعرض الأفراد في كندا لسم الزيرالينون بـ 0.19 مايكروغرام/يوما أي مايعادل تناول0.003 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم يوميا(Kuiper وآخرون، 1987). وأشارت البيانات من دول الشمال الى أن مستويات الأستهلاك تتراوح بين 0.48 مايكروغراما يوميا في الدنمارك و الى 0.46 مايكروغراما يوميا في النرويج (Ericksen وAlexander، 1998) كما قدرت منظمة الصحة العالمية WHO (2000) مستويات إستهلاك الأشخاص لسم الزيرالينون الى أكثر من 3.5 مايكروغرام في الشرق الأوسط وأكثر من 3.3 مايكروغرام في الشرق الأقصى وأكثر من 2.5 مايكروغرام في أفريقيا وأكثر من 2.2 مايكروغرام في أمريكا اللاتينية وأكثر من 1.5 مايكروغرام بالنسبة للنظام الغذائي الأوربي (أوربا وأمريكا الشمالية وأستراليا). أما بالنسبة لأثار الزيرالينون السامة على الأنسان فذكرته دراسة أجريت في بولندا بيّنت إن السموم الفطرية توجد في بطانة الرحم للنساء اللواتي يعانين من أمراض بطانة الرحم وفي بعض الحالات يكون السم في نسيج بطانة الرحم أي ضمن مكونات نسيج بطانة الرحم إذ لايمكن الكشف عنه ما لم يتم الكشف عنه في الخزعات المأخوذة من إمرأة سليمة (Tomaszweski وآخرون, 1998). ووجد أن حدوث البلوغ في سن

مبكر في بورتريكو بين الأعوام 1981 و1984 يشتبه في أنه يعزى الى تناول أغذية ملوثة بسم الزيرالينون أو الـ Zearalenol(Saenz وآخرون، 1985).

كما تم الكشف عن سم الزيرالينون أو عناصره في بلازما الدم وعزى السبب الى أن اللحوم المنتجة محليا أعطت نتائج أيجابية في الكشف عن سم الزيرالينون(Alldrick و Knight, 2000).

كما اشارت دراسة أجريت في شرق هنكاريا الى وجود الزيرالينون في مصل الدم للمرضى وكذلك في الغذاء الذي تغذت عليه (Zwierzchowski وآخرون, 2005). وذكرت الوكالة الدولية للأبحاث السرطانية IARC (1993) أن سم الزيرالينون قد يسبب أمراض سرطانية للأنسان.

7.2.العوامل المساعدة على نقل الـ .*Fusarium* spp المنتج للزيرالينون

إن أرتفاع التلوث بالسموم الفطرية للأغذية والأعلاف حضي بالكثير من الأهتمام العالمي في الأونة الأخيرة بسبب تأثيراتها السلبية على الصحة وأثارها الأقتصادية إذ اشارت منظمة الصحة العالمية (WHO, 1998) الى ان سموم Fumonisin و الـ Zearalenone فضلاً عن السموم أخرى متواجدة في كل من الذرة والحنطة والشعير في مناطق مختلفة من أمريكا وأسيا وأوربا (Muller وآخرون،1997). كما لوحظ أن زيادة نسب إصابة محصول الذرة الصفراء بالفطر *Fusarium graminirum* في كندا عزيّ الى دور الحشرات والطيور اذ انها تعمل على نشر لقاح الفطر في الحقول كما وجد أيضاً وجود علاقة إيجابية بين مقدار الضرر الذي تسببه الطيور والحشرات ومستوى التلوث بالـ Zearalenone(Gilbertson وآخرون, 1986). كما لوحظ أرتفاع مستويات الأصابة الفطرية بالفطر .*Fusarium* spp في المحاصيل التي تنتشر فيها حشرة الخنفساء الغربية(دودة جذر الذرة ــ الحنطة) *Diabrotica virgifera* بالمقارنة مع المحاصيل التي لم تكن مصابة بالخنفساء, كما تعتبر هذه الخنفساء ناقل للفطريات *Fusarium moniliforme* و *Fusarium subglutinans*. يحتاج الفطر المنتج للزيرالينون وخاصة أنواع العائدة

لجنس *Fusarium* في الحبوب والبذور لأحداث أصابة للنبات عن طريق لقاح الفطر المتمثل بالأبواغ الكبيرة (Macroconidia) أو الأبواغ الصغيرة (Microconidia) أو كليهما واحيانا بفعل الأبواغ الكلاميدية(Chlamydospores) بعدها ينمو الفطر داخل أنسجة النبات ومن ثم تلوث البذور به كما ان الفطر *Fusarium* يحتاج الى محتوى مائي يقدر بـ 25%أي عندما يكون النشاط المائي مقداره 0.98 ودرجة حرارة 25م° لكي تنجح الأصابة وينتج سم الزيرالينون كما وتعتبر سموم الـ *Fusarium* سموم ميدانية اي تتكون في الحقل وتنتج في مراحل متأخرة من تطور سنابل الحنطة(Cahagnier وآخرون, 1995؛ Marin وآخرون, 1999).

8.2.بكتريا الـ *Bacillus subtilis*

يعود الجنس *Bacillus* الى عائلة Bacillaceae التابعة لرتبة Bacillales ضمن صنف Bacilli التابع لشعبة Fimicutes العائد للمملكة البكتيرية Bacteria (Todar, 2009). تمتاز هذه البكتريا بشكل خلاياها العصوي Rodshape مفردة ومستقيمة موجبة لصبغة كرام, وموجبة لأختبار الكاتاليز, تواجدها الطبيعي في التربة درجة الحرارة المثلى لنموها تتراوح بين25–35%م°اي تستطيع تحمل درجات الحرارة العالية (Madigan وMartinko, 2005). تنمو بكتريا الـ *B. subtilis* على الاوساط الزرعية الاعتيادية مكونة مستعمرات كبيرة غير منتظمة او دائرية الشكل وتكون معتمة(غير شفافة) ومجعدة وذات لون كريمي او بني او رمادي او برتقالي او اصفر تنمو بدرجة حرارة تتراوح بين(15–50) م° (Setlow, 2006).

تتواجد بكثرة في التربة وفي المخلفات النباتية والبقايا العضوية المتحللة وغير المتحللة حيث تستطيع هذه البكتريا تحمل الظروف غير الملائمة للنمو مثل درجات الحرارة العالية والقاعدية والحامضية المتطرفة بسبب قدرتها على تكوين سبورات داخلية تمنحها المقاومة العالية (Collee وآخرون, 1996).

كما اشارت المصادر العلمية الى ان اكثر الأنواع التابعة للجنس *Bacillus* من الممكن ان تتواجد في التربة او داخل انسجة الجذور او منطقة المحيط الجذري (Coombs و Franco, 2003). وهذه البكتريا تمتلك مدى واسعاً من التكييف الفسيولوجي الذي مكنها من البقاء على قيد الحياة والنمو في الظروف البيئية القاسية وذلك من خلال تكوينها السبورات الداخلية Endospore المقاومة للظروف البيئية القاسية وهذه الصفة المميزة في بكتريا الـ *B.subtilis* في السيطرة على المسببات المرضية الفطرية كونها تتحمل درجات الحرارة المرتفعة والجفاف (Broadbent وآخرون, 1971). فضلاً عن امتلاكها جدار خلوي مكون من عدة طبقات من مادة الـ Peptidoglycan وافرازها مضادات حيوية ببتيدية Peptide وانزيمات خارج خلوية (Mcspadden-Gardener, 2004). كما يمكنها تحطيم المركبات العضوية كالدهون والكربوهيدرات والأحماض الأمينية والبكتين والسيليلوز والكايتين والكربوهيدرات المتعددة وجعلها مصدراً للطاقة والكاربون (Todar, 2009). تستطيع هذه البكتريا مقاومة ظروف اخرى مثل الحموضة,القاعدية,الازموزية,الأكسدة والحرارة وتكون هذه المقاومة منظمة بالعامل سكما Sigma الذي يتحفز عندما تتعرض البكتريا لمثل هذه الظروف (Bandow و Hecker, 2002). وبين Chen وآخرون (2007). قدرة بكتريا الـ *B.subtilis* في انتاج المضادات الحيوية المتعددة البروتينات الدهنية مثل Surfactin والـ Bacillomycin و Bacillysin و Difficidin و Macrolactin و Bacillibactin التي لديها القدرة على تثبيط العديد من المسببات الممرضة. كما تنتج بكتريا الـ *B.subtilis* بعض المواد الأيضية المثبطة للفطريات بسبب انتاجها للـ Subtiline و Bacitracin و الـ Bacillin التي تعود الى مجموعة الـ Iturine كما أن أنتاج بعض المضادات يعود الى امتلاك البكتريا المادة الوراثية المسوؤلة عن أنتاجها (Ara, 2007). كما تنتج بكتريا الـ *B.subtilis* انواعاً مختلفة من الإنزيمات التي تعمل على تحليل المركبات البوليميرية إذ يؤدي ذلك الى تقليل فعالية ونمو المسببات المرضية على النبات فتفرز انزيم الـ Amylase الذي يعمل على تحليل النشأ والـ Protease الذي يقوم بتحليل البروتين وانزيم الـ Lipase

بالأضافة الى انزيم الـ Chitinase الذي يعمل على تحليل مادة الكايتين والتي تعتبر احد مكونات جدران الخلايا (Morikawa, 2006). وأشار الباحث نفسهُ الى ان هذه البكتريا تعمل على توفير تغطية حيوية (Biofilm) وهي تجمع للخلايا البكتيرية بكثافة عالية في منطقة المحيط الجذري للنبات وبذلك تعمل على مقاومة ومنع نمو المسببات المرضية النباتية وذلك من خلال افرازها العديد من المضادات الحيوية.وبين Idrissوآخرون(2002) قدرة بكتريا *B.subtilis* في افراز انزيم الـ Phytase الذي يعمل على تحطيم مادة الـ Phytic acid والذي يكون موجوداً في جدران اكثر الفطريات.

9.2.البكتريا المتواجدة في الألبان

تحتوي الألبان على العديد من الأنواع البكتيرية والتي تم تشخيصها من أجل الحصول على عزلات ذات أهمية أقتصادية ومنها بكتريا حامض اللاكتيك الشائعة الإستخدام في أنحاء العالم لأنتاج الأغذية المتخمرة وتعتبر هذه البكتريا آمينة ولا تسبب مخاطر صحية فهي تعرف على أنها GenerallyRecognized as Safe (GRAS) (Dunne وآخرون, 2001). إذ إنها تعطي منتجات الألبان المتخمرة القوام المناسب(Fryer وRossi، 2004), وتساعد في رفع القيمة الغذائية والصحية لهذه المنتجات(Rinkinen وآخرون, 2003).

تساعد عملية اضافة المعزز الحيوي Probiotic الى الغذاء في تحفيز الشهية وبقاء الدهون والنتروجين والكالسيوم لمدة أطول في القناة الهضمية، وهذا يؤكد أهمية الأحياء المعوية التي تتواجد بصورة طبيعية، والتي يكمن دورها في امتصاص الغذاء الذي يتم تناوله من قبل المضيف (Guandalini, 2000). وتكمن فعالية بكتريا حامض اللاكتيك بكونها منتجة للبكتريوسينات والتي تعتبر مركبات مضادة للمايكروبات تنتج من قبل عدة أنواع من البكتريا وتكون ذات تأثير مثبط لنمو البكتريا الحساسة لها, في بعض الأحيان فأن البكتريوسينات تثبط البكتريا ذات قرابة أو صلة وراثية للبكتريا المنتجة لها,وبعض الأحيان يمتد مداها الى أنواع أخرى غير الأنواع القريبة الصلة بالبكتريا المنتجة, وتكون هذه البكتريوسينات

ذات طبيعة بروتينية كما أن بكتريوسينات بكتريا حامض اللاكتيك تكون عبارة عن ببتيدات ذات أوزان جزيئية واطئة(Hanlin وآخرون, 1993). كما انه يدخل في عملية الأيض لبعض المواد الغذائية مثل الدهون والبروتينات والنشويات والمعادن وايضاً يدخل في صناعة الفيتامينات Niacin و Biotin (Edens, 2003). تتواجد عدة أجناس من البكتريا في الألبان أهمها *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* حيث تنتج هذه البكتريا مجموعة من الأحماض المتنوعة مثل حامض اللبن والخل وتنتج أيضاً مواد النكهة كالـ diacetyl والـ acetyldehyde إذ تعطي الأخيرة النكهة المميزة والتقليدية لمنتجات الألبان, كما وتنتج هذه البكتريا الأسيتوين acetoin من تخمر الكلوكوز حيث تعطي بذلك نكهة مميزة للمنتجات المتخمرة و الأسيتوين هو مركب من مركبات النكهة والذي يكون diacetyl (Citak وآخرون, 2004). وتتميز بكتريا حامض اللاكتيك بكونها ذات صفات متغايرة عن بعضها البعض لكنها تمتلك عدة صفات مشتركة إذ تتميز في كونها عصيات او كريات موجبة لصبغة كرام, غير مكونة للابواغ, وغير متحركة فضلاً عن انتاجها حامض اللاكتيك كناتج رئيسي لأيض التخمر بالإضافة الى استخدامها اللاكتوز كمصدر رئيسي للكاربون وإنتاج الطاقة (Cotter و Hill, 2003). واستخدمت بكتريا حامض اللاكتيك بسبب فعاليتها الحيوية في حفظ الأغذية حيث تم استخدامها في بعض عمليات تصنيع الأغذية البشرية والحيوانية والتي اشير اليها في العديد من الدراسات حيث انها تعمل على اطالة عمر حفظ الأغذية وحمايتها بإستخدام الاحياء المجهرية الطبيعية Carr)Normal Microflora وآخرون, 2002). كما أعتبرت من المعززات الحيوية من خلال محافظتها على صحة الأنسان وتعزيزها وذلك من خلال نشاطها الأيضي والنواتج التي تفرزها حيث إنها تستطيع منافسة الممرضات وتحفيز الجهاز المناعي وبالتالي تقلل من تأثير المضادات الحيوية على الجسم (Aattouri, 2002) و لهذه المعززات دورٌ في علاج الأسهال وحالات الأمساك وتسهم أيضاً في خفض مستوى الكوليسترول في الدم وغيرها (Reid

وآخرون, 2001؛ Pea وآخرون,2004). كما تلعب دوراً في علاج اصابات الكبد والمجاري البولية (Jenkins وآخرون,2003 ؛ Kontiokari وآخرون, 2001).

10.2.بكتريا *Lactobacillus plantarum*

يعد هذا النوع من البكتريا من أهم الأنواع المستخدمة في مجال الحفظ الحيوي للأغذية بسبب فعاليتها التثبيطية ضد أنواع البكتريا والفطريات(Sachnurer وMagnusson، 2005) إذ تتواجد في القناة الهضمية للإنسان وخاصة الطبقة الطلائية للأمعاء بالاضافة الى الغشاء المخاطي للأثني عشري وتعتبر من الكائنات الحية النافعة للأنسان, وتكمن فعاليتها التثبيطية في الأغذية من خلال منافستها على المغذيات بالاضافة الى إنتاج العديد من المواد الأيضية ذات التأثير التثبيطي لنمو الأحياء المجهرية كالحوامض العضوية وبيروكسيد الهيدروجين وثاني أوكسيد الكاربون والبكتريوسينات(Valerio وآخرون, 2004) بالأضافة الى إفرازها السكريات المتعددة التي تفرز الى خارج الخلية(Ricciardi وClemeti,2000). وظيفة المضادات الحيوية لهذه البكتريا تمتاز بفعلها التضادي وكفائتها ضد الألتهابات وتعزيز الحصانة والتأثير على تمايز الخلايا الظهارية وأنتشارها وتعزيز وظيفة الحاجز المعوي(Preidis وVersalovic, 2009). وهذه البكتريا قادرة على إنتاج الفيتامينات إذ تنتج فيتامين(B) الذي يحتاجه الجسم دائماً بالأضافة الى فيتامين(B-2) وفيتامين(B-12) وتستخدم لتضخيم الـ Cobalamin الذي يستخدم لأكثار الجليسرين(Mozzi وآخرون, 2010). كما ذكر Adawi (1999) ان هذه البكتريا تحفز الكبد على إفراز إنزيمات الـ asparate-transaminase AST و انزيم الـ alanine-transaminase ALT. كما وأنها تقلل من زيادة نفاذية الأمعاء المرتبط بإنسداد قناة الصفراء(Wullt وآخرون, 2007).

3.المواد وطرائق العمل Materials and Methodds

1.3.المواد والاجهزة المستخدمة في الدراسة

1.1.3.الاجهزة و المعدات المستخدمة في الدراسة

ت	اسم الجهاز		الشركة المصنعة	المنشأ
1	أطباق بتري	Petri Dishes	Afco	Jordan
2	أوراق ترشيح	Fillter Paper		
3	ميزان حساس	Sensetive Balance	Denver Instrument	Germany
4	جهاز التعقيم البخاري	Autoclave	Lap Tech	Korea
5	مجهر ضوئي مركب	Compound light microscope	Optika	Italy
6	حاضنة	Incubator	Memmert	Germany
7	ثلاجة	Refrigerator	Ishtar	Iraq
8	جهاز الأشعة فوق البنفسجية	U.V. Light	Cleaver	England
9	ميزان	Balance	Camary	India
10	عدة تشريح	Dissecting Set	Anatomy Kit	China
11	شرائح زجاجية وأغطيتها	Slides and Cover slides	China Mheco	China
12	دوارق زجاجية	Flasks	Volac	England
13	ثاقب الفلين	Cork Borer	-	India
14	أنابيب شعرية	Capillary tubes	Vitrex	China
15	غرفة العزل	Hood	Tianjin Taisite	China
16	أنابيب مانعة التخثر	EDTA tubes		China
17	أنابيب أختبار	Test tubes	-	China
18	هزاز كهربائي	Electric shaker		England
19	حاحة	Burette	-	China
20	جهاز الطرد المركزي	Center fugi		Germany
21	فرن كهربائي	Oven	Memmert	Germany
22	حاضنة لا هوائية	Anaerobic jar	-	China
23	ماصات مختلفة الأحجام	Pipettes	HumaPette	Germany

2.1.3.الكواشف والمحاليل والصبغات والمواد الكيمياوية المستخدمة في الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة المصنعة	المنشأ
1	صبغة كرام Gram stain	Sigma–Aldrich	USA
2	كاشف كوفاكس Kovacs reagent	BDH	England
3	كاشف إنزيم السايتوكروم أوكسيديز Cytochrom oxidase indicator	BDH	England
4	محلول بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide solution	Scharlau	Spain
5	كحول أثيلي Ethyl alcohol	–	Iraq
6	محلول اليود Iodine solution	Scharlau	Spain
7	كلوريد الصوديوم Solution chloride	–	Iraq
8	مضادات حيوية Antibiotics	Samarra	Iraq
9	هايبوكلورات الصوديوم Sodium hypochlorite	–	Iraq

3.1.3.الأوساط الزرعية المستخدمة في الدراسة

ت	الوسط الزرعي	الشركة المصنعة	المنشأ
1	وسط البطاطا دكستروز آكار Potato Dextrose Agar	Himedia	India
2	وسط الأكار المغذي Nutrient Agar	Himedia	India
3	وسط المرق المغذي Nutrient Broth	Himedia	India
4	وسط آكار الدم Blood Agar	Himedia	India
5	وسط آكار النشأ Starch Agar	Himedia	India
6	وسط سايمون ستريت الصلب Simon Citrate Agar	–	India
7	وسط تخمر السكريات Sugars Fermentation	–	India
8	وسط الببتون Peptone Water	–	India
9	وسط آكار اليوريا Urea Agar	–	India
10	وسط الحركة Motility Medium	Himedia	India
11	وسط الليسثينيز Lecithinase Medium	–	*

2.3.طرائق العمل

1.2.3.تحضير الأوساط الزرعية

حضرت الأوساط التالية بحسب الشركة المجهزة وعُقمت الأوساط بجهاز التعقيم البخاري (Autoclave) بدرجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند/انج² لمدة 20 دقيقة.

1.1.2.3.وسط البطاطا دكستروز آكار (P.D.A) Potato Dextrose Agar

حُضّر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة وبعد تعقيمها ترك الوسط ليبرد قليلاً وأضيف له المضاد الحيوي(Chloramphenicol) بمقدار 125ملغم/لتر ثم صُب في أطباق بتري لتنمية الفطريات ودراسة الصفات المظهرية.

2.1.2.3. وسط الأكار المغذي (N.A) Nutrient Agar

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة, إستخدم هذا الوسط لتنمية البكتريا ودراسة الصفات المظهرية.

3.1.2.3.وسط المرق المغذي (N.B) Nutrient Broth

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة, وإستخدم هذا الوسط لغرض تحضير اللقاح البكتيري.

4.1.2.3.وسط آكار الدم (B.A) Blood Agar

حُضر الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة, بعد ذلك بُرد الى درجة حرارة 45م°, ثم اضيف اليه 5% من دم الأنسان(Macfaddin, 2000) وصب في أطباق بتري معقمة, إستخدم في التحري عن قدرة البكتريا على تحلل الدم.

5.1.2.3.وسط آكار النشا Starch Agar (S.A)

حضر الوسط بإضافة 3 غم من خلاصة لحم و 5 غم ببتون و 4 غم نشأ و 9 غم أكار الى 1 لتر من الماء المقطر, أستخدم لمعرفة قابلية البكتريا على تحليل النشأ(Bradshaw, 1979).

6.1.2.3.وسط سايمون ستريت الصلب Simon Citrate Agar (S.C.A)

حضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة, وتم توزيعه في أنابيب أختبار زجاجية بواقع 5 مل للإنبوبة الواحدة وبعد ذلك عقمت بجهاز التعقيم البخاري وتركت لتبرد قليلا ثم وضعت بشكل مائل حتى يتصلب الوسط, إستخدم هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على إستهلاك السترات كمصدر للكاربون(Macfaddin, 2000).

7.1.2.3.وسط تخمر السكريات Sugars Fermentation (S.F)

حضر بإضافة 10 غم ببتون و 5 غم كلوريد الصوديوم Nacl و 0.018 غم احمر الفينول Phenol red الى 1 لتر من الماء المقطر, ووزع الوسط في أنابيب أختبار زجاجية بواقع 5 مل, عقمت الأنابيب بجهاز التعقيم البخاري وعند أنتهاء التعقيم تركت لتبرد ثم تمت أضافة محاليل أنواع السكريات المعقمة بواسطة الترشيح بإستخدام أغشية الترشيح الدقيقة بثقوب قطرها 0.22 µm بتركيز 1% ,أستخدم هذا الوسط للتحري عن قابلية البكتريا على تخمير السكريات(Macfaddin, 2000).

8.1.2.3.وسط الببتون Peptone Water (P.W)

حضر بإضافة 15 غم من الببتون في 1 لتر من الماء المقطر وعقم بجهاز التعقيم البخاري وبعد أنتهاء مدة التعقيم ترك ليبرد ثم وزع في أنابيب أختبار, إستخدم هذا الوسط لمعرفة قابلية البكتريا على تحول الحامض الأميني التربتوفان الى اندول(Macfaddin, 2000).

9.1.2.3.وسط الحركة Motility Medium (M.M)

حضر بحسب تعليمات الشركة المصنعة ثم وزع في أنابيب أختبار بواقع 5 مل لكل أنبوبة ثم عقمت الأنابيب بجهاز التعقيم البخاري, وأستخدم هذا الوسط للكشف عن قابلية البكتريا على الحركة(Collee وآخرون, 1996).

10.1.2.3. وسط الليسيثينيز Lecithinase Medium (L.M)

حضر 100 مل من وسط .N.A الذي تم تعقيمه بجهاز التعقيم البخاري وبعد ذلك ترك ليبرد حتى درجة حرارة 45 م°,ثم أضيف اليه 5 مل من مح بيضة دجاج (تم تعقيم سطح البيضة الخارجي بالكحول الأثيلي وسُحب المح بواسطة محقنة معقمة) حرك المزيج جيداً حتى يتجانس وصب في أطباق بتري قطر 9 سم وتركت الأطباق حتى تصلب الوسط وإستخدم لمعرفة قابلية البكتريا على أنتاج الليسيثينيز (Macfaddin, 2000).

11.1.2.3.وسط الرز

حُضر الوسط بأتباع طريقة Abbas وآخرون(1984) المحورة من قبل الورشان(1999), بأخذ 200غم من حبوب الرز ثم أُضيف له 125مل من الماء المقطر المعقم في أطباق زجاجية قطر 20سم وأرتفاع 5سم وتركت الأطباق لمدة ساعتين.بعد ذلك عقمت بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121م°وبمقدار 15باوند/انج² وكررت عملية التعقيم بعد مرور 24 ساعة حيث استخدم هذا الوسط لتنمية الفطر *Fusarium* spp. وأختبار قدرته على أنتاج سم الزيرالينون.

2.2.3.عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء

1.2.2.3.جمع العينات

جمعت25عينة من حبوب الذرة الصفراء المحلية والمستوردة من الأسواق المحلية خلال الفترة الممتدة من 2016/5/1 الى2016/10/1 من محافظة كربلاء و واسط و بابل وبمعدل1كغم لكل عينة ووضعت العينات في أكياس نايلون وسجل عليها رقم العينة وتاريخ الجمع وموقع أخذ العينة ثم نقلت الى مختبر أبحاث الدراسات العليا في قسم وقاية النبات/كلية الزراعة لإجراء الدراسات اللاحقة عليها.

2.2.2.3.عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء

أتبعت طريقة Lacey وآخرون(1999) لعزل فطر الـ *Fusarium* من الحبوب إذ أخذت 100 حبة من كل عينة عشوائياً من العينات التي تم جمعها. وتم تعقيمها بأستخدام هايبوكلورات الصوديوم تركيز 2% لمدة دقيقتين ثم غسلت الحبوب بالماء المقطر المعقم مرتين لأزالة آثار المادة السامة وجففت بورق ترشيح معقم. ونقلت بواسطة ملقط معقم الى أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على 20 سم^3 من الوسط الزرعي PDA بواقع 5 حبات لكل طبق و 5 أطباق لكل عينة بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25±2 م° لمدة 3–7 أيام, بعد ذلك تم تنقية عزلات الفطريات المرافقة للحبوب وزرعت كل عزلة على نفس الوسط الزرعي PDA وحضنت تحت درجة حرارة 25±2م° لمدة أسبوع ومن ثم شخصت العزلات الفطرية بالأعتماد على المفاتيح التصنيفية لكل من Booth (1971) وSeifert (1996) وWatanabe(2002). بعد ذلك حفضت العزلات الفطرية في أنابيب أختبار نظيفة ومعقمة حاوية على وسط PDA المعقم بصورة مائلة Slant إذ زرعت أقراص من هذه العزلات على الوسط الزرعي في كل أنبوبة وحضنت تحت درجة حرارة 25±2 م° لمدة أسبوع ثم وضعت في الثلاجة في درجة 4م° لحين أستخدامها, وبعد الإنتهاء من تشخيص عزلات الفطريات المعزولة من حبوب الذرة الصفراء تم حساب النسب المئوية للظهور لعزلات الفطريات وفقاً للمعادلة التالية:

$$\text{النسبة المؤية للظهور} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{العدد الكلي للعينات}} \times 100$$

(Booth وآخرون, 1988)

كذلك تم حساب نسب تردد عزلات الفطريات وبحسب المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر في العينات}}{\text{عدد العزلات الكلية للفطريات}} \times 100$$

Rajasinghe وآخرون(2009)

3.2.3.دراسة قابلية عزلات الفطر .*Fusarium* spp على أنتاج سم الزيرالينون

أختبرت قابلية 18عزلة من الفطر .*Fusarium* spp والمعزولة من الذرة الصفراء على انتاج سم الزيرالينون وفق الخطوات التالية:

1.3.2.3.تحضير وسط الرز وتنمية الفطر .*Fusarium* spp عليه

اتبعت طريقة Ishii وآخرون(1974) بتنمية عزلات الفطر .*Fusarium* spp واستخلاص سم الزيرالينون وكما يلي:

حُضر هذا الوسط كما مر في الفقرة 13.1.2.3 ولوث الوسط بعد تبريده بأقراص العزلات الفطرية النقية وكان قطر القرص الواحد1سم من طرف العزلة النقية التي تم تنميتها على وسط الـ PDA بواسطة ثاقب فليني وعملت ثلاثة مكررات لكل عزلة مع التحريك المستمر للأطباق لضمان توزيع متجانس لأبواغ الفطر ثم وضعت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25±2م° لمدة أسبوعين ثم بعد ذلك خفضت درجة الحرارة الى13±2م° لمدة أسبوعين أيضاً لتحفيز الفطر على إنتاج السم.بعد أنتهاء مدة الحضن جفف وسط الرز في الفرن تحت درجة حرارة 45م°.

2.3.2.3.أستخلاص سم الزيرالينون من وسط الرز

تم أستخلاص سم الزيرالينون من وسط الرز المنمى عليه الفطر *Fusarium* وجفف بوضع العينة في الفرن بدرجة حرارة 45م° وطحن 50غم من العينة ووضع في دورق زجاجي, وأُضيف له مزيج من25مل ماء مقطر و250مل كلوروفورم ورج الخليط بعد ذلك لمدة 30 دقيقة بجهاز الهزاز الكهربائي,ثم رشح الخليط من خلال ورق ترشيح Watman No.2 وجمع الراشح في دورق زجاجي لغرض تنقيته وكررت هذه العملية على عزلات الرز المنماة عليها عزلات الفطر *Fusarium*(Ishii وآخرون, 1974).

3.3.2.3.تنقية سم الزيرالينون

أتبعت طريقة Scott وآخرون(1981) لتنقية سم الزيرالينون وفقاً للخطوات التالية:

1.أستعمل عمود كروماتوغرافي طوله 75سم وقطر1.4سم وضع في أسفله قليل من الصوف الزجاجي.

2.أُضيف له 5غم من كبريتات الصوديوم اللامائية(Na_2SO_4) لتكون قاعدة لأستقرار السليكا.

3.أخذ 10غم من السيليكا(60G) ونشط بدرجة حرارة 110م°ولمدة 10دقائق بعدها أضيف 5مل من الكلوروفورم رج المزيج ثم مرر عبر العمود

4.أضيف 15غم من كبريتات الصوديوم اللامائية وبهذا أصبح عمود الفصل جاهز للأستعمال.

5.أُضيف للعمود 50مل من مستخلص الرز المنمى عليه عزلة الفطر *Fusarium* .

6.أمرر عبر العمود 150مل هكسانn-Hexane ثم 150مل من بنزين وأهمل راشح الهكسان والبنزين.

7.مرر 250 مل من خليط بنزين–أسيتون(9–1).

جمع الراشح الأخير بدورق زجاجي وركز الى 2مل وحفظ في المجمدة في درجة حرارة 4م° لحين اجراء الكشف.

4.3.2.3.السم القياسي

تم الحصول على السم القياسي لسم الزيرالينون من مختبر السموم الفطرية في كلية العلوم الطبية التطبيقية بتركيز 250 مايكروغرام/مل.

5.3.2.3.الكشف عن سم الزيرالينون

أستعملت في هذه الدراسة صفائح السيليكا جل الرقيقة Thin Layer Chromatograpy (TLC) ذات أبعاد20 x 20 وبسمك0.25 ملم تم تنشيط هذه الصفائح في فرن كهربائي على درجة حرارة110 م°لمدة ساعة واحدة. عمل خط مستقيم خفيف على صفيحة الـ TLC يبعد بمسافة 2سم من الأعلى والأسفل وتركت مسافة1.5سم من كل جانب أيضا, بعد ذلك أستخدم السم القياسي الذي حضر كما في الفقرة 4.7.2.3 للمقارنة مع المستخلص من ناحية شدة التألق وقيمة نسبة الجريان Rf حيث وضع 10مايكروليتر بواسطة أنبوبة شعرية ثم أُضيف مستخلص كل عينة من العينات المراد الكشف عن السم فيها. بعد ذلك تركت الصفيحة لحين جفاف البقع عليها ثم وضعت في حوض فصل زجاجي يحوي نظام الفصل بنزين– أسيتون(90–10) مل والذي تم تحضيره مسبقاً. تركت الصفيحة في الحوض لحين وصول مزيج نظام الفصل الى ماقبل2سم من الحافة العليا للصفيحة,تم أستخراج الصفيحة من الحوض بعد أكتمال الفصل وتركت لتجف تحت ظروف المختبر بعدها فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي365 نانوميتر وبعد ذلك تم مقارنة لون التألق ومعامل الترحيل للسم

القياسي مع العينات وتم تحديد العينات المنتجة للسم. حسبت نسبة الجريان(معامل التظهير) Rate of flow Rf حسب المعادلة التالية:

$$Rf = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المركب}}{\text{المسافة التي يقطعها نظام الفصل}} \times 100$$

(Ishii وآخرون, 1974).

4.2.3.التشخيص الجزيئي للفطر *F.verticillioides*

1.4.2.3.استخلاص الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA)

استخلص الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) باتباع الطريقة المشار اليها من قبل شركة Zymo-Research وباستخدام العدة (Cat. No. D6005) المجهزة من قبل الشركة المذكورة أعلاه وتمت عملية الاستخلاص بإتباع الخطوات الاتية:

1. أُضيف 50-100 ملغم من الفطر ووضع في أنبوبة الاختبار (BashingBead™ Lysis Tube) وأضيف لها 750 µl من بفر Xpedition™ Lysis/Stabilization

2. رج الانبوبة باستخدام الجهاز الهزاز (Vortex).

3. اجراء عملية انتباذ بسرعة 11390 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد .

4. نقل 400 مايكروليتر من الراشح الى الفلتر (Zymc-Spin™ IV Spin Filter) ووضعها في انبوبة تفاعل Collection Tube مع اجراء عملية انتباذ 9462 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة.

5. أُضيف 1200 مايكروليتر من البفر (Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer) الى انبوبة الجمع(Collection Tube).

6. نقل 800 مايكروليتر من الخليط الى انبوبة الاختبار (Zymc-Spin™ IIC Column) والموضوع في انبوبة الجمع(Collection Tube) ثم اجريت عملية انتباذ بسرعة 11390 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة.

7. التخلص من الراشح ثم اجراء عملية انتباذ بسرعة 11390 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة.

8.اضافة 200 مايكروليتر من البفر (DNA Pre-Wash Buffer) الى الفلتر (Zymc-Spin™ IIC Column) الموضوع في انبوبة جمع جديدة ومن ثم اجريت عملية انتباذ بسرعة 11390 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة ومن ثم التخلص من الراشح .

9. اضافة 500 µl مايكروليتر (Fungal/Bacterial DNA wash Buffer) الى الفلتر (Zymc-Spin™ IIC Column)) واجريت عملية انتباذ 11390 دورة/دقيقة لمدة 1 دقيقة والتخلص من الراشح.

10. وضعت مكونات انبوبة(Zymc-Spin™ IIC Column) في انبوبة اختبار جديدة واضيف له 100مايكروليتر من البفر (DNA Elution Buffer) ثم اجريت عملية انتباذ بسرعة 11390 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية على درجة حرارة 4م°بعدها تم الاحتفاظ بالحامض النووي DNA في درجة حرارة -20م° لحين الاستعمال.

2.4.2.3.تقدير تركيز الـ DNA ونقاوته

أضيف 100 مايكروليتر من محلول الـ DNA الى 10مل من محلول الاذابة TE وقدر أمتصاص المحلول للضوء فوق البنفسجي على الطول الموجي 260 و 280نانومتر بجهاز قياس الطيف الضوئي Spectrophotometer وحسب تركيز الـ DNA كما يلي:

تركيز DNAملغم/مل = مقدار الأمتصاص على الطول الموجي 260نانومتر في 1مل من حجم العينة × مقلوب التخفيف × 100/50

أما نقاوة الحامض النووي DNA فحسبت وفق المعادلة الاتية (Sambrook وآخرون، 1989)

$$\text{نقاوة DNA} = \frac{\text{مقدار الأمتصاص على الطول الموجي 260نانومتر}}{\text{مقدار الأمتصاص على الطول الموجي 280نانومتر}}$$

3.4.2.3.تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR)

أُستعمل أختبار تفاعل البلمرة المتسلسل لتضخيم DNA الفطر *Fusarium verticillioides* وتشخيصه باستعمال العدة (Maxime PCR PreMix(i-Taq),Cat.No.25026) المجهزة من قبل شركة iNtRoN الكورية المنشأ.

وأستُعمِلَ البادئ الأمامي(TCCGTAGGTGAACCTGCGGG:ITS1) والخلفي (TCCTCCGCTTATTGATATGC:ITS4) أجري تفاعل البلمرة المتسلسل بحجم 20 مايكروليتر وفق الكميات المبينة في(جدول1).

جدول(1) مواد تفاعل البلمرة المتسلسل

ت	مكونات التفاعل	الحجم
1	Primer Forward(ITS1)	1 مايكروليتر
2	Primer Reverse (ITS4)	1 مايكروليتر
3	الحامض النووي المستخلص(DNA)	1 مايكروليتر
4	H_2O (Nuclease-free water)	17 مايكروليتر
5	Master Mixe	5 مايكروليتر

تم وضع جميع المكونات أعلاه في الأنبوبة المجهزة من قبل الشركة المصنعة. بعدها تمت مضاعفة الحامض النووي للفطر المعزول باستعمال برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)(Zhang وآخرون, 2012) كما مبين في(جدول2)

جدول(2) برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

ت	خطوات التفاعل	الحرارة م°	الزمن	عدد الدورات
1	مسخ الـ(DNA)الأولي (Initial denaturation)	94	5دقائق	1
2	مسخ الـ(DNA)النهائي (Final denaturation)	94	40ثانية	35
3	أرتباط البادئ (Primer annealing)	55	40ثانية	
4	أستطالة البادئ (Initial extention)	72	1دقيقة	
5	أستطالة البادئ النهائية (Final extention)	72	5دقيقة	1
6	Hold	4	غيرمحدود	

4.4.2.3.الترحيل الكهربائي باستعمال هلام الأكاروزAgarose gel electrophoresis

1.اعداد لوح التحميل:أستعمل لوح بلاستيكي ذو أبعاد تلائم حوض الترحيل الكهربائي احيطت حافات الحوض بشريط لاصق قوي مقاوم للحرارة ,ثبت عليه مشط خاص لتكوين حفر في الهلام من احد طرفيه.

2.حضر الهلام بإذابة 1غم من الاكاروز في 100مل من محلول TBE مع التسخين لحين تحول الخليط الى محلول رائق ثم يضاف 5مايكروليتر من مادة الأثيديوم بروماید بعد انخفاض درجة حرارة الخليط الى40-45م°.

3.سكب محلول الاكاروز برفق على اللوح البلاستيكي لتفادي تكون فقاعات هوائية وترك بدرجة حرارة المختبر ليتصلب.

4.رفع المشط من الهلام برفق ورفع الشريط اللاصق بعد تصلب الهلام ووضع اللوح مع الهلام في حوض الترحيل(50X25X10 سم) وغمر بالمحلول الدارئ X1-TBE.

5.وضعت 10 مايكروليتر من الـ DNA المضاعف الى كل حفرة من حفر طبقة الهلام بواسطة ماصة دقيقة مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة.كما وأضيف 5مايكروليتر من الـ DNA)

(ladder marker) في الحفرة الموجودة في الجانب الايسر من العينات المضافة والذي أستعمل لتحديد أحجام الحامض النووي المضاعف.

6.أوصلت الأقطاب للتيار الكهربائي وجهز بتيار كهربائي بفرق جهد 150 ملي أمبير لمدة ساعة واحدة.

7.عرض الهلام للأشعة فوق البنفسجية(UV) بعد أنتهاء الترحيل, بعدها تم تصوير الهلام.

5.4.2.3.تحليل تسلسل قواعد الحامض النووي(DNA) للفطر *Fusarium verticillioides*

أرسلت نواتج تضاعف الحامض النووي للفطر (PCR amplicons) مع البوادئ (ITS1 وITS4) الى شركة Macrogen الكورية لغرض تحديد التتابع النيوكلوتيدي وبالأتجاهين الأمامي والخلفي للنواتج المضاعفة من عزلة الفطر. حللت التتابعات النيوكلوتيدية بأستخدام برنامج (Basic Local Aligment Search Tool) (BLAST) لمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center for Biotechnology Information)(NCBI) والتي تعود لنفس العزلات الفطرية والتي تم تشخيصها عالمياً.

5.2.3.عزل البكتريا من اللبن

جمعت عينات من لبن أكتيفيا الموجود في الأسواق المحلية للفترة الممتدة من 2016/7/1 الى 2016/10/1 وعملت سلسلة من التخافيف لكل عينة من العينات قيد الدراسة حيث تم التخفيف بواسطة محلول ملحي فسلجي وتراوحت التخافيف (10^{-1}–10^{-6}) بعد ذلك حضر الوسط Nutrient agar كما في الفقرة 2.1.2.3 وصب في أطباق وتركت لتتصلب ثم أخذ من التخفيف الـ10^{-6} كمية بمقدار 0.1 مل ونشر على سطح الطبق بواسطة ناشر زجاجي معقم وتم عمل أربع مكررات للتخفيف بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 35 م°لمدة 24 ساعة في وعاء زجاجي خالي من الأوكسجين (Collee وآخرون, 1996). تم تشخيص نوع وجنس البكتريا بالإعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية والأختبارات الكيموحيوية بحسب ما جاء به كل من Nour (1998) وكما يأتي:

1.5.2.3.الصفات المظهرية

لُقحت أطباق بتري حاوية على N.A بمستعمرة بكتيرية نقية مفردة وحضنت لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 35±2م°بعدها تم دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية من حيث شكل وقوام ولون المستعمرة .

2.5.2.3.الصفات المجهرية

تم تحضير شريحة زجاجية نظيفة ووضع عليها غشاء بكتيري من مزرعة بكتيرية بعمر 24 ساعة وجرى تصبيغها بصبغة كرام وفُحصت تحت المجهر الضوئي بالعدسة الزيتية تحت قوة تكبير X100 وتمت ملاحظة شكل الخلية و إستجابة البكتريا للصبغة .

3.5.2.3.الإختبارات البايوكيميائية

1.إختبار الليسيثينيز Lecithinase Test

لُقح الوسط الذي تم تحضيره كما في الفقرة 10.1.2.3 بمستعمرة بكتيرية بعمر 24 ساعة وحُضنت الاطباق لمدة 48 ساعة على درجة حرارة35±2م°, إذ إن تكوّن مواد رائقة في الوسط وحول المستعمرات يُعدُّ مؤشراً على إيجابية الإختبار (2000,Macfaddin).

2.إختبار تحلل الدم Blood Hemolysis test

لقح الوسط الذي تم تحضيره في الفقرة 4.1.2.3 بالبكتريا بعمر 24 ساعة وحُضنت لمدة24 ساعة في درجة حرارة 37م°, ويعد حصول تحلل للوسط مؤشراً على أيجابية الإختبار(Collee وآخرون, 1996).

3.إختبار التحري عن إنزيم الكاتاليز Catalase Enzyme test

وضعت بعض قطرات من محلول بيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 بتركيز 3% على شريحة زجاجية ووضعت بعد ذلك مسحة من المستعمرة البكتيرية النامية بعمر 24 ساعة, إذ إن تكون الفقاعات يعد مؤشراً على أيجابية الإختبار (Macfaddin, 2000).

4.إختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation test

تم إجراء هذا الإختبار لمعرفة قدرة البكتريا على إستهلاك مصادر الكاربوهيدرات(Glucose، Maltose، Mannitol, Ribose، Lactose, Xylose) بعد ان حُضر وسط تخمر السكريات وتم تعقيمه أضيفت السكريات كلاً على إنفراد بتركيز 1% بعدها تم تلقيح الأنابيب بعدة قطرات من العالق البكتيري وحُضنت لمدة 48 ساعة في درجة حرارة35 ±2 م°, إذ إن تحول لون الوسط من اللون الأحمر الى اللون الأصفر يعد مؤشراً على إيجابية الأختبار, وهذا يدل على إرتفاع الحامضية بسبب تخمر السكر (Macfaddin, 2000).

5.إختبار الأندول Indol test

أستخدم هذا الأختبار للكشف عن قابلية البكتريا على تحويل الحامض الأميني التربتوفان الى إندول, إذ تم تلقيح انابيب الأختبار الحاوية على وسط ماء الببتون بمستعمرة بكتيرية بعمر 24 ساعة وحضنت لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 35±2 م°, بعد ذلك تم إضافة عدة قطرات من كاشف كوفاكس(Kovac's reagent) ويُعَدُّ تكون حلقة حمراء بين الكاشف والوسط مؤشراً على إيجابية الإختبار (Macfaddin, 2000).

6. إختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test

لقح وسط آكار النشأ المعقم والمصبوب في أطباق بتري بمستعمرة بكتيرية عمرها 24 ساعة بعدها حضنت الأطباق لمدة 3–7 أيام على درجة حرارة35±2م°, وبعد إنتهاء مدة الحضن أضيف1مل من محلول اليود لكل طبق, إن ظهور مناطق شفافة حول المستعمرات يُعدُّ مؤشراً على ايجابية الإختبار, وهذا يدل على قدرة البكتريا على تحليل النشأ(Symbert وKrieg, 1981).

7.إختبار التحري عن إنزيم اليوريز Urease enzyme test

لُقح وسط غراء اليوريا المعقم والموزع في أنابيب إختبار بعد تصلبه بشكل مائل(Slant) بالبكتريا قيد الدراسة بعمر 24 ساعة بطريقة الطعن بوساطة إبرة التلقيح المستقيمة وحُضنت المزارع على درجة حرارة 35±2م° لمدة 48 ساعة, إن تغير لون الوسط من اللون الأصفر الى اللون الأحمر يُعَدُّ مؤشراً على إيجابية الإختبار, وهذا يدل على إنتاج البكتريا لإنزيم Urease الذي يحول اليوريا الى أمونيا وثاني اوكسيد الكاربون(Forbes وآخرون, 2007)

8.إختبار استهلاك السترات Citrate utilization test

لقح وسط السترات المعقم والموزع في انابيب إختبار زجاجية بعد تصلبه بشكل مائل(Slant) بالبكتريا قيد الدراسة بعمر24 ساعة, حضنت المزارع بدرجة حرارة 35±2م° لمدة 24 ساعة, إن تحول سطح الوسط من اللون الأخضر الى اللون الأزرق يعد مؤشراً على إيجابية الإختبار(Collee وآخرون, 1996).

9.إختبار فعالية إنزيم الأوكسيديز Oxidase test

وضعت بعض قطرات من كاشف الاوكسديز (Phenylenediamine) المحفز على ورقة ترشيح ثم نقلت كمية قليلة من المستعمرات البكتيرية بواسطة قضيب زجاجي فوق ورقة الترشيح, ان تلون المستعمرات بلون بنفسجي بعد10 ثوان هو دليل على النتيجة الموجبة(Macfaddin, 2000).

4.5.2.3.الإختبارات الفسيولوجية

1.**إختبار الحركة Motility test**

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط الذي تم تحضيره في الفقرة 9.1.2.3 بمزرعة بكتيرية بعمر 24 ساعة بطريقة الطعن بواسطة ابرة التلقيح المستقيمة والمعقمة وحضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 35±2 م° ان ظهور النمو البكتيري خارج منطقة الطعن يُعَدُّ مؤشراً على إيجابية الإختبار ودليل على أن البكتريا متحركة(Collee, 1996).

2.إختبار تنمية البكتريا في ظروف لاهوائية Anaerobic Growth

لُقحت أطباق حاوية على وسط .N.A الذي تم تحضيره كمافي الفقرة 2.1.2.3 بمزرعة بكتيرية بعمر 24 ساعة وحُضنت لمدة 72 ساعة على درجة حرارة 35±2م° بظروف لاهوائية بوضعها داخل جفنة زجاجية محكمة معدة لهذا الغرض ومفرغة من الهواء, إن ظهور النمو البكتيري يعد مؤشراً على إيجابية الإختبار ودليلاً على قدرة البكتريا على النمو في ظروف لاهوائية(Norris وآخرون, 1981).

3.إختبار تحمل الملوحة

حُضرت عشرة دوارق زجاجية سعة100مل ووُضع في كل دورق 70مل من وسط.N.A وأضيف للدورق الاول ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 1 و2% للدورق الثاني وهكذا حتى نصل الى إضافة 10% للدورق العاشر, بعدها تم تعقيم هذه الاوساط بجهاز التعقيم البخاري(Autuclave) وبعد إنتهاء مدة التعقيم ترك الوسط لحين وصول درجة الحرارة الى 45م° بعدها صب في أطباق بتري وبواقع أربعة مكررات لكل تركيز ثم تركت الأطباق لحين تصلب الوسط, بعدها أُضيف 0.1 مل من عالق البكتريا النامي في وسط.N.B بعمر 24 ساعة الى الأطباق ونُشر العالق على سطح الوسط بواسطة ناشر زجاجي معقم(Spreader), بعدها حضنت الأطباق لمدة24 ساعة على درجة حرارة 35±2م°, وتم ملاحظة نمو البكتريا في جميع التراكيز وتحديد أعلى تركيز يمكن ان تنمو فيه البكتريا(Collee وآخرون, 1996).

5.5.2.3. تحضير لقاح البكتريا *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus*

بعد تشخيص بكتريا الـ *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus* تم اكثارها على وسط.N.B المعقم في دوارق زجاجية سعة 500 مل كل على حدة وبعد التعقيم ترك ليبرد ثم لقحت بالبكتريا *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus* من مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة نامية على وسط N.A وحضنت الدوارق لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 35±2م°(Holt وآخرون, 1994).

6.5.2.3. حفظ عزلات بكتريا *L. plantarum* و *L.rhmnosus* و*S.thermophilus*

حُفظت العزلات البكتيرية في انابيب اختبار حاوية على وسط .N.A بشكل مائل(Slant) في الثلاجة تحت درجة حرارة 4م°.

6.2.3. تقييم كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا الـ *B.subtilis* واللقاح البكتيري لبكتريا الـ *L.plantarum* في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط PDA

تم تحضير وسط الـ PDA كما مر في الفقرة 1.1.2.3 اذ تم توزيع الوسط على خمسة دوارق سعة250 وبمعدل125مل لكل دورق وعقم بجهاز التعقيم البخاري ثم ترك لتنخفض درجة حرارته الى 45م° تقريبا, بعدها أضيف1.25غم من المستحضر الحيوي للدورق الأول(10^6X5مستعمرة/غم) وللدورق الثاني اضيف له لقاح البكتريا الـ *L.plantarum* (1مل/دورق) (10^6X5مستعمرة/مل) وبعد الأضافة تم رج الدوارق جيداً والدورق الثالث أضيف له لقاح بكتريا *B.subtilis* وبنفس الكمية السابقة والدورق الرابع ترك بدون اضافة اي شئ للمقارنة, صبت محتويات كل دورق في ثلاثة أطباق بتري وتركت لكي تتصلب بعدها لقحت ثلاثة أطباق حاوية على بكتريا الـ *B.subtilis* بأقراص 0.5ملم من الفطر *F.verticillioides* وبواقع قرص واحد/طبق وكررت العملية ذاتها عى ثلاثة أطباق حاوية على بكتريا*L.plantarum* وتركت ثلاثة أطباق حاوية على بكتريا *B.subtilis* وثلاثة أطباق أخرى حاوية على بكتريا *L.plantarum* بدون تلقيح بالفطر أما معاملة المقارنة فلقحت بالفطر*F.verticillioides* فقط. بعدها حسبت أقطار نمو الفطر في الأطباق وحسبت نسبة التثبيط بحسب معادلة Abbott الواردة في كتاب المبيدات(شعبان والملاح, 1993)

$$\text{نسبة التثبيط}(\%) = \frac{R2-R1}{R1} \times 100$$

R1: أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر في معاملة المقارنة (الفطر فقط)

R2: أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر في معاملة الفطر+ البكتريا

7.2.3. تقييم كفاءة اللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum* على الكتلة الحيوية للفطر *F.verticillioides* على وسط N.B.

حضر وسط المرق المغذي N.B. بحسب تعليمات الشركة المصنعة وكما موضح في الفقرة 3.1.2.3 وبستة دوارق زجاجية معقمة حجم 250مل وبمعدل 100مل وسط/دورق بعدها عقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121م° وضغط 1جو لمدة 20دقيقة بعدها لقحت ثلاثة دوارق منها بخمسة مستعمرات من بكتريا *L.plantarum* لكل دورق وحضنت بدرجة حرارة 35±2م° لمدة 24ساعة بعدها لقحت جميع الدوارق الستة(ثلاثة ملقحة بالبكتريا وثلاثة بدون بكتريا) بأقراص الفطر 5ملم من مستعمرة الفطر *F.verticilloides* بعمر أسبوع وبواقع قرص واحد قطر 0.5ملم لكل دورق حضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 25±2م° لمدة أسبوع بعدها حسب الوزن الرطب للكتلة الحيوية للفطر *F.verticilloides* وذلك بألتقاطها بواسطة ملقط ثم وضعت على ورق ترشيح لتجف من الماء الحر ثم وزنت بأستخدام ميزان حساس وسجلت النتائج كما تم حساب الوزن الجاف وذلك بتجفيف الكتلة الحيوية من خلال وضعها في فرن كهربائي تحت درجة حرارة 45م° لمدة 48 ساعة بعدها وزنت بميزان حساس وسجلت النتائج(Laitila وآخرون, 2002).

8.2.3. تقييم كفاءة نوعي البكتريا *B.subtilis* و *L.plantarum* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الإصابة بالفطر *F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون تحت ظروف الخزن الطبيعي

نفذت هذه التجربة وفقاً للخطوات التالية:

1.8.2.3. تحضير لقاح عزلة الفطر *F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون

حضرت أبواغ الفطر بأضافة 10 مل من الماء المقطر لكل طبق من الأطباق المنمى عليها الفطر بعمر اسبوع واحد وبعد أضافة الماء المقطر عُمل حصاد لأبواغ الفطر من الطبق بواسطة قضيب زجاجي معقم بعدها تم حساب أعداد الأبواغ بواسطة شريحة الـ Haemocytometer.

2.8.2.3.المستحضر الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis*

تم الحصول على الـ Bacilline المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* من مختبر السموم الفطرية في كلية العلوم الطبية التطبيقية. والمحضر من قبل العاشور (2009).

3.8.2.3.تحضير لقاح بكتريا الـ *Bacillus subtilis*

حُضر وسط .N.B في دوارق زجاجية كما ورد في الفقرة3.1.2.3 ثم أُضيفت خمس مستعمرات من البكتريا *B.subtilis* لكل دورق والتي سبق عزلها من المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* على وسط المرق المغذيNutrient agar ثم حضنت الدوارق بدرجة حرارة 35±2م° لمدة24 ساعة بعد ذلك عمل سلسلة من التخافيف (10^{-1}–10^{-5}) أخذ 1مل من التخفيف10^{-5} وزرع على وسط N.A. (محضر مسبقاً) وبواقع 1مل/طبق كررت العملية أربع مرات(أربعة مكررات) بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 35±2م° لمدة24 ساعة(Collee, 1996).

بعدها حسبت أعداد المستعمرات في الاطباق ولكل تخفيف ثم أخذ معدل أعداد المستعمرات في التخفيف10^{-5} وحسبت اعداد البكتريا في المليلتر الواحد بحسب معادلة Clark(1965).

عدد خلايا البكتريا (مل)= معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

وبذلك يكون تركيز خلايا البكتريا هو$5x10^{6}$وحدة تكوين مستعمرة/مل

4.8.2.3.تنفيذ المعاملات على حبوب الذرة الصفراء

تم تنفيذ المعادلات على حبوب الذرة الصفراء كما مبين في الجدول ادناه:

جدول(3) تنفيذ المعاملات على الذرة الصفراء

المعاملة	توصيف المعاملة
فطر *F.verticillioides* فقط	حبوب ملوثة بلقاح الفطر*F.verticillioides*فقط المنتج للسم(20 مل/كغم)
مستحضر البكتريا *B.subtilis* فقط	حبوب ملوثة بمستحضر البكتريا *B.subtilis* فقط (5غم/كغم)
لقاح البكتريا *B.subtilis* فقط	حبوب ملوثة بلقاح بكتريا *B.subtilis* فقط(20مل/كغم)
لقاح البكتريا *L.plantarum* فقط	حبوب ملوثة بلقاح بكتريا *L.plantarum*(20مل/كغم)
فطر *F.verticillioides*+ مستحضر *B.subtilis*	حبوب ملوثة بأبواغ الفطر *F.verticillioides*(20مل/ كغم) + مستحضر البكتريا *B.subtilis* (5 غم/كغم)
فطر *F.verticillioides* + لقاح بكتريا *B.subtilis*	حبوب ملوثة بأبواغ الفطر *F.verticillioides* (20مل/ كغم) + لقاح بكتريا *B.subtilis* (20مل/كغم)

فطر *F.verticillioides* + لقاح بكتريا *L.plantarum*	حبوب ملوثة بأبواغ الفطر *F.verticillioides* (20مل/ كغم) + لقاح بكتريا *L.plantarum* (20مل/كغم)
معاملة سيطرة	حبوب تمت معاملتها بـ (20 مل/كغم) ماء مقطر فقط

وبثلاث مكررات لكل معاملة بعدها وضعت حبوب الذرة لكل معاملة بثلاثة اكياس من البولي فينايل كلورايد وبواقع 100غم للكيس أعقب ذلك خزن الأكياس تحت ظروف المختبر ولمدة ثلاثة أشهر, وتم حساب نسبة اصابة حبوب الذرة بالفطر بعد مرور شهر وبعد مرور ثلاثة أشهر من الخزن. بأخذ عينة عشوائية بوزن 10غم من كل مكرر ولكل معاملة وتم تعقيمها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة دقيقتين بعدها غسلت بماء مقطر معقم وزرعت على وسط PDA الذي تم تحضيره كما في الفقرة 1.1.2.3 وبواقع خمس حبات لكل طبق وبثلاثة مكررات لكل معاملة, بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25±2م° لمدة أسبوع بعدها تم حساب نسبة الحبوب المصابة, كما في المعادلة الأتية:

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد الحبوب المصابة}}{\text{عدد الحبوب الكلية}} \times 100$$

(ميخائيل وبيدر, 1982)

9.2.3. تقييم كفاءة بكتريا الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون في الزجاج خارجياً(*In vitro*)

1.9.2.3.تحضير سم الزيرالينون

بعد تحديد عزلات الفطر *Fusarium* المنتجة لسم الزيرالينون وتشخيصها تم أختيار العزلة الأكفأ من عزلات الفطر *F.verticillioides* المنتجة لسم الزيرالينون إذ تمت تنمية هذه العزلة على وسط الرز كما في الفقرة 1.3.2.3 ومن ثم تم أستخلاص سم الزيرالينون كما في الفقرة2.3.2.3 وتنقيته كما مبين في الفقرة الـ3.3.2.3 والكشف عنه كما في الفقرة 5.3.2.3 كررت العملية لحين الحصول على الكمية المناسبة 1900 ملغم من السم.

2.9.2.3.معاملة سم الزيرالينون بلقاح بكتريا الـ *L.plantarum*

تم تهيئة وسط N.B كما في الفقرة 3.1.2.3 ثم وزع على أربعة أنابيب إختبار بواقع 5 مل لكل إنبوبة إختبار لقحت إنبوبتان من الانابيب الأربعة بخمس مستعمرات من بكتريا *L.plantarum* لكل إنبوبة بعدها أضيف 500مايكروغرام من سم الزيرالينون لكل انبوبة إختبار وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 35±2م° لمدة 48ساعة بعدها تم إستخلاص سم الزيرالينون بإضافة 5مل من الكلوروفورم لكل انبوبة ثم رجت كل انبوبة بصورة جيدة بعدها تركت لمدة ثلاثين دقيقة, اذ تم أخذ الطبقة العليا(طبقة الكلوروفورم) ثم ركزت الى 1مل بوضع الأنابيب في فرن كهربائي بدرجة 40م° اذ تم وضع 15مايكروليتر من السم القياسي أولاً على بعد 2سم من الحافة اليمنى ووضعت نفس الكميات من مستخلص(السم فقط) ومستخلص(البكتريا+السم) على لوحة TLC وبمسافة 2سم بين بقعة وأخرى.

ورحلت هذه العينة على لوحة الـ TLC بعدها عرضت اللوحة للأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي 365نانوميتر وتم ملاحظة توهج بقع مستخلصات المعاملات المدروسة.

10.2.3.اختبار فعالية لقاح بكتريا الـ *L.plantarum* المعزولة من اللبن في حماية النظم الحيوية للجرذ الأبيض من التأثيرات السمية لسم الزيرالينون داخلياً(*In vivo*)

1.10.2.3.تهيئة الحيوانات

تم تهيئة 28 حيوانا من ذكور الجرذ الأبيض بعمر 8–10 أسابيع وبأوزان تراوحت 200–250غم وقسمت الى أربع مجاميع ضمت كل مجموعة أربعة حيوانات.

2.10.2.3.معاملة الحيوانات

تمت معاملة الحيوانات وفقا لما مبين في أدناه:

1.معاملة لقاح البكتريا+سم الزيرالينون: جرعت الحيوانات في اليوم الأول بلقاح البكتريا الذي تم تحضيره وفقا للفقرة الـ(5.5.2.3) بجرعة 1 مل/ كغم بعمر 48 ساعة ثم جرعت بعد 24 ساعة بسم الزيرالينون 100 ملغرام/كغم من وزن الحيوان.

2.معاملة البكتريا فقط: جرعت الحيوانات بلقاح البكتريا (5×10^6) فقط بمقدار 1 مل/كغم من وزن الحيوان.

3.معاملة اللبن+معاملة سم الزيرالينون: جرعت الحيوانات اولاً 1 مل/كغم من اللبن وبعد 24 ساعة جرعت بسم الزيرالينون 100 ملغم/كغم من وزن الحيوانات.

4.معاملة اللبن فقط: جرعت الحيوانات باللبن(1مل/كغم) من وزن الحيوانات.

5.معاملة سم الزيرالينون فقط: جرعت الحيوانات بسم الزيرالينون وبجرعة مقدارها 100ملغرام/كغم من وزن الحيوانات.

6.معاملة بوسط الـ N.B: جرعت الحيوانات بالوسط الذي تم تحضيره كما في الفقرة الـ3.1.2.3 بمقدار (1مل/كغم) من وزن الحيوانات.

7.معاملة السيطرة: تم معاملة الحيوانات بالماء المقطر المعقم وبمقدار (1مل/كغم) من وزن الحيوانات.

كررت عملية التجريع بواقع سبع مرات ولمدة أربعة عشر يوماً مع متابعة الأعراض السريرية التي يمكن أن تظهر على الحيوانات المعاملة أثناء فترة التجريع, ثم تركت لمدة أربعة أيام بعدها خُدرت الحيوانات بمادة الكلوروفورم وتم سحب عينات الدم بطريقة طعنة القلب ووضعت في أنابيب أختبار حاوية على الـ(EDTA) لأجراء فحوصات الدم الفسيولوجية بعد ذلك شرحت الحيوانات عن طريق فتح التجويف البطني وأخذت عينات من أعضاء (القلب و الكبد و الطحال و الأمعاء الدقيقة و الكلية) وحفظت في الفورمالين تركيز 10% لدراسة التغيرات النسيجية فيها (Brown, 1976).

11.2.3.المعايير المدروسة

1.11.2.3.قياس المعايير الفسلجية

أُجري حساب الأختبارات الفسلجية للدم في جهاز الـ Humacount(الماني الصنع) في مختبر التحليلات المرضية /كلية العلوم الطبية التطبيقية/جامعة كربلاء, حيث تم أعطاء تقرير كامل لكل معاملة من المعاملات وتضمن حساب مايلي:

A. معدل التعداد الكلي لخلايا الدم اللحمر (RBCs)

B. معدل التعداد الكلي لكريات الدم البيض (WBCs)

C. حساب معدل الهيموكلوبين الكلي (Hb)

D. حساب معدل الخلايا الليمفاوية Lymphocyte

E. حساب معدل الخلايا وحيدة الخلية Monocyte

F. حساب عدد الصفائح الدموية Platelets

G. حساب متوسط وزن هيموغلوبين كرية الدم الحمراء MCH

H. حساب متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء MCHC

I. حساب متوسط حجم خلية الدم الحمراء MCV

J. حساب معدل مكداس الدم (الهيماتوكريت) (PCV) Hematocrit (HCT)

2.11.2.3.الدراسة النسيجية

تم عمل المقاطع النسيجية لأعضاء القلب والكبد والكلية والأمعاء الدقيقة والطحال وحضرت في مستشفى الكفيل التخصصي في محافظة كربلاء المقدسة, اذ اتبعت طريقة Bancroft و Stevens(1982) والتي تضمنت الخطوات التالية:

- **الأنكاز Dehydration**

مررت النماذج في تراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي (70 , 80 , 90 , 95 , 100)% لمدة 1.5–2 ساعة في كل تركيز وذلك لإزالة الماء منها:

- **الترويق Clearing**

روقت العينات بالزايلين مرتين ولمدة1–1.5ساعة لكل مرة وذلك لإزالة محلول الأنكاز من الأنسجة.

- **التشريب Infiltration**

شربت العينات بشمع البرافين المنصهر بدرجة حرارة 56 م°وذلك بوضع العينات فيها مرتين ولمدة 1-1.5ساعة لكل مرة.

- **الطمر Embedding**

طمرت العينات في قوالب خاصة حاوية على شمع البرافين المنصهر وتركت لتتصلب .

- **التقطيع Sectioning**

حضرت مقاطع نسيجية متسلسلة بسمك5 مايكرومتر بأستعمال جهاز المشراح الدوار (Rotary microtome) وثبتت النماذج على شرائح زجاجية بإستخدام لاصق البومين ماير (Meyer's albumine) بعدها وضعت الشرائح في الفرن بدرجة 56م°بصورة عمودية لمدة 20 دقيقة لإزالة الشمع الزائد .

- **التحميل Mounting**

وضع غطاء الشريحة بإستعمال كندا بلسم. وبعدها تم تشخيص مدى سلامة المقاطع النسيجية من قبل د. نزار عزيز متعب.اختصاص علم الأمراض النسيجية. بورد عراقي. مستشفى الحسين. كربلاء المقدسة.

12.2.3.التحليل الأحصائي

نفذت التجارب المختبرية على وفق التصميم العشوائي الكامل وحللت النتائج بإستعمال برنامج التحليل الأحصائي(SAS) وقورنت المتوسطات بحسب أختبار أقل فرق معنوي(LSD) تحت مستوى معنوية (0.05).

4.النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4.عزلات الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء

أظهرت نتائج(جدول4) عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء, التي تم عزلها من 25 عينة شملت محافظات كربلاء و واسط و بابل وجود العديد من الفطريات التي شملت 10 انواع تعود لخمسة اجناس والتي تعود الى الفطريات الناقصة(Deuteromycetes) والى الفطريات اللاقحية(Zygomycetes) والكيسية(Ascomycetes) وبلغ العدد الكلي للعزلات 356 عزلة وهذه الأجناس هي *Aspergillus* و *Fusarium* و*Rhizopus* و *Mucor* و *Penicillium* تصدر الجنس .*Aspergillus* spp المرتبة الأولى وبنسبة ظهور في العينات بلغت96% وبنسبة تردد 73.31%, اما الجنس *Rhizopus* فقد احتل المرتبة الثانية وبنسبة ظهور بلغت36% وبنسبة 16.01% كما وظهر الجنس .*Fusarium* spp بالمرتبة الثالثة وبنسبة ظهور32% وبنسبة تردد 5.33% اما الأجناس *Mucor* و *Penicillium* فكانت نسبة الظهور16% لكل منهما وبتردد 2.8% و2.52% على التوالي.

نتائج هذه الدراسة كانت مقاربة لما وجده الحديثي كل من (2005) وسلومي(2007) والقيسي(2010) والخفاجي (2014) في سيادة الفطر *Aspergillus* وتفوقه على باقي الفطريات في نسب تكرارها ويليه الفطر*Fusarium*. ويعود سبب سيادة الفطر *Aspergillus* في الحبوب المخزنية لأنتشاره الواسع في البيئة والذي يأتي من قدرته على تكوين اعداد كثيرة من الوحدات التكاثرية المقاومة للظروف البيئية غير الملائمة وكذلك النمو في مديات واسعة من الحرارة والرطوبة اذ تنمو الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus* في مديات من درجات الحرارة تتراوح مابين 12–48م° او أعلى من ذلك وظروف جفاف (Jelinek وآخرون, 1999) فضلاً عن عوامل أخرى مثل مدة الخزن, اذ كلما زادت ازداد معها احتمال حصول الأصابات وتلعب بعض العوامل الحيوية كالحشرات والعناكب دوراً مهماً في ازدياد الأصابات الفطرية من خلال احداث اضرار في البذور تساعد الفطريات المخزنية على احداث الأصابة (Rustum, 1997) كما ان الوحدات التكاثرية (الأبواغ اللاجنسية) تكون بشكل عوالق في الهواء كون أقطارها اقل من 15نانوميتر وهذا يسمح لها بالأنتشار والوصول لاماكن خزن الحبوب والثمار وغيرها من المواد الغذائية المخزونة (Alexopoulos و Mims, 1979).

أما تواجد الفطر *Fusarium* في حبوب الذرة الصفراء يعود الى كون هذا الفطر يعد من الفطريات المرافقة والممرضة لجميع مراحل نمو وتطور النبات فهو يصيب الجذور والسيقان والعرانيص والحبوب غالباً مايكون ملازماً لمحصول الذرة الصفراء(Marasas, 2001؛ Fandohan وآخرون, 2003) كما بين Rheeder(1990) ان الفطر *Fusarium* متكيف للوجود والنمو بظروف حرارة عالية ورطوبة قليلة.

جدول(4) نسب ظهور وتردد أجناس الفطريات المرافقة لحبوب الذرة الصفراء

الفطر	نسبة الظهور (%)	نسبة التردد (%)
Aspergillus spp.	96	73.31
Rhizopus spp.	36	16.01
Fusarium spp.	32	5.33
Penicillium spp.	16	2.52
Mucor spp.	16	2.8

2.4.دراسة قابلية عزلات الفطر .*Fusarium* spp على أنتاج سم الزيرالينون

بين(جدول5) نتائج التحليل الكيميائي والكشف عن سم الزيرالينون بإستخدام تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC) ان 13عزلة من أصل 18 عزلة من العزلات التي تم اختبارها كانت قادرة على انتاج سم الزيرالينون، وبلغت نسبة العزلات المنتجة للسم (72.22%). وكانت هذه النتيجة مقاربة لما وجده عدد من الباحثين فسلومي(2007) وجد 9 عزلات من اصل 13 عزلة من فطر *Fusarium* والتي عزلت من حبوب الذرة الصفراء منتجة لسم الزيرالينون وبنسبة 69.2% كما ذكر القيسي (2010) أن 8 عزلات من أصل 13 عزلة تم عزلها من حبوب الذرة الصفراء منتجة للسم اي بنسبة 66.6% وأشار الخفاجي(2014) ان 10 عزلات من أصل 12عزلة من عزلات الفطر *Fusarium* تم عزلها من حبوب

الذرة الصفراء منتجة لسم الزيرالينون وبنسبة 83.3%. أن الفطر *Fusarium* يصيب نباتات الذرة الصفراء في الحقل وتتطور الأصابة بالحبوب في المخزن بسبب تخزين الحبوب خلال موسم سقوط المطر حيث تصل رطوبة الهواء فيه الى 90% حيث يؤدي الى استمرار فعالية الأبواغ فترة اطول وبالتالي حدوث تلوث اكبر للحبوب المخزونة (Fandohan وآخرون, 2003).

جدول(5) يوضح قابلية عزلات الفطر *Fusarium* spp. على أنتاج سم الزيرالينون

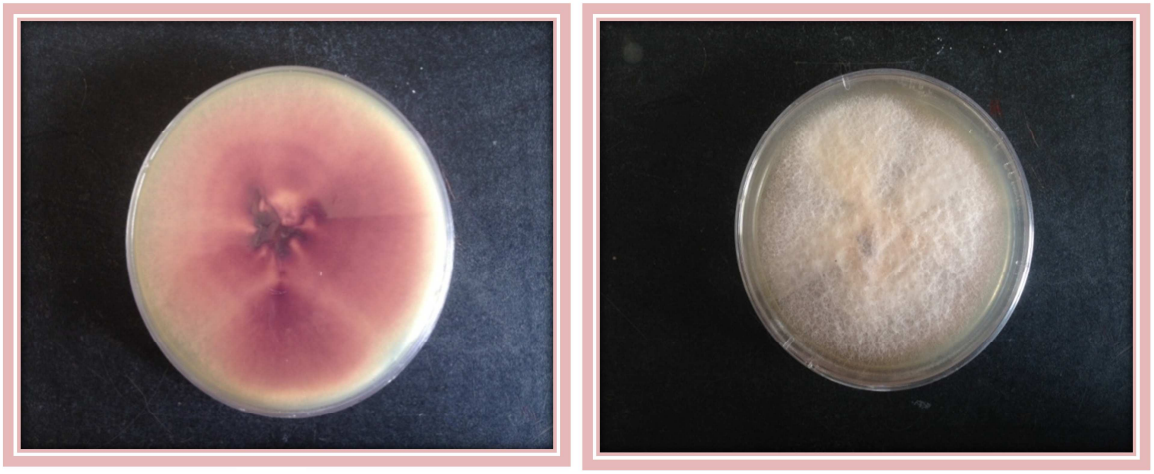
ت	أسم العزلة	النتيجة
1	F.v.1	+
2	F.v.2	+
3	F.v.3	+
4	F.v.4	+
5	F.v.5	+
6	F.g.1	+
7	F.g.2	+
8	F.g.3	–
9	F.g.4	–
10	F.v.6	–
11	F.v.7	+
12	F.v.8	+
13	F.v.9	–

+	F.g.5	**14**
+	F.g.6	**15**
–	F.g.7	**16**
+	F.g.8	**17**
+	F.g.9	**18**

3.4.تشخيص عزلة الفطر .*Fusarium* spp المنتجة لسم الزيرالينون

1.3.4.التشخيص المظهري والمجهري لعزلة الفطر النامي على وسط PDA

لون المستعمرة الأمامي أبيض (شكل1–A) وقد يتلون السطح السفلي باللون البنفسجي المحمر(شكل1–B) الغزل الفطري ينمو بسرعة على الوسط الغذائي PDA وقد ينتج صبغات ذات لون بنفسجي أو إرجواني أو برتقالي وبعض العزلات تكون غير منتجة للصبغات. الأبواغ الكونيدية الكبيرة طويلة نسبياً ومعقوفة قليلاً أو مستوية جدرانها رقيقة, الخلية القمية معقوفة وأغلب الأحيان تكون مستدقة والخلية القاعدية شكلها قدمي ومقسم من 3–5 حواجز والأبواغ الكونيدية الصغيرة بيضوية الشكل أو دبوسية قاعدتها مفلطحة وتكون عادةً غير مقسمة (شكل3–C) لايُكوّن هذا النوع أبواغاً مقاومة وقد يُكوّن خلايا داخل الخيوط الفطرية منتفخة تعرف بالأبواغ المقاومة الكاذبة(Pseudochlamydospores). Watanabe(2002)



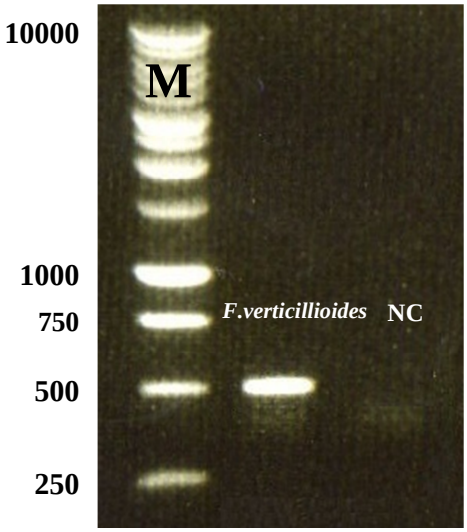
B A

C

لوحة(1) الخصائص المظهرية والمجهرية للفطر *F.verticillioides* النامي في وسط PDA بدرجة حرارة 25±2م° لمدة خمسة أيام A: السطح الأمامي للمستعمرة B: السطح السفلي للمستعمرة a: الأبواغ الكونيدية الكبيرة b: الأبواغ الكونيدية الصغيرة.

2.3.4.التشخيص الجزيئي لعزلات الفطر *F.verticillioides*

بينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) أمكانية تضاعف حزم الحامض النووي الـ DNA (DNA products) وبالحجم المتوقع(~500قاعدة نيتروجينية) بعد أستخلاص الحامض النووي من عزلات الفطر *F.verticillioides* من الحبوب المصابة واجراء تفاعل البلمرة المتسلسل وباستخدام البوادئ الأمامية والخلفية (ITS1 وITS4) (لوحة 2)



لوحة(2): ناتج الحامض النووي (DNA) المضاعف بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) من الفطر *F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء. M= 1Kbp DNA ladder marker. NC معاملة مقارنة (Negative control) غير حاوية على حامض نووي(DNA).

أثبتت نتائج التحليل للتتابع النيوكلوتيدي (Nucleotide sequence analysis) لشكل حزمة تضاعف الحامض النووي المضاعفة من الفطريات المعزولة وباستخدام برنامج BLAST بأن العزلة عائدة للفطر *F.verticillioides*

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         10         20         30         40         50
CTCCGTAGGG TGAACCTGCG GAGGGATCAT TACCGAGTTT ACAACTCCCA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
         60         70         80         90        100
AACCCCTGTG AACATACCAA TTGTTGCCTC GGCGGATCAG CCCGCTCCCG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        110        120        130        140        150
GTAAAACGGG ACGGCCCGCC AGAGGACCCC TAAACTCTGT TTCTATATGT
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        160        170        180        190        200
AACTTCTGAG TAAAACCATA AATGAATCAA AACTTTCAAC AACGGATCTC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        210        220        230        240        250
TTGGTTCTGG CATCGATGAA GAACGCAGCA AAATGCGATA AGTAATGTGA
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        260        270        280        290        300
ATTGCAGAAT TCAGTGAATC ATCGAATCTT TGAACGCACA TTGCGCCCGC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        310        320        330        340        350
CAGTATTCTG GCGGGCATGC CTGTTCGAGC GTCATTTCAA CCCTCAAGCC
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        360        370        380        390        400
CAGCTTGGTG TTGGGACTCG CGAGTCAAAT CGCGTTCCCC AAATTGATTG
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
        410        420        430        440        450
GCGGTCACGT CGAGCTTCCA TAGCGTAGTA GTAAAACCCT CGTTACTGGT
....|....| ....|....| ....|....| ....|..
        460        470        480
AATCGTCGCG GCCACGCCGT TAAACCCCAA CTTTTGA
```

شكل(3) التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي المضاعفة من الفطر*F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء والمشخصة من قبل تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR)

لوحظ من خلال مقارنة التتابع النيوكلوتيدي لحزمة الحامض النووي للفطر*F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI) أن نسبة التشابه الوراثي بلغت 100% مع عزلة الفطر *F.verticillioides*المعزولة من الولايات المتحدة (KU597379) وكانت نسبة التشابه الوراثي 99% بين جميع عزلات الفطر المعزولة من الصين (JX511973, GU982311, KC143121, HM769948) والهند(JF499676, GU257904, HF570008, KF485086) وأيطاليا (EU151467,EU151482) والبرازيل (KR052812). (جدول6).

جدول(6): مقارنة بين نسب التشابه النيوكلوتيدي للفطر *F.verticillioides* المعزول من حبوب الذرة الصفراء والعزلات الأخرى العائدة لنفس الفطر والمسجلة عالمياً في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الحيوية (NCBI)

Fungus	Isolate or strain name	Origin	The most similar sequences in GenBank database	
			GenBank Accession Number	Sequence similarity(%)
F.verticillioides	WSF14_SW82	USA	KU597379	100
F.verticillioides	DBT-112	India	HF570008	99
F.verticillioides	Gm2	China	HM769948	99
F.verticillioides	LAPEMI 10.2015	Brazil	KR052812	99
F.verticillioides	UOA/HCPF14862	Greece	KC709665	99
F.verticillioides	SIDV20110221051	China	KC143121	99
F.verticillioides	CB1	China	JX511973	99
F.verticillioides	FM2	India	JF499676	99
F.verticillioides	PUMCH10XB00173	China	GU982311	99
F.verticillioides	*	India	GU257904	99
F.verticillioides	HN-suili	China	GQ466389	99
F.verticillioides	A1	Italy	EU151467	99
F.verticillioides	MP1609.2	India	KF485086	99
F.verticillioides	XM060107	China	FJ154074	99
F.verticillioides	EXGF-2	China	EU567316	99
F.verticillioides	SA3	Italy	EU151482	99
F.verticillioides	NOVb1	Italy	EU151476	99

*لم يذكر اسم السلالة/العزلة.

بين Huang وآخرون(2016) أن تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) أستخدم في تشخيص عزلات الفطر *F.verticillioides* والمعروفة بدقتها العالية في تشخيص العديد من الكائنات الحية ومنها الأنواع الفطرية العائدة للفطر .spp *Fusarium* و .spp *Aspergillus* وغيرها وأشار Hsuan وآخرون(2011) و Zhang وآخرون(2012) الى فائدة التشخيص الجزيئي للتخلص من مشاكل التشخيص المظهري بالرغم من فائدة التشخيص المظهري في حصر الفطريات المستخدمة في الدراسة في مجاميع صغيرة ومن المشاكل التي تواجه التشخيص المظهري للفطريات حاجة القائم بعملية التشخيص الى خبرة عالية وبالأخص في الأنواع قريبة الشبه فيما بينها مثل الفطر .spp *Fusarium* فضلاً عن الجهد والوقت الكبيرين. وبعض العوامل مثل نوع وطبيعة وسط النمو والرطوبة والأضاءة التي لها تأثير على ألوان وأشكال وأحجام المستعمرات والأبواغ الفطرية. وتوصل العديد من الباحثين الى أخطاء في التصنيف المظهري بعد أعادة تشخيصها مرة أخرى باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) للعديد من الفطريات المشخصة في دراسات سابقة وخصوصا الأنواع العائدة للفطر .spp *Fusarium* مثل *F.verticillioides* و*F.subglutinans*(Giantsis وآخرون, 2017؛ Maggi وآخرون, 2013). وأشار كل من Chandra وآخرون(2008) وHsuan وآخرون (2011) الى تشخيص الفطر *F.verticillioides* بالأعتماد على الأختلافات الموجودة في تتابع الحامض النووي لمنطقة الـ ITS (Internal transcribed spacer) والتي تعتبر ذات كفاءة عالية في تشخيص العديد من الفطريات ومنها الفطر .*Fusarium* spp.

4.4.تشخيص بكتريا الـ *L. plantarum* و *L.rhamnosus* و*S.thermophilus*

1.4.4.دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *L. plantarum*

عند تنمية عزلة البكتريا المنقاة على وسط N.A ظهرت مستعمرات دائرية محدبة وغير مدببة ومتوسطة الحجم كما ان لون المستعمرة ابيض أو كريمي أو اصفر فاتح. كما اوضحت نتائج الفحص المجهري للشرائح الزجاجية الحاوية على الغشاء البكتيري المثبت والمصبغ بصبغة كرام ان اشكال الخلايا البكتيرية كانت بيضوية الى عصوية قصيرة نهاياتها مستديرة وغير متحركة, موجبة لصبغة كرام فردية او في ازواج او سلاسل قصيرة وهذا يتفق مع ما وجده Holt وآخرون(1994) وGovindasamy(2014).

2.4.4.دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *L.rhamnosus*

أوضحت نتائج دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *L.rhmnosus* قيد الدراسة انها تكون مستعمرات صغيرة الحجم دائرية منتظمة ومحدبة وملساء, ذات لون رمادي فاتح على الوسط الزرعي أما نتيجة الفحص المجهري فتبين أنها موجبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات, ذات شكل عصوي قصير مفردة او على شكل سلاسل قصيرة وهذا مطابق لما وجده(Millette وآخرون, 2008).

3.4.4. دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *S.thermophilus*

أوضحت نتائج دراسة الصفات المظهرية والمجهرية لبكتريا *S.thermophilus* قيد الدراسة انها تكون مستعمرات دائرية متوسطة الحجم وناعمة ملساء ومدببة, ذات لون ابيض او كريمي على الوسط الزرعي أما نتيجة الفحص المجهري فتبين أنها موجبة لصبغة كرام غير مكونة للسبورات, ذات شكل كروي وعلى شكل سلاسل طويلة نوعاً ما غير متحركة وهذا مطابق لما وجده Sharma وآخرون(2014).

4.4.4.الإختبارات البايوكيميائية والفسيولوجية لبكتريا *L. plantarum* و *L.rhamnosus* و *S.thermophilus*

بينت نتائج(جدول7) هذه الإختبارات ان العزلات البكتيرية عائدة للنوع *L.plantarum* و *L.rhamnosus* و*S.thermophilus* وهذا يتفق مع ما جاء به كل منMacfaddin (2000).

جدول(7) الأختبارات البايوكيميائية لبكتريا الـ *L. plantarum* و *L.rhamnosus* و*S.thermophilus*

ت	الإختبار		النتيجة		
			بكتريا *L. plantarum*	بكتريا *L.rhamnosus*	بكتريا *S.thermophilus*
1	Licethenase		–	–	–
2	Blood Hemolysis		–	+	–
3	Catalase Enzyme		–	–	–
4	Oxidase		–	*	
5	Sugars Fermentation	Mannitol	+	+	–
		Lactose	–	+	+
		Maltose	+	+	+
		Ribose	+	*	–
		Glucose	+	+	+
		Xylose	*	–	*
6	Motility		–	–	–
7	Indol		–	–	–
8	Anaerobic Growth		+	+	+
9	Urease		+	*	+
10	Starch		–	–	–
11	Simon Utilization		–	–	–
12	NaCl %6.5		–	–	–

و بعد ذلك تم أختيار العزلة الأكفأ في تثبيط الفطر *F.verticilliodes*

5.4.تقييم كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا الـ *B.subtilis* واللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum* في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط PDA

أظهرت نتائج(جدول8) تجربة تثبيط فطر *F.verticilloides* بواسطة المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis*(10^6x5مستعمرة/غم) بطريقة المزج مع الوسط حدوث تثبيط بنسبة 100% النتائج المقاربة مع ماذكرته العديد من الدراسات المحلية والعالمية.

وبين الخفاجي (2015) كفاءة بكتريا الـ *B.subtilis* في تثبيط النمو الشعاعي للفطر *F.graminearum* على وسط الـ PDA وبنسبة بلغت 100% وتعزى كفاءة الأنواع التابعة لجنس.spp *Bacillus* الى عدة آليات ومنها قابلية البكتريا على انتاج المضادات الحيوية مثل BacillomycinD والمضاد الحيوي IturinA وانتاجها أيضاً للانزيمات المحطمة لمادة الكايتين والتي تؤلف أغلب جدران الخلايا الفطرية وهو إنزيم Chintinase(Moyne وآخرون, 2001) كما وأوضح Mathiyazhagan وآخرون(2004) أنّ لبكتريا *B.subtilis* القدرة على انتاج المواد الخالبة للحديد(Siderophores) وهي مركبات قابلة للانتشار وذات قابلية عالية على الارتباط مع الحديد (يكون المركب المخلبي شديد الارتباط بالحديد(Ion-Chelating- Siderophores) مما يؤدي الى اختزال ايونات الحديد Fe^{+3} الذائبة) وبذلك يقلل من جاهزيته للأحياء الدقيقة والتي تحتاجه للنمو والتطور. وان هذه النتائج تقاربت مع ماوجده العاشور(2009) إذ بين قدرة بكتريا الـ *B.subtilis* في تثبيط نمو الفطر *F.oxysporum* بنسبة بلغت 80% ويعزى تثبيط البكتريا لنمو الفطر الى إحتمالية التطفل الفائق Hyperparasitism الذي تتميز به البكتريا(Pal وGardener, 2006). وأكد Kazmar وRobert (2000) ان بكتريا *B.subtilis* ذات قدرة على تثبيط نمو العديد من الفطريات الاقتصادية وخاصة *Fusarium* spp. و *Aspergillus* spp. و *Rhizoctonia* spp..

وأظهر (جدول8) إختبار الفعالية التضادية لبكتريا الـ *L.plantarum* (10^6x5 مستعمرة/مل) (بطريقة المزج) للفطر *F.verticillioides* عدم قدرة البكتريا على تثبيط نمو الفطر المختبر ويعود سبب ذلك الى فعالية بكتريا حامض اللاكتيك للنمو في الأوساط السائلة بفعالية عالية وإنخفاض معدل نموها في الأوساط الصلبة (Macfaddin, 2000). كما ان النشاط المائي للبكتريا اعلى من الفطريات, فبعض أنواع البكتريا تحتاج نشاطاً مائياً اعلى من 0.90 لنموها كما انها تحتاج الى رطوبة لاتقلُّ عن 40% وفي نسبة ملوحة تتراوح مابين 4 و7% من كلوريد الصوديوم NaCl (ابو يونس واخرون, 2007).

جدول(8) كفاءة بكتريا *L.plantarum* و المستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في تثبيط نمو فطر *الفطر F .verticillioides* على الوسط الزرعي PDA.

ت	المعاملات	معدل قطر مستعمرة الفطر(سم)	الكفاءة التضادية %
1	*B.subtilis*+فطر *F.verticillioides*	0	100
2	*L.plantarum*+فطر *F.verticillioides*	100	0
3	معاملة السيطرة(فطر فقط)	100	0

6.4.تقييم كفاءة اللقاح البكتيري لبكتريا *L.plantarum*في تثبيط نمو الفطر *F.verticillioides* على وسط Nutrient Broth

أظهرت نتائج(جدول9) تجربة تثبيط فطر *F.verticillioides* بواسطة لقاح بكتريا الـ *L.plantarum* حدوث تثبيط بنسبة 100%. وكان وزن الكتلة الحيوية الرطب 2.11غم بينما بلغت نسبة الكتلة الجافة 0.26غم.

فقد أشار Laitila وآخرون(2002) الى قدرة سلالتين من بكتريا الـ *L.plantarum* E76 وE98 على تقليل نمو وسمية سلالات عدة من فطر *Fusarium* التي تم عزلها من الشعير وكانت فعالية البكتريا عالية جداً في الأوساط السائلة في تقليل النمو الشعاعي للفطرين *F.gramenearum* و *F.avenaceum* .وأوضح Karunaratne وآخرون(1990) قدرة بكتريا الـ *L.plantarum* على تثبيط نمو الفطرين *A.flavus* و *A.parasiticus* في الأوساط السائلة. وتعود فعالية بكتريا حامض اللاكتيك في

تثبيط نمو الفطريات المختلفة الى انتاجها مركبات مختلفة مثل الأحماض العضوية والـ diacetyle والبيروكسيدات والبكتريوسينات (البروتينات البكتيرية) اثناء التخمر اللبني (Oyetayo وآخرون, 2003) كما ان بكتريا حامض اللاكتيك تعمل على خفض قيمة الـ PH وخلق بيئة غير مناسبة لمسببات الأمراض(James, 2000). وتستطيع بكتريا حامض اللاكتيك انتاج مواد أيضية ثانوية قادرة على تثبيط نمو الفطريات(Munimbazi و Bullerman, 1998).

وبين Lavermicocca وآخرون (2000) قدرة بكتريا الـ *L.plantarum* على أختزال نمو الكثير من الأحياء بسبب انتاجها حامض Phenyllactic و 4-hydroxy-phenyllactic. ويعزى تأثر الفطر ببكتريا حامض اللاكتيك الى الأحماض العضوية التي تنتجها وخاصة حامض الخليك(Rocken, 1996) وقد أكدت دراسات اخرى ان تركيز حامض الخليك يعمل على زيادة القابلية التثبيطية للفطر, وان الايضيات البكتيرية الأخرى لها القدرة على تثبيط نشاط الفطر (Gourama, 1997 ؛ Niku-paavola وآخرون, 1999).

ان القابلية التضادية تجاه الفطريات تختلف بحسب الأنواع المختلفة لبكتريا الـ *Lactobacillus* spp. إذ إنها تزداد بزيادة انتاج مجموعة او خليط من الأحماض العضوية وذلك يرجع الى النوع البكتيري وقدرته او قابليته على الأنتاج(Truper و De Clari, 1997). وان بكتريا الـ *L.plantarum* تعمل على افراز Benzioc acid و Mevalonolactone و Methylhydantion و Cyclo(glycyl-L-leucyl) والتي عملت على تثبيط الفطر *F.avenaceum* وبكتريا *Pantoea agglomerans* وإن النشاط التآزري لهذه المجموعة من المركبات كان ذات تأثير مثبط قوي إذ إن الجمع بين Methylhydantion و Benzioc acid ادى الى تثبيط نمو البكتريا *P. agglomerans* بنسبة 100% كما وان هذه المركبات مختلفة كيميائياً بعضها عن بعض, فقد تتميز بكونها صغيرة الحجم, عطرية (أروماتية) وغير متجانسة (Niku- Paavola وآخرون, 1999). ومن المواد الايضية الثانوية Pyroglutamic acid الذي تم ادخاله كعامل مضاد للميكروبات (Huttunen وآخرون, 1995). فضلاً عن انتاج Phenyllactic وبيروكسيد الهيدروجين(Rumjuankiat وآخرون, 2015).

وذكر De vuyst وآخرون(1996) ان افراز المواد الايضية يزداد او يتعزز في ظل ظروف النمو غير الملائمة مثل انخفاض درجات الحرارة أو وجود مركبات سامة مثل الايثانول.

جدول(9) كفاءة بكتريا *L.plantarum* في تثبيط نمو فطر *الفطر F. verticillioides* على وسط الـ Nutrient Broth.

المعاملات	الوزن الرطب/غم	نسبة التثبيط%	الوزن الجاف/غم
بكتريا*L.plantarum*+فطر*F.verticilloides*	0	100	0
فطر*F.verticilloides*	2.11	0	0.26
LSD(P<0.05)	1.16		0.006

7.4.تقييم كفاءة نوعي البكتريا *B.subtilis* و *L. plantarum* في حماية حبوب الذرة الصفراء من الإصابة بالفطر*F. verticillioides* المنتج لسم الزيرالينون تحت ظروف الخزن الطبيعي

أظهرت النتائج المبينة في(الجدول10) امتلاك الفطر *F.verticillioides* قابلية على احداث نسب عالية من الإصابة في حبوب الذرة الصفراء(الملوثة اصطناعياً) اذ بلغت 100% بعد شهر وبعد ثلاثة أشهر, في حين كانت نسبة الإصابة في معاملة السيطرة حبوب غير ملوثة بأبواغ الفطر 2.20% بعد مرور شهر من الخزن وحدثت زيادة في نسب الإصابة الى 4.40% بعد مرور ثلاثة أشهر على الخزن

وأظهرت نتائج معاملة المستحضر الحيوي واللقاح البكتيري لبكتريا *B.subtilis* فقط فعالية عالية في حماية حبوب الذرة الصفراء بلغت صفر بعد مرور شهر وبعد مرور ثلاثة أشهر وكان لبكتريا *B.subtilis* دور فعال في خفض نسبة أصابة حبوب الذرة الصفراء الملوثة بلقاح الفطر *F.verticillioides* اذ أختزلت من 100% في معاملة الفطر (الملوث أصطناعياً) الى 31.106% بعد مرور شهر والى 48.88% بعد مرور ثلاثة أشهر في معاملة الحبوب الملوثة بلقاح الفطر والمستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis*(جدول10) وأختزلت من 100% في معاملة الفطر(الملوث أصطناعياً) بعد معاملته بلقاح بكتريا *B.subtilis* الى 33.33% بعد مرور شهر والى 44.44% بعد مرور ثلاثة أشهر(جدول11).

ولم تظهر بكتريا الـ *L.plantarum* اي فعالية في حماية حبوب الذرة الصفراء الملوثة بلقاح الفطر *Fusarium* spp. (الملوث أصطناعياً) إذ كانت نسبة أصابة الحبوب بالفطر 100% بعد مرور شهر وبعد مرور ثلاثة أشهر(جدول12). ويرجع سبب ذلك الى عدم توفر الظروف البيئية الملائمة لنمو البكتريا وخاصة الوسط السائل الذي تحتاجه بكتريا حامض اللاكتيك لنموها وزيادة فعاليتها.

وهذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه العديد من الدراسات, التي أشارت الى فعالية بكتريا *B.subtilis* في حماية حبوب المحاصيل ومنها الذرة الصفراء من الإصابة بالعديد من الفطريات المخزنية ومنها الفطر .*Fusarium* spp (العاشور, 2009؛ الأسدي, 2013؛ الخفاجي, 2015).

وتعزى هذه النتائج الى فعالية البكتريا في اختزال نسبة إصابة الفطر .*Fusarium* spp لحبوب الذرة الصفراء الى امتلاك بكتريا *B.subtilis* لأليات عديدة تمكنها من تثبيط نمو الفطريات الممرضة ومن أهم هذه الأليات انتاج مضادات حيوية طيارة تعمل على تثبيط نمو الفطر الممرض(Moyne وآخرون, 2001). كما وأشار Alippi وMonaco(1994) الى ان بكتريا *B.subtilis* تنتج العديد من المواد المقاومة للفطر *Fusarium spp.* مثل Subtilin وBactriacin و Bacillomycin وأفرازها العديد من الإنزيمات وأهمها Chitinase و B-1,3-glucanase والذي يؤدي الى تحلل جدران الفطر الممرض. وتوفر بكتريا *B.subtilis* منافع عديدة من بقية البكتريا, وذلك بسبب قدرتها على البقاء لمدة طويلة وقابليتها على تكوين الأبواغ الداخلية Endospore ونشاطها الواسع في انتاج المضادات الحياتية (Fiddman وRossall, 1995). كما تلعب آلية المنافسة على المكان والغذاء دوراً مهما في كبح نشاط الفطريات فالبكتريا *B.subtilis* ذات قدرة عالية على منافسة الفطريات كونها أسرع نمو من بقية الكائنات الحية الأخرى والمتواجدة معها في نفس البيئة وبذلك تستحوذ على القسط الأكبر من الغذاء والمكان (العميدي, 2009). كما ان القدرة التثبيطية ربما تعود الى مادة كاربونات الكالسيوم $CaCo_3$ الحاملة للبكتريا والتي تمتلك قدرة تثبيطية لنمو الفطريات فقد ذكر قاسم(1998) ان إضافة مادة كاربونات الكالسيوم الى الوسط الزرعي بنسبة 20% تثبط نمو الفطر *A.flavus* بنسبة 38.5% وذلك من خلال تأثيراتها غير المباشرة في نمو الفطريات من حيث تغيير طبيعة الوسط الذي تنمو فيه الفطريات وخاصة الرقم الهيدروجيني حيث تعمل مادة كاربونات الكالسيوم على جعل الوسط قاعدي والفطريات تنمو في وسط متعادل أو قليل الحموضة.

جدول(10) تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء بالمستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F.verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن

ت	المعاملات	نسبة الاصابة (%) بعد مرور شهر	نسبة الاصابة(%) بعد مرور ثلاثة اشهر
1	معاملة السيطرة(الفطر فقط)	100	100
2	معاملة مستحضر *B.subtilis* فقط	0	0
3	معاملة الفطر + مستحضر *B.subtilis*	31.10	48.88
4	معاملة السيطرة(بدون أضافة)	2.20	4.40
	LSD(P< 0.05)	5.1	5.1

جدول(11) تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء بلقاح بكتريا *B.subtilis* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F.verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن

ت	المعاملات	نسبة الاصابة (%) بعد مرور شهر	نسبة الاصابة(%) بعد مرور ثلاثة اشهر
1	معاملة السيطرة(الفطر فقط)	100	100
2	معاملة لقاح *B.subtilis* فقط	0	0
3	معاملة الفطر + لقاح *B.subtilis*	33.33	44.44
4	معاملة السيطرة(بدون أضافة)	2.20	4.40
	LSD(P< 0.05)	3.58	8.08

جدول(12) تأثير معاملة حبوب الذرة الصفراء بلقاح بكتريا *L.plantarum* في معدلات نسب إصابة حبوب الذرة الصفراء بفطر *F. verticillioides* بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الخزن

ت	المعاملات	نسبة الاصابة (%) بعد مرور شهر	نسبة الاصابة(%) بعد مرور ثلاثة اشهر
1	معاملة السيطرة(الفطر فقط)	100	100
2	معاملة لقاح *L.plantarum*	4.40	6.63
3	معاملة الفطر +لقاح *L.plantarum*	100	100
4	معاملة السيطرة(بدون أضافة)	2.20	4.40
	LSD(P< 0.05)	7.21	5.07

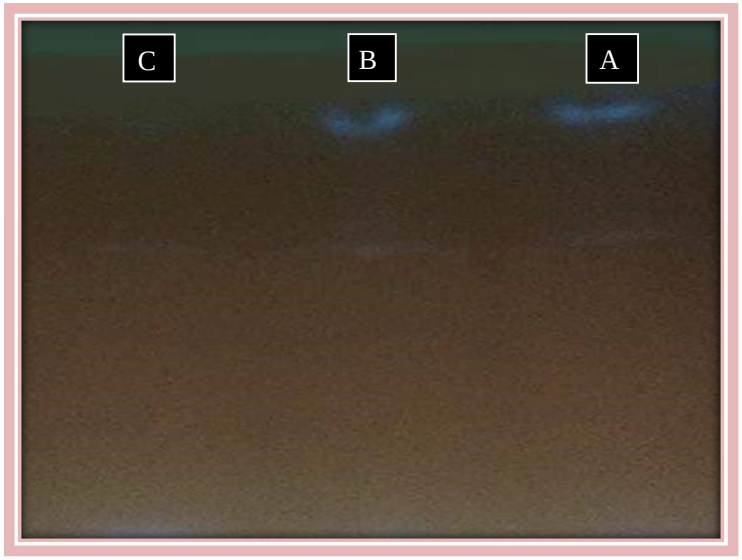
*الأرقام تمثل معدل ثلاثة مكررات لكل معاملة

8.4.تقييم كفاءة بكتريا الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون خارجياً(*In vitro*)

أثبتت(لوحة4) نتائج الأختبار كفاءة عزلة الـ *L. plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون بطريقة الأختبار الخارجي بإستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة(TLC) وذلك من خلال أختفاء التألق اللوني لعينة مستخلص معاملة السم+البكتريا مقارنة مع التألق اللوني لعينة مستخلص السم فقط و السم القياسي وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Zhao وآخرون (2015). حيث أثبت قابلية ثلاث سلالات من بكتريا الـ *L.plantarum* وقدرتها على أختزال كمية سم الزيرالينون في الأوساط السائلة بنسب 38.06% و 39.50% و 47.80%. كما أظهرت العديد من سلالات الـ *L.plantarum* قابليتها على إزالة سموم الأفلاتوكسين B1(Fazeli وآخرون, 2009؛ EL-Nezami وآخرون, 2000 ؛ Khanafari وآخرون, 2007؛ Zinedine وآخرون، 2005). بالأضافة الى قدرتها على تحطيم سم الباتولين و الأوكراتوكسين A (Fuchs وآخرون, 2008؛ Hawar وآخرون, 2013). كما بين كل من Berthiller وآخرون(2011) و Zou وآخرون (2012) على أختزال كمية وإزالة سمية سم الـ Deoxynivalenol (DON). وكانت هناك دراسة أخرى حول قدرة سلالتين من بكتريا الـ *Lactobacillus rhamnosus* في تحطيم وازالة سم الزيرالينون وأحدى مشتقاته α-Zearalenol خارجياً حيث تمت إزالة 58-60% في درجة حرارة -37%

25 من كمية السم الكلي كما وأظهرت نفس السلالات قدرتها على ربط الأفلاتوكسين والتراكوشين (EL-Nezami وآخرون, 1998؛ El-Nezami وآخرون, 2002؛ Pieridis وآخرون, 2000). كما وبين الهاشمي (2014) قدرة بكتريا الـ *Lactococcus lactis* على إختزال سم الأفلاتوكسين, كما وأثبت Sezer وآخرون(2013) قدرة بكتريا الـ *Lactococcus lactis* وبكتريا *Lactobaillus plantarum* في تقليل كمية سم الأفلاتوكسين في الأوساط السائلة بنسبة بلغت 27-46% على التوالي وذلك بأستخدام تقنية إختبار اليزا ELISA Test.

إن تقليل كمية السم بواسطة الأحياء الدقيقة يكون عن طريق ربط أو (تقييد) المادة السامة على مكونات الجدار الخارجي أو عن طريق الأنزيمات المحللة التي تفرزها البكتريا (El-Nezami وآخرون, 2002).



لوحة(4) التحطيم الحيوي في الزجاج(*In vitro*) لسم الزيرالينون A: السم القياسي B: معاملة سم الزيرالينون فقط C: معاملة سم الزيرالينون+لقاح البكتريا.

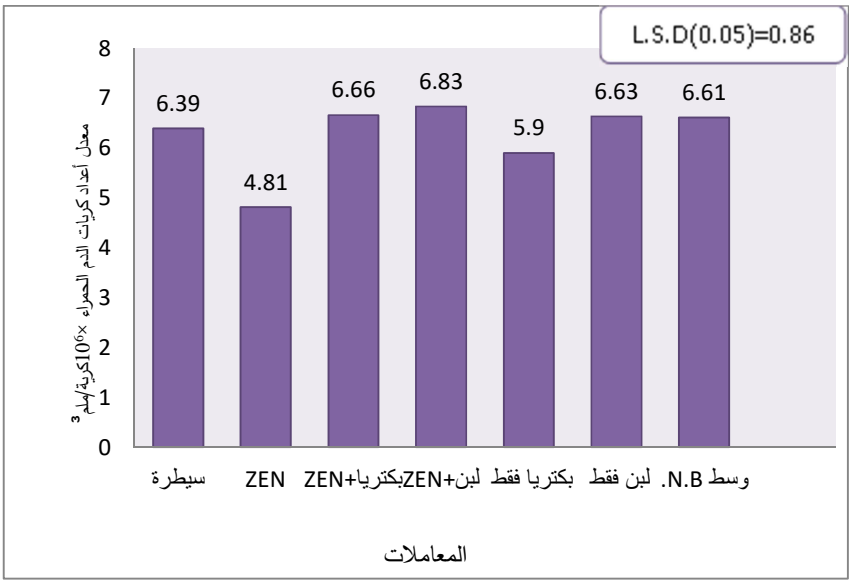
9.4.تقييم فعالية بكتريا الـ *L. plantarum* واللبن في تحطيم سم الزيرالينون داخل الجسم الحي(*In vivo*) وبشكل وقائي في معايير الدم الفسلجية

1.9.4.اعداد كريات الدم الحمراء RBCs

أظهرت نتائج(شكل5) أختبار فعالية البكتريا *L.plantarum* واللبن وجود فروق معنوية $P<0.05$ بين المعاملات إذ قلت اعداد كريات الدم الحمر في دم الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون الى $4.81X10^6$ كرية/ملم^3 عن معاملة السيطرة والبالغة $6.39X10^6$ كرية/ملم^{3}وبلغت في معاملة البكتريا والسم $6.66x10^6$ ملم^3 ومعاملة اللبن والسم $6.83x10^6$ملم^3 والتي أختلفت معنوياً عن معاملة السم فقط اما باقي المعاملات لم تختلف معنوياً عن معاملة السيطرة. وذلك مطابق لما توصل اليه كل من الهاشمي (2014) و الساعدي (2014).

قد يعود السبب إن سم الزيرالينون عمل على تثبيط مادة الـ Glutathione والتي وظيفتها حماية كريات الدم الحمراء من تأثير المواد السامة وبالتالي تصبح الكريات الحمراء أكثر حساسية للمادة السامة ويؤدي ذلك الى تقليل اعدادها وقصر عمرها وبالتالي حصول فقر الدم(Anemia)(Eklow وآخرون, 1986). كما أن انخفاض كريات الدم الحمراء قد يعود الى أرتباط السم ببروتين الدم α-Globin و ß– Globin او ان نقصان كريات الدم الحمر كان بسبب امتصاص الأمعاء لعنصر الحديد نتيجة تأثير السموم الفطرية عليها وبالتالي حصول نقص في كمية الهيموغلوبين (Lanza وآخرون, 1980).

أما قدرة البكتريا *L.plantarum* و اللبن على رفع معدل اعداد كريات الدم الحمر يعود الى قدرة البكتريا على ربط واختزال سم الزيرالينون حيث تعمل البكتريا كمرشحات في الأمعاء من خلال ربطها للسم بالجدر الخلوية للبكتريا وبالتالي تمنع وصولها الى الأمعاء الدقيقة والكلى والكبد(Cloherty وآخرون,2001).

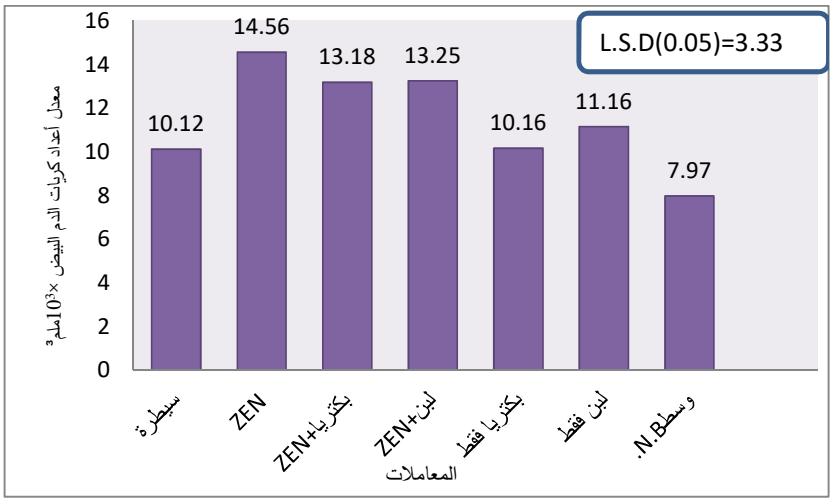


شكل(5) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم الحمر لذكور الجرذ الأبيض.

2.9.4.اعداد كريات الدم البيض WBCs

أظهرت النتائج(شكل6) وجود تباين في اعداد كريات الدم البيض في دم الحيوانات المعاملة بلغت في معاملة السم 10^3X14.56 ملم^3 أختلفت معنوياً عن معاملة السيطرة والتي بلغت 10^3X10.12 ملم^3 أما معاملة اللبن مع السم فقد بلغت 10^3X13.25 ملم^3 اما معاملة البكتريا مع السم فقد بلغت 10^3X13.18 ملم^3.

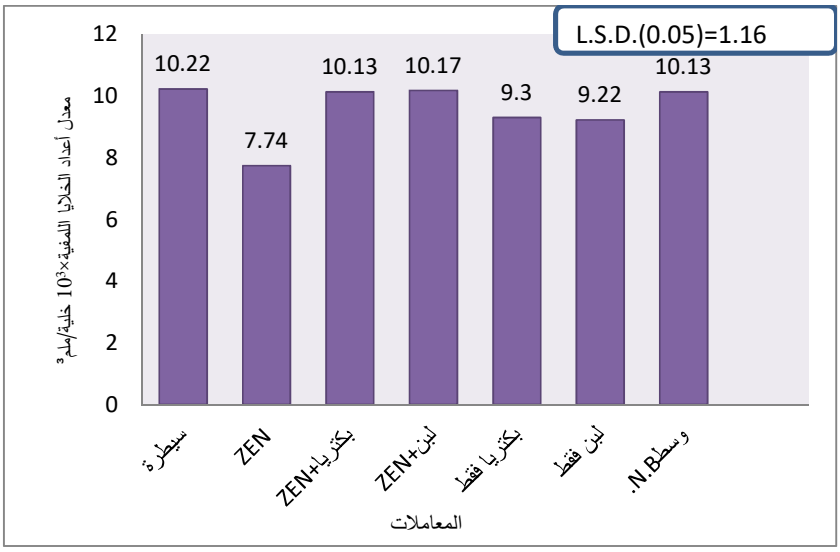
لم تختلف معنويا مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات ويعود سبب الأرتفاع الى قدرة السموم الفطرية على رفع اعداد كريات الدم البيض الحامضية التي تعمل على ازالة السموم المختلفة من الجسم(Marin وآخرون, 2002) كما وبين Jawetz وآخرون(2004) أن أزدياد أعداد كريات الدم البيض كان بسبب تحفيز الجهاز المناعي بسبب دخول جسم غريب وقيام هذه الكريات بواجبها الدفاعي. وهذا يتطابق مع ماذكره (الخفاجي, 2014؛ El-Taee, 2015) عند تجريع الفئران لسم الزيرالينون وكذلك يتفق مع ماوجده (القيسي, 2010) عن تغذية طيور السمان بعلائق ملوثة بسم الزيرالينون.



شكل(6) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم البيض لذكور الجرذ الأبيض.

3.9.4.معدل اعداد الخلايا اللمفية Lymphocyte

تبين نتائج(شكل7) ان معاملة الحيوانات بسم الزيرالينون ادى الى حدوث انخفاض معنوي في الخلايا اللمفية دون الحد الطبيعي إذ بلغت 7.74x10³ خلية/ملم³ مقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت 10.22x10³ خلية/ملم³ كما لم تختلف معاملة البكتريا والسم ومعاملة اللبن والسم معنويا عن معاملة السيطرة إذ بلغت قيم المعاملتين10.13x10³خلية/ملم³ و 10.17x10³ خلية/ملم³ ويعود سبب انخفاض الخلايا اللمفية الى حدوث اجهاد لدى الحيوانات المعاملة وزيادة افراز الأدرينالين والذي يؤدي الى تقلص الطحال ويتسبب باضعاف جهاز المناعة(Witeska, 2003) وقد يحدث النقص في الخلايا اللمفية بسبب تأكسد الخلايا نتيجة السم الموجود في الدم(Tuzcu, 2010). او بسبب موت الخلايا نتيجة التعرض للسم كما ذكر Shinozuka وآخرون(1997) عند معاملة الفئران بسم الـ T-2 وكانت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه (الهاشمي, 2014). عند معاملة الجرذان بسم الـ FB1 كما قلت نسبة الخلايا اللمفية عند معاملة أصبعيات الأسماك بسم الـ FB1 من قبل(Mahfouz وآخرون, 2015) وبين حصول تغاير واختلاف في النسب بحسب الجرعة ومدة التعرض.

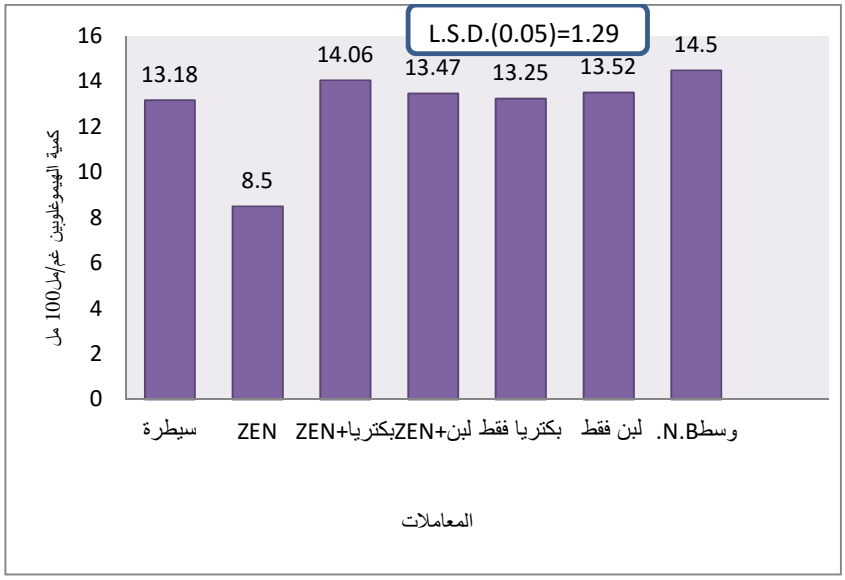


شكل(7) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الأبيض.

4.9.4.قياس الهيموغلوبين (Hb)

أظهرت نتائج(شكل8) ان المعاملات المختلفة أدت الى انخفاض كمية هيموغلوبين الدم في معاملة السم اذ بلغت 8.5 غم/100 مل وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة و التي كانت 13.18 غم/100 مل وكان دور البكتريا واللبن مع السم دوراً ايجابياً في رفع مستوى هيموغلوبين الدم اذ بلغت 14.06 و 13.47 غم/100 مل على التوالي ولم تختلف معاملة البكتريا فقط عن معاملة اللبن فقط عن معاملة السيطرة اذ بلغت 13.25 غم/100 مل و 13.52 غم/100 مل على التوالي. وسبب الإنخفاض في كمية الهيموغلوبين في معاملة سم الزيرالينون قد يعود الى ارتباط السم مع بروتينات الدم المسؤولة عن تخليق الهيموغلوبين(Hb) مثل الألبومين التي وظيفتها تخليق كريات الدم الحمراء وبالتالي قلة كميتها في الدم, وهذا يؤدي الى الإخلال بمكونات الدم وانخفاض نسبة الهيموغلوبين وحصول فقر الدم(Kubena وآخرون, 1987) وذكر Abdel-Wahab وآخرون (2014) سبب نقص كمية الهيموغلوبين نتيجة ضرر الأكسدة بسبب نشاط السموم الفطرية والتي أدت الى زيادة معدل اكسدة الاوكسجين في الهيموغلوبين بالإضافة الى إنحلال الدم. كما ان منتجات الايض الفطرية ترتبط مع بروتينات جدار الخلية وبالتالي التأثير على امدادات الطاقة(ATP) لخلايا الدم الحمراء, كما انها تعمل على نقل السكريات الى الخلايا والتي تؤدي بالنهاية الى قصر عمر الخلية وموتها(Cloherty وآخرون, 2001). وكانت هذه النتائج

مطابقة لما توصل اليه الخفاجي(2014) و الساعدي(2014) و El-Taee (2015) و Ali وآخرون (2015).

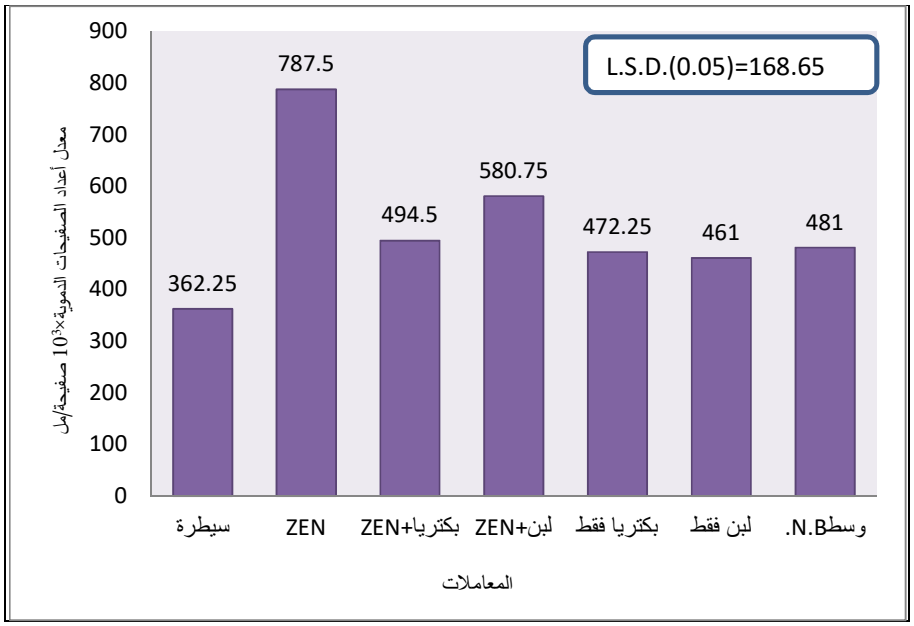


شكل(8) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية هيموغلوبين الدم لذكور الجرذ الأبيض.

5.9.4.اعداد الصفيحات الدموية platelets

أظهرت نتائج(شكل9) ان سم الزيرالينون تسبب في رفع اعداد الصفيحات الدموية في دم الحيونات المختبرية المعاملة بهذا السم اذ بلغت 10³x787.5 صفيحة/مل بينما كانت أعدادها في معاملة السيطرة10³x 362.25 صفيحة/مل اما معاملات البكتريا مع سم الزيرالينون فقد انخفضت فيها اعداد الصفيحات الدموية معنوياً عن معاملة السم اذ بلغت 10³x494.5 صفيحة/مل و اما معاملة اللبن مع السم فقد خفضت اعداد الصفيحات الدموية ولكن بفارق غير معنوي عن اعدادها في دم حيوانات معاملة السيطرة 10³ x580.75 صفيحة/مل وتقاربت هذه النتائج مع ماذكره الهاشمي(2014) اذ كانت اعداد الصفيحات الدموية في معاملة سم الـ FB1 10³ x 1194.5 صفيحة / مل بينما كانت في معاملة السيطرة 10³x422.5 صفيحة/مل وقد رجح سبب الزيادة في أعداد الصفائح أنه يعود الى حالات النزيف الحاصلة في الأنسجة بسبب تأثير السم والذي يعد من اسباب تحفيز وزيادة اعداد الصفائح الدموية. وكانت

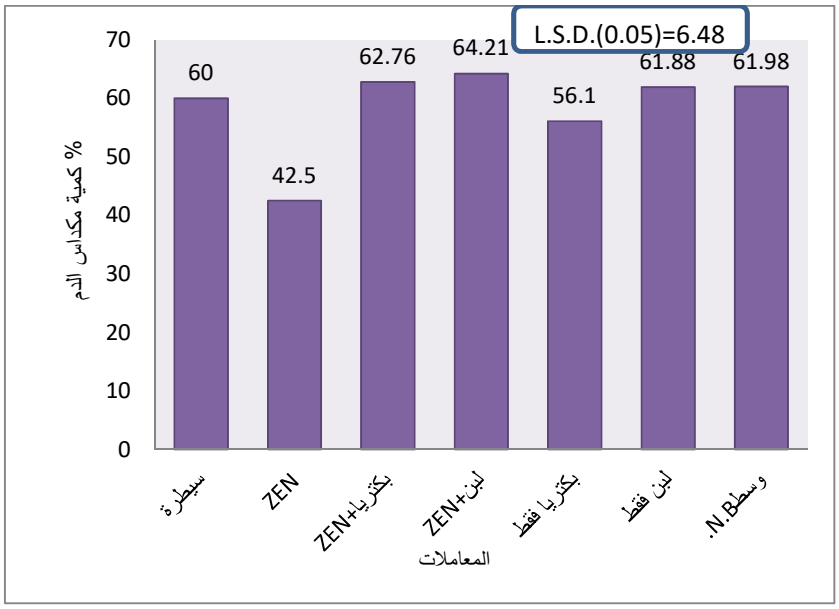
النتيجة مقاربة لما توصل اليه Ali وآخرون(2015) عند معاملة الجرذان بسم الزيرالينون حيث كانت نسبة معاملة السم 10³X1400 صفيحة/مل ومعاملة السيطرة 883 X ³10 صفيحة/مل.



شكل(9) تأثير بكتريا *L.plantarum* والبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الأبيض.

6.9.4.حساب مكداس الدم (PCV)(HTC)

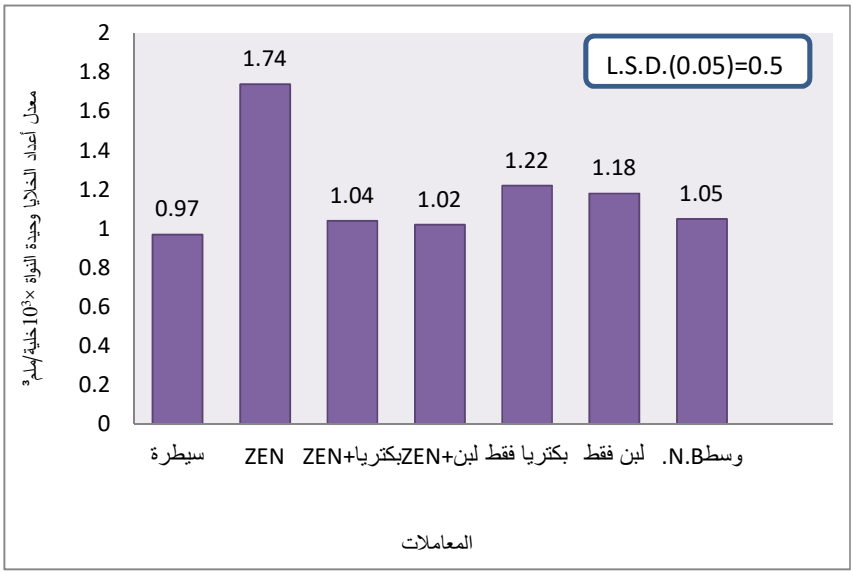
أظهرت نتائج(شكل10) أن سم الزيرالينون أثر سلباً في حجم الخلايا المرصوصة (PCV) في دم الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون فقط اذ انخفض الحجم الى42.5% في حين كان في دم حيوانات السيطرة (لم تعامل بالسم)60%اما معاملة كل من البكتريا واللبن مع السم فقد بلغت62.76%و64.21% على التوالي وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه الخفاجي(2014) و El-Taee(2015), اذ وجدوا انخفاض مكداس الدم عند معاملة الجرذان بسم الزيرالينون وان سبب النقص يكون طردياً مع كريات الدم الحمر والهيموغلوبين. او بسبب تثبيط السم لأنزيمات التخليق الحيوي للهيموغلوبين أو بسبب تدمير اماكن تصنيع كريات الدم الحمراء في الأعضاء المكونة للدم(ATSDR, 2005؛ Jenkins و Smith, 2003).



شكل(10) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية مكداس الدم لذكور الجرذ الأبيض.

7.9.4.حساب اعداد الخلايا وحيدة النواة Monocyte

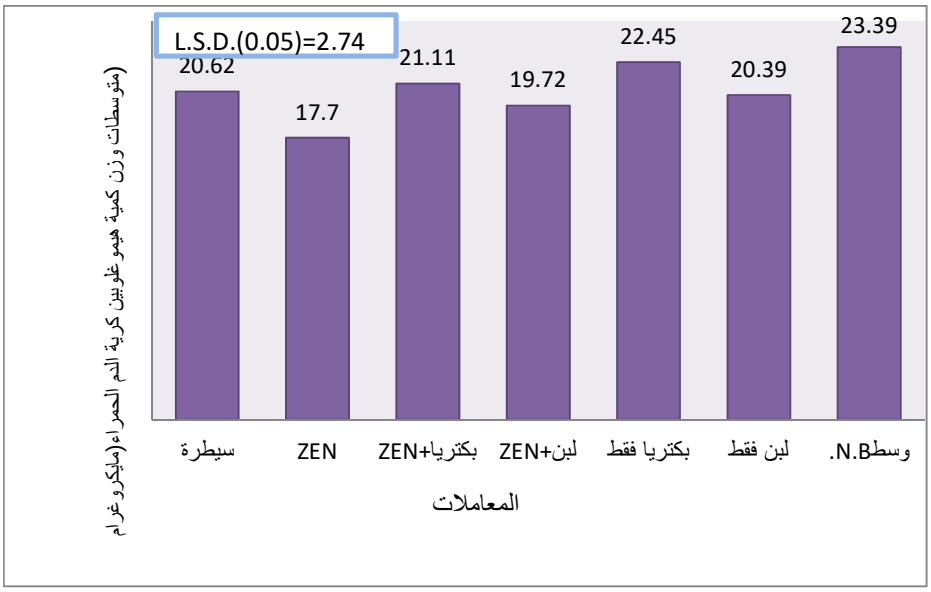
أظهرت نتائج(الشكل11) ان معاملة سم الزيرالينون أدى الى أرتفاعاً معنوياً في اعداد الخلايا وحيدة النواة حيث بلغ 10^3x1.74 خلية/ملم^3 مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 0.97x 10^3 خلية/ملم^3 كما خفضت بكتريا الـ *L.plantarum* واللبن مع السم اعداد الخلايا وحيدة النواة الى المستوى الطبيعي حيث بلغت 10^3x1.04 و 10^3x1.02 خلية/ملم^{3}على التوالي ولم تختلف معاملة البكتريا واللبن فقط عن معاملة السيطرة حيث كانت 10^3x1.22 خلية/ملم^3 و10^3x1.18 خلية/ملم^3 وهذه النتائج مطابقة لما وجده Ali وآخرون (2015) عند معاملته لإناث الجرذ الأبيض بسم الزيرالينون حيث بلغت نسبة الخلايا الوحيدة النواة في الدم عند معاملة السم 10^3x0.97 خلية/ملم^3 بينما بلغت في معاملة السيطرة 0.41 x 10^3 خلية/ملم^3.



شكل (11) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في أعداد الخلايا وحيدة النواة لذكور الجرذ الأبيض.

8.9.4.حساب متوسط وزن كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء (MCH)

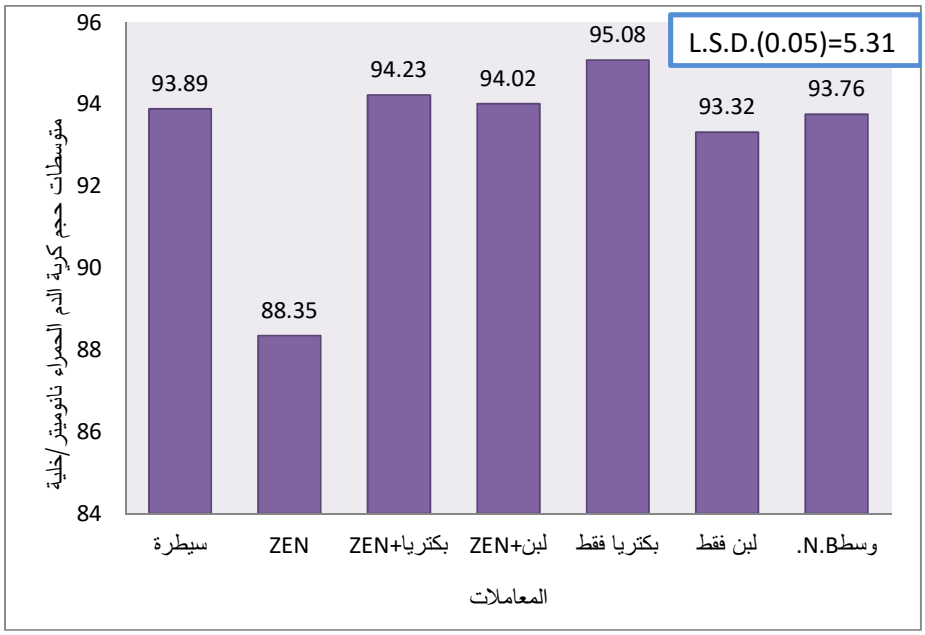
أظهرت النتائج(الشكل12) انخفاضاً معنوياً في كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء في معاملة السم إذ بلغت 17.7 مايكروغرام عن معاملة السيطرة التي كانت 20.62 مايكروغرام كما لم تختلف معاملة البكتريا واللبن مع السم عن معاملة السيطرة وبلغت قيمتهما 21.11 و 19.72 مايكروغرام ولم تختلف معاملة البكتربا واللبن فقط عن معاملة السيطرة 22.45 و20.39 مايكروغرام وان النقصان الذي يحدث في معاملة السم يدل على نقصان كمية الهيموغلوبين في الكرية الحمراء وهو مهم في تشخيص بعض انواع فقر الدم وفقاً لما ذكره Dacie وLiwes(1975). وان هذه النتائج مطابقة لما وجده Golder(2007) حيث اوضح حصول انخفاض في معدل RBCs وHb عند معاملة الجرذان بسم الافلاتوكسين AFB1 وادى ذلك الى حدوث نوع من انواع فقر الدم.



شكل (12) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في متوسط وزن كمية هيموغلوبين كرية الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض.

9.9.4.حساب متوسط حجم كرية الدم الحمراء MCV

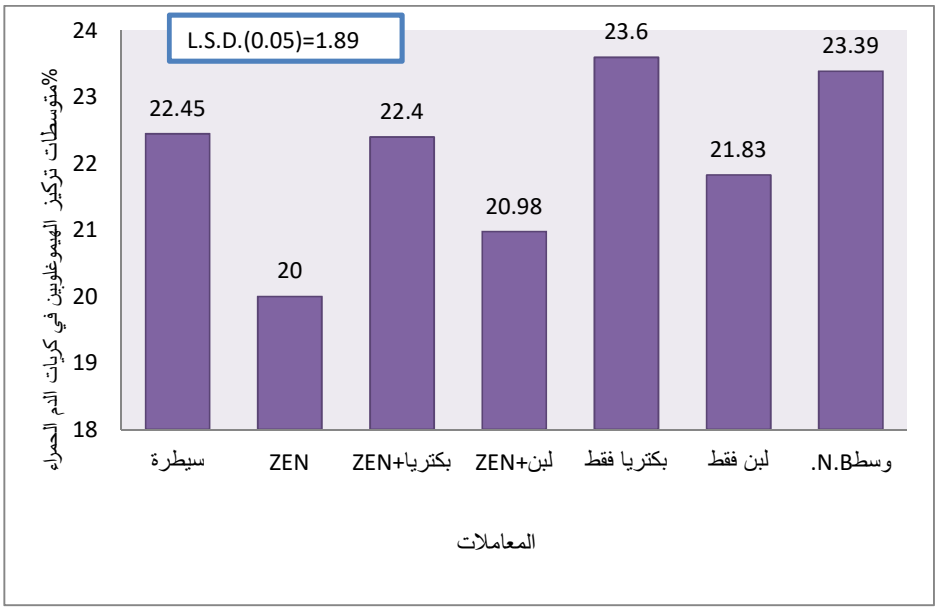
بينت نتائج(الشكل13) معاملة السم انخفاض متوسط حجم خلية الدم الحمراء فكانت 88.35 نانوميتر/خلية واختلفت معنوياً عن معاملة السيطرة والتي بلغت 93.89 نانوميتر/خلية كما لم تختلف معاملة البكتريا واللبن مع السم عن معاملة السيطرة والتي بلغت 94.23 و 94.02 نانوميتر/خلية على التوالي كما و بلغت معاملة البكتريا واللبن فقط 95.08 و 93.32 نانوميتر/خلية وان نقصان حجم الخلية يعبر عن نقص كمية الحديد في الدم كما ذكره Wintrobe(1967). وجاءت هذ النتائج غير متطابقة لما وجده Al-Saad (2014) اذ كانت قيمة الـ MCV في معاملة السم 61.46 وبلغت معاملة السيطرة 51.66 بينما جاءت مطابقة لما وجده Mahfous وآخرون(2015) عند معاملته للسمك البلطي بسم الأفلاتوكسين AFB1 حيث أدت معاملة السم الى انخفاض الـ MCV وكلما أزدادت كمية السم أنخفضت قيمته أكثر.



شكل(13) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في حجم كرية الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض.

10.9.4.متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء MCHC

أظهرت نتائج(الشكل14) انخفاضاً في تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء بلغت 20% بفارق معنوي عن معاملة السيطرة والتي بلغت 22.45% كما لم تختلف معاملة البكتريا واللبن مع السم حيث كانت 22.40% و20.98% ولم تظهر معاملات البكتريا واللبن فقط اي تغيير عن معاملة السيطرة وكانت 23.60% و21.8% وهذه النتائج مطابقة لما وجده Mahfous وآخرون(2015) عند معاملته للسمك البلطي بسم الأفلاتوكسين AFB1 وتزداد التغايرات بزيادة تركيز السم وفترة التعرض.



شكل(14) تأثير بكتريا *L.plantarum* واللبن وتداخلها مع سم الزيرالينون في متوسط تركيز الهيموغلوبين في كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الأبيض.

10.4.تقييم فعالية بكتريا الـ *L. plantarum* واللبن في تحطيم سم الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*) وبشكل وقائي في أنسجة الأعضاء الحيوية لذكور الجرذ الأبيض

أظهرت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من أعضاء الحيوانات المختبرية(ذكور الجرذ الأبيض) لأعضاء القلب والكبد والكلية والأمعاء الدقيقة والطحال وجود تغيرات نسيجية مرضية واضحة في تلك الأعضاء للحيوانات المعاملة بالسم مقارنة مع معاملة السيطرة فقد أظهرت نتائج(لوحة15) الفحص النسجي لقلب ذكور الجرذ الأبيض المعاملة بالسم فقط وجود احتقان دموي.

اما الفحص النسجي للأمعاء الدقيقة فتملث التغيرات المرضية بتحلل جزئي للزغابات مع تنخر وحصول ألتهاب في النسيج على شكل بقع فاتحة اللون(لوحة16).

وأظهر الفحص النسجي للكلية المعاملة بالسم ضمور في الكبيبة وتضخم في جدرانها وحصول موت الخلايا (تنخر) للكبيبة والأنابيب وحالة النزف الدموي(لوحة17).

اما المقاطع النسجية المأخوذة من الكبد فتمثلت الأعراض بحصول نزف دموي والتنخر والانحلال في بعض الخلايا (اي أنعدام النواة فيها) تشقق في الانسجة(لوحة18).

وفيما يخص الفحص النسيجي للطحال فقد ظهرت اعراض أحتقان دموي وتحلل في الخلايا(لوحة19).

مع مقارنة هذه الحالات مع معاملة السيطرة. أما الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون والمعاملة مسبقاً ببكتريا *L.plantarum* واللبن, والحيوانات المعاملة بالعالق البكتيري فقط واللبن فقط فلم تظهر أي اعراض مرضية على المقاطع النسجية لكل من القلب والأمعاء الدقيقة والكلية والكبد والطحال. وهذه النتائج تقاربت مع ماتوصل اليه Ali وآخرون(2015) حيث أظهرت نتائج الفحص المجهري لمعاملة سم الزيرالينون حدوث أعراض مرضية لأنسجة الكبد والكلى والأمعاء الدقيقة والطحال.

أن سبب تأثر القلب بالسم يعود الى رفع جهد الخلايا المكونة للأغشية وبالتالي حصول انفجار لهذه الخلايا و الموت المبرمج(Pestka و Forsell, 1988؛ Yang وآخرون, 2000) وقد أشار Amuzie وآخرون(2010) الى أن سم الأوكراتوكسين وT-2 يؤثر على القلب عن طريق امتصاص السم حيث كان أمتصاص القلب للسم أسرع من أمتصاص الغدة التيموسية Thymus (وهي التي تكون موجودة أعلى القلب قرب القصبة الهوائية), فقد أمتص القلب السم وحدث التغيير خلال 4.4 ساعة بينما احتاجت الغدة الصعترية الى 10.1 ساعة. كما أن السموم الفطرية تؤثر على القلب من خلال عدم أنتظام نبضات القلب التي تسبق إنخفاض ضغط الدم وحدوث الموت(Magnuson وآخرون، 1987؛ Wannemacherوآخرون, 1991)

وقد عزى Susheela وآخرون(1992) الضرر النسيجي الحاصل في الأمعاء الى قدرة السموم الفطرية على تدمير نسيج الأمعاء, أو ان هذه السموم تمتلك القابلية على تكوين مركبات حامضية جديدة مثل حامض الفينوليك Phenolic acid نتيجة تفاعلها مع الحوامض الموجودة في الأمعاء اذ تكون الحوامض الجديدة قادرة على النفاذ بسرعة فضلاً عن تثبيط الأنزيمات وهذا يؤدي الى حدوث تحطم في بطانة الأمعاء. كما أن مركبات الأيض الثانوية تعمل على تخريب الطبقة المخاطية في المعدة والقناة الهضمية وبالتالي حصول تغيرات في محتويات الدهون بفعل انزيم الـ Lipase الذي يعمل على تحليل الدهون(Chiou وآخرون, 2001).

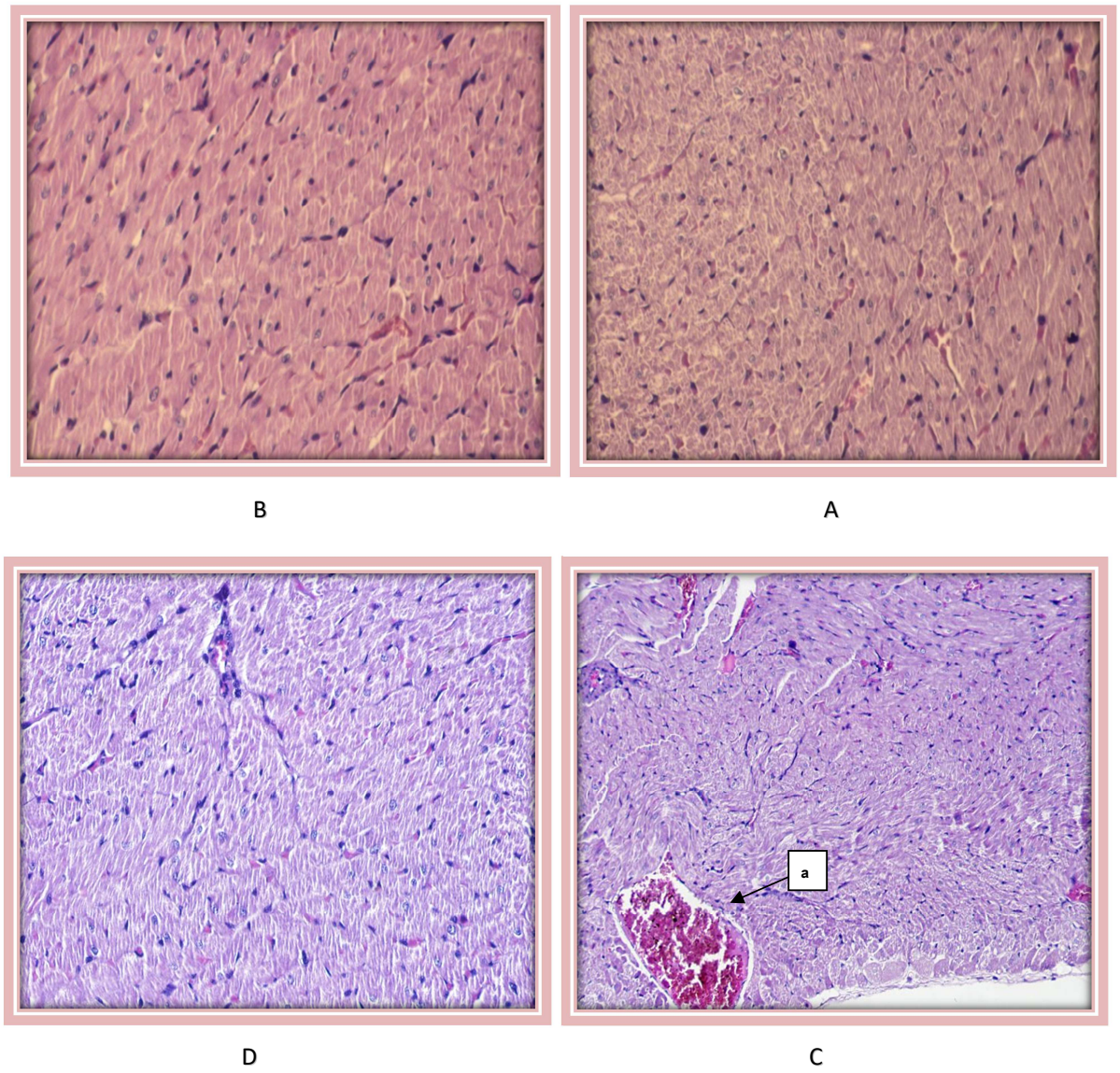
كما تؤثر السموم الفطرية على الكلية عن طريق اكسدة الدهون في الأغشية الخلوية لخلايا الكلية وبذلك تزداد نضوحية العناصر المكونة لبلازما الدم وبالتالي حدوث أنكماش الكبيبات وموت الخلايا(Luty

وآخرون, 2001) وهذه النتائج تطابقت مع ما توصل اليه El-Taee(2015) عند معاملة اناث الجرذ الأبيض بسم الزيرالينون.

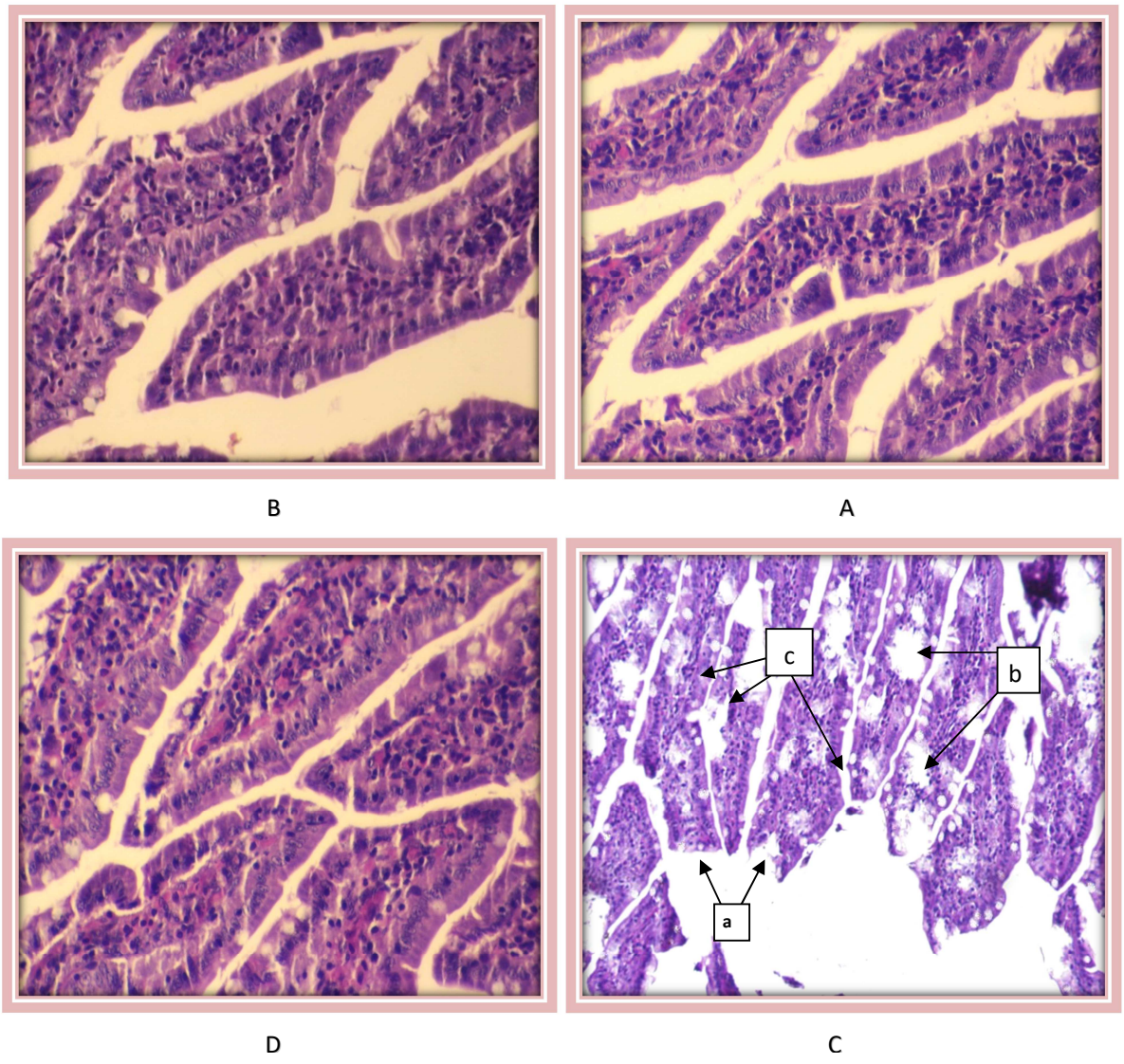
إن سبب تأثر الكبد بهذه السموم يعود الى تسرب السوائل من خلايا الكبد وبالتالي وصولها الى الدورة الدموية (Zimmerman وSeeff, 1970؛ Richardson وآخرون, 1987) كما يؤثر السم على غشاء الخلايا وحصول تقلص وبالتالي زيادة النفاذية وخروج الأنزيمات خارج الخلايا(Coles وCox, 1981) وكانت هذه النتيجة مقاربة لما وجده الخالدي(2010) والساعدي(2014).

وان سبب حصول النزف الدموي في الأنسجة يعود الى نزف الأوعية الدموية,وخروج الخلايا المكونة للدم الى الأنسجة بعملية النضح وهذا يسبب الألتهاب في الأنسجة (Macsween وWhaley، 1992).

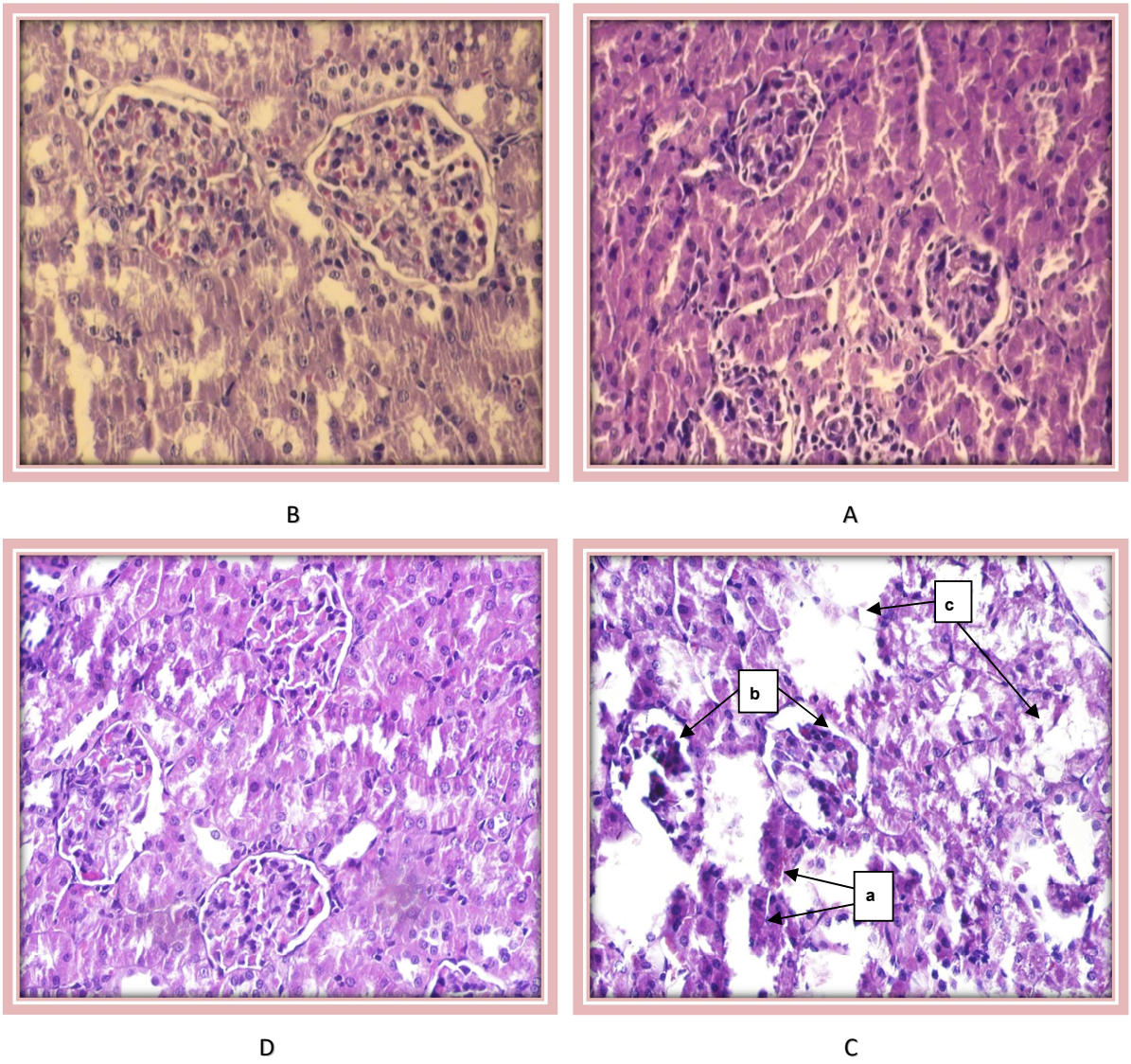
وأظهرت بكتريا الـ *L. plantarum* فعالية عالية في حماية أعضاء الجرذ الأبيض المدروسة من تأثير سم الزيرالينون اذ استطاعت تحطيم سم الزيرالينون وحماية انسجة أعضاء كل من القلب والأمعاء الدقيقة والكلى والكبد والطحال اذ أظهرت المقاطع النسيجية المعاملة بسم الزيرالينون والتي عوملت بالبكتريا مسبقاً كانت خالية من الأعراض المرضية مشابهة في ذلك معاملة السيطرة وهذا يعود الى أمتلاك بكتريا الـ *L.plantarum* القدرة على أختزال وربط بدرجة كبيرة أو ان هذه البكتريا تفرز انزيمات تستطيع تحليل المادة السامة (Magan وOlsen, 2000) وهذا مايؤكد سلامة الأعضاء المدروسة من اضرار هذا السم. كما أن اللبن وفر حماية عالية جداً للحيوانات التي جرعت باللبن بشكل وقائي اذ كانت انسجة الأعضاء خالية من اي أعراض مرضية ولم تختلف عن معاملة السيطرة بسبب احتواء اللبن على عدة انواع بكترية والتي لديها القدرة على حماية الجسم من تأثير السم.



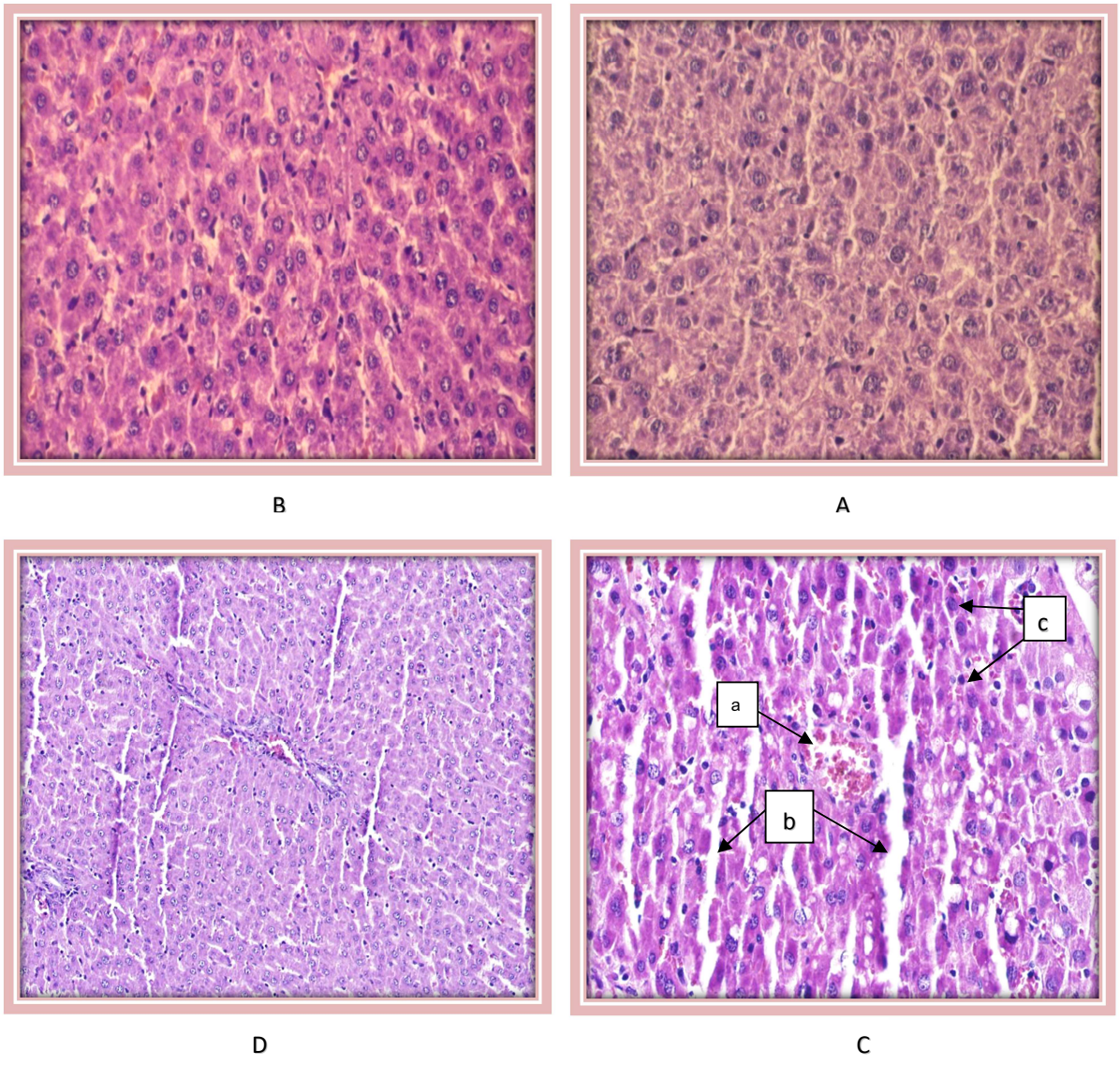
لوحة(15) تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في قلب ذكور الجرذ الأبيض (قوة التكبير X40)A =معاملة السيطرة B معاملة اللقاح البكتيري فقط Cمعاملة سم الزيرالينون فقط a=أحتقان دموي D=معاملة لقاح البكتريا والسم معاً



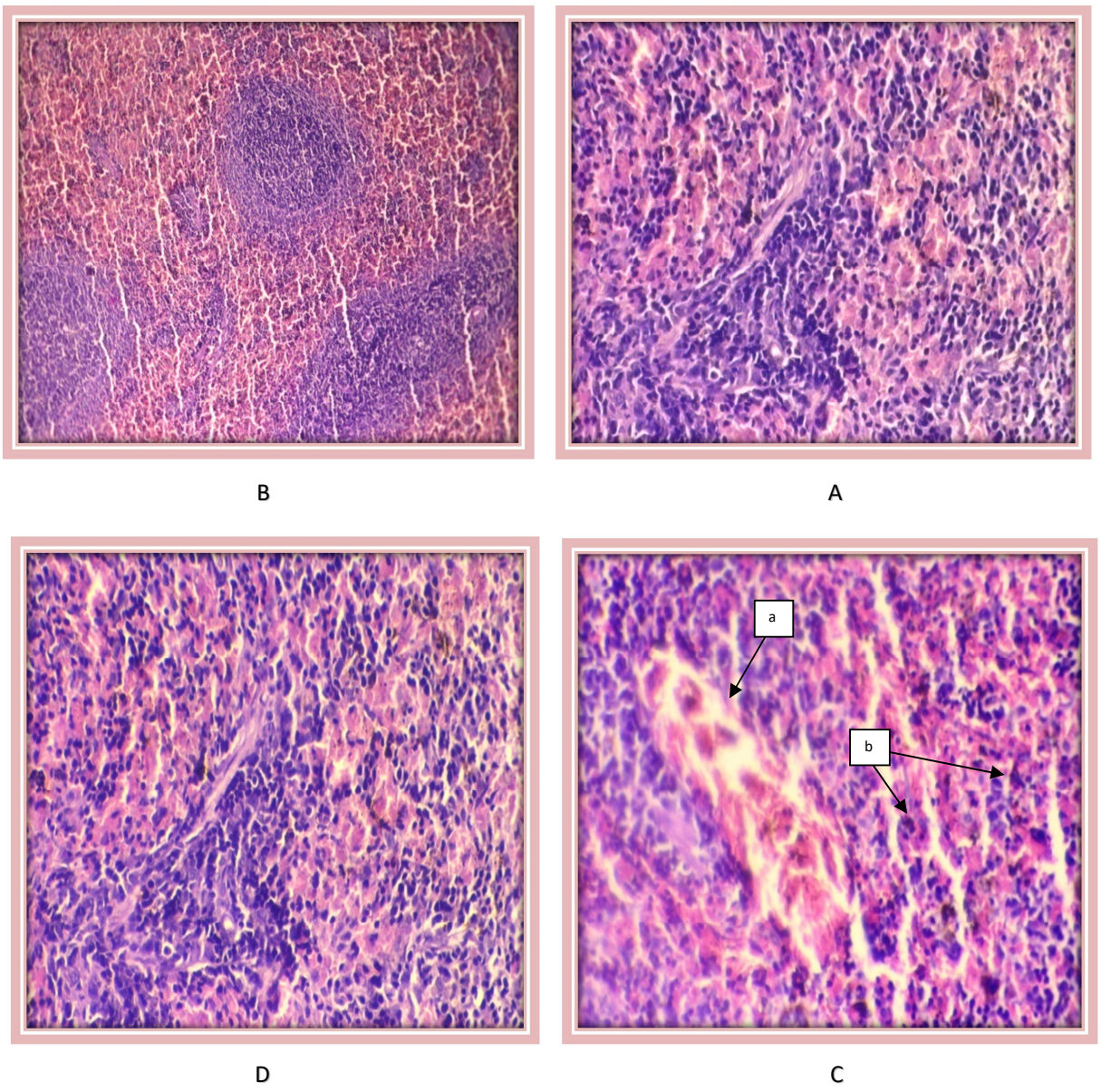
لوحة(16) تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في أمعاء ذكور الجرذ الأبيض (قوة التكبير X40) A=معاملة السيطرة B معاملة لقاح البكتريا فقط C معاملة سم الزيرالينون فقط a= تحلل جزئي للزغابات b =تنخر جزئي للزغابات C =التهاب في النسيج D =معاملة لقاح البكتريا والسم معاً



(17) تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في كلى ذكور الجرذ الأبيض (قوة التكبير X40) A=معاملة السيطرة B=معاملة اللقاح البكتيري C=معاملة سم الزيرالينون فقط a=أحتقان دموي b =ضمور الكبيبة وتضخم جدرانها c=تنخر الأنابيب D=معاملة لقاح البكتريا والسم معاً



لوحة(18) تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في كبد ذكور الجرذ الأبيض (قوة التكبير X40) A=معاملة السيطرة B=معاملة اللقاح البكتيري فقط C=سم الزيرالينون فقط a=أحتقان دموي b =تنخر النسيج c=انحلال الخلايا D=معاملة لقاح البكتريا والسم معاً



لوحة(19) تأثير لقاح البكتريا *L.plantarum* على سمية سم الزيرالينون في طحال ذكور الجرذ الأبيض (قوة التكبير X40) A=معاملة السيطرة B=معاملة اللقاح البكتيري فقط C=سم الزيرالينون فقط a=أحتقان دموي b =تحلل في الخلايا D=معاملة لقاح البكتريا والسم معاً

5.الإستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

1.5.الإستنتاجات Conclusions

1.معظم عزلات الفطر *F.verticillioides* المعزولة من عينات حبوب الذرة الصفراء منتجة لسم الزيرالينون.

2.تواجد ثلاثة أنواع من البكتريا في عينات اللبن المختبرة وهي *L.plantarum* و *L.rhamnosus* و *S.thermophils* .

3.بينت نتائج هذه الدراسة قدرة بكتريا *L.plantarum*عل إختزال سمية الزيرالينون خارج الجسم الحي (*In vitro*) وكذلك ظهرت فعاليتها في حماية النظم الحيوية لحيوانات الجرذ الأبيض والمتمثلة بالمحافظة عل المستويات الطبيعية لعددمن معايير الدم الفسيولوجية فضلا عن قدرتها عل حماية أنسجة أعضاء الكبد والكلية والقلب والأمعاء والطحال.

2.5.التوصيات Recommendations

1.تشجيع أفراد المجتمع علا تناول شراب اللبن بصورة مستمرة كونها تحمي الجسم من الأثار السمية لسم الزيرالينون.

2.إجراء دراسات أخرى تستخدم فيها بكتريا *L.plantarum* في حماية النظم الحيوية (حيوانات مختبرية) من آثار سموم فطرية أخرى وخاصة Aflatoxins و Ochratoxin A وFumonisin A و F.B1.

3.تقييم فعالية نوعي البكتريا في أختزال سمية بعض السموم الفطرية Mycotoxin.

4.إستخدام المستحضر الحيوي للقاح البكتريا *B.subtilis* في حماية حبوب الذرة الصفراء المستخدمة في الأعلاف الحيوانية من الإصابة بالفطر *F.verticillioides* والملوث بسم الزيرالينون.

المصادر.....References

المصادر العربية:

ابراهيم, اسماعيل خليل والجبوري, كركز محمد ثلج.(1998).السموم الفطرية آثارها ومخاطرها. مركز اباء للأبحاث الزراعية. الطبعة الأولى. دار الكتب والوثائق – بغداد.343 صفحة.

أبو يونس،عهد.(2007).دراسة خصائص بكتريا حامض اللبن المعزولة من بعض منتجات الألبان السورية.أطروحة دكتوراه,كلية الزراعة جامة دمشق صفحة 100.

الأسدي, دعاء فايق علي محمد.(2013).التوظيف الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* في السيطرة على إصابة حبوب بعض المحاصيل الأقتصادية بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus*. رسالة ماجستير قسم علوم الحياة.كلية التربية.جامعة كربلاء. ص 89.

الأسودي، محمد حميد ياسين.(2002). التهجين التبادلي وتقدير المعالم الوراثية والارتباطات الوراثية والمظهرية بين الصفات لسلالات نقية من الذرة الصفراء. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة .جامعة بغداد.

الجميلي، سامي عبد الرضا.(2014).السموم الفطرية .دار الكتب كربلاء. العراق 422 صفحة.

الجهاز المركزي للأحصاء.(2015).تقرير انتاج القطن والذرة الصفراء والبطاطا.مديرية الأحصاء الزراعي.الجهاز المركزي للأحصاء/العراق.آذار.(2016).

الحديثي, عدي نجم إسماعيل.(2005).دراسة سيرولوجية وتحطيمية للسم T-2 باستخدام عوامل فيزيائية وبيولوجية.اطروحة دكتوراه.كلية الزراعة.جامعة بغداد.110صفحة.

الخالدي، بهيجة عبيس حمود.(2010).التوصيف الوظيفي والجزيئي لبعض عزلات الفطر *Geotrichum sp.*والكشف عن بعض تأثيراتها الوظيفية والنسيجية المرضية في ذكور الجرذ الأبيض.اطروحة دكتوراه.كلية العلوم.جامعة الكوفة.

الخفاجي, محمد فخري حسين.(2014). التحري عن سم Zearalenone في بعض أصناف الحبوب الستراتيجية وإمكانية معالجته إحيائياً. رسالة ماجستير, قسم علوم الحياة, كلية التربية, جامعة كربلاء.ص92.

الساعدي, ذو الفقار عبد الستار جبار.(2014). المقاومة المتكاملة للفطرين *A.niger* و *A.parasiticus* المنتجة للسموم الفطرية والملوثة لثمار التفاح والكمثرى. رسالة ماجستير قسم وقاية النبات . كلية الزراعة. جامعة كربلاء ص 117.

المصادر.....References

العاشور, علي جابر جاسم.(2009). تقييم كفاءة بعض العزلات المحلية التابعة للجنس Bacillus في السيطرة على بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة والباميا. أطروحة دكتوراه, كلية العلوم, جامعة الكوفة, 152 صفحة.

العميدي، رملة أحمد محمد.(2009).تأثير البكتريا *Bacillus subtilis*في حماية حبوب الذرة الصفراء من الأصابة بالفطرين *Aspergillus niger vantieghem* و *Aspergillus flavus link*.رسالة ماجستير,كلية العلوم,جامعة الكوفة 80صفحة.

القيسي, إيمان عباس عبود. (2010). إستعمال بعض المواد الكيميائية والمساحيق النباتية والأحيائية للحد من تلوث العلائق بسم الزيرالينون Zearalenone ودراسة أثر التداخل مع سم الأفلاتوكسين B1 في طيور السمان . رسالة ماجستير, كلية الزراعة ,جامعة بغداد. ص 109.

الهاشمي, هدى عبد الرضا عبد الله.(2014). المعالجة الأحيائية لسم الفلاتوكسين B1 ومبيد Bifenthrin بإستخدام بعض أنواع البكتريا . أطروحة دكتوراه قسم علوم الحياة . كلية التربية . جامعة كربلاء ص 169.

الورشان، سالم حسن صالح (1999). استعمال بعض الممدصات الكيميائية للحد من تلوث علائق الطيور الداجنة بالأفلاتوكسين، رسالة ماجستير، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد ص89.

سلومي، علي كريم.(2007).الكشف عن سم الزيرالينون في الذرة الصفراء واختزال سميته، رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة بغداد، ص84.

شعبان، عواد والملاح، نزار مصطفى.(1993).المبيدات.دار الكتب للطباعة والنشر-جامعة الموصل.520صفحة.

مغلس, محمود أحمد.(2004). الكشف عن فيومنزين B1 وإمكانية إزالة سميته في حبوب الذرة الصفراء, تأثيراته الحيوية في الطيور الداجنة. أطروحة دكتوراه. قسم وقاية النبات-كلية الزراعة-جامعة بغداد.

ميخائيل، سمير وبيدر،تركي.(1982).أمراض البذور.دار الكتب للطباعة والنشر.جامعة الموصل.475صفحة.

المصادر الأجنبية:

Aattouri,N.;Bouras,M.;Tome,D.;Marcos,A. and Leronnier,D.(2002). Oral ingestion of lactic acid bacteria by rate increases lymphocytic proliferation and interferon proliferation and interferon production.*Br.J.Nutr*.87:267-370.

Abbas, H.K.; Mirocha, C.J. and Thomas, S.(1984). Mycotoxin produced from fungi isolated from foodstuff and rat feeding test.*Appl.And environ. Microbio*. 48:654-661.

Abbes, S.; **Jalilla, B.S.A.; Hakimeh, S.; Rania, J.; Kambis, A.N. and Ridha, O.(2013).** Ability of *Lactobacillus rhamnosus* GAF01 to remove AFM1 *in vitro* and to counteract AFM1 immounotoxicity *in vivo*.*Jou.Imm*. 10(3): 279-286.

Abdel-Wahhab,K.G.;Mannaa,F.A.and Abdel-Wahhab,M.A.(2014). Panax ginseng C.A.Meyer Extract Protects Rat Erythrocyte from the Oxidative Damage Induced by the Synergistic Effects of Subchronic Treatment with Aflatoxin B1 and Fumonisin. *British Jou. of Med. & Medi. Rese*.4(9):1883-1901.

Adawi,D.;Kasravi,F.B.;Molin,G.and Jeppsson,B.(1999). Effect of *Lactobacillus* supplementation without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model.*Hepat*.25: 642-647.

Agrios,G.N.(2005). Plantpathology.5th. Ed.Academic press.New York. 948 pp.

Ahamed,S.,Foster,J.S.,Bukovsky, A.,and Wimalasena,J.(2001). Signal transduction through the ras/erk pathway is essential for the mycoestrogen zearalenone-induced cell-cycle progression in mcf-7 cell. *Molecular Carcinogenesis*.30(2):88-98.

Ahmad,Y.;Hameed, A.;Aslam,M.and Ghaffar,A.(1997). Estimation of yield losses in corn due to stalk rot pathogens.*Pak.J.Bot*.29(2): 229-234.

Alexopoulos,C.J.and Mims,C.W.(1979). Introductory Mycology,3rd ed. John Wiley & Sons.New York.USA.632 PP.

Ali,S.A.;Ibrahim,H.J.;Ali,M.N.;Ali,K.M.;Shahad,H. H.; Rusul,N.K.; Zahraa, J.R.and Meyameen,H.M.(2015). Bioremediation of Zearalenone by using *Lactobacillus acidophilus* in albino rats bodies (*in vivo*).*Cont Med Sci* 1(1):21-25.

Alippi,A.and Monaco,C.(1994). Antagonismo *in vitro* deespecies de *Bacillus contra,Sclerotium rolfsiin,Fusarim solani*. *Revista de la facultad de Agronomia.La plata.*70:91-95.

Alldrick,A.J.and Knight,C.(2000). Mycotoxins in cereals,prevention is better than cure,Proc.BCPC Conf.Pests and Diseases.Brighton.2:701-706.

Al-Saad, L. A. N.(2014). The Impact of Biological and Non-biotic Environmental Control on *Aspergillus flavus* Growth, aflD and aflR Expression and Aflatoxin B1 Production.PHD Thesis.Department of Biology. Faculty of Science.University of Basrah.pp 186.

Amuzie,C.J.;Islam,Z.;Kim,J.K.;Seo,J.H.and Pestka,J.J.(2010). Kinetics of Satratoxin G Tissue Distribution and Excretion Following Intranasal Exposure in the Mouse.*Toxico. Scie*.116(2):433-440.

Ara,K.(2007).*Bacillus* minimum genome factory:effective utilization of microbial genome information.*Appl.Bio.Biochem*.46(3):169-178.

Atef.M.N. and Haikel,N.(2008). Efficacy of Seed Treatment with Microbial Agents And Waste Products for the control of Cucumber Damping-off Botany Department.Faculty of Science.Cairo University. Egypt.

ATSDR.(2005). Draft Toxicological Profile for Lead. US Department of health and human services, Atlanta,Georgia,USA, pp.102-225.

Bacon,C.W.;Yates,E.;Hinton,D.M.;and Meredith,F.(2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize.*Envi.Health Perspectives*. 109:325-332.

Balazi,F.; Bagi,F.;Stojsin,V.;Mastilovi,J.and Bukvi,Y.(2006). The effect of chemical protection of wheat from the causal agents of esconomically VII Advising panel on plant protection. Zlatibor, 27 November-1 December 2006.Abstracts.54-55.

Bancroft,J.D.and Stevens,A.(1982). Theory and practice of histologicaltechnique. Churchill living Stone.New York.pp.117.

Bandon,J.E.;Br-tz,H.and Hecker,M.(2002).*Bacillus subtilis* Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the B-Dependent General and Multiple Stress Response.*Jou. of bacter*.182(2): 459-467.

Bankole,S.A. and Adebanjo,A.(2003). Mycotoxins in food in West Africa: Current situation and possibilities of controlling it.*African Jou. of Bio*.2(9):254-263.

Bennet,J.W.and Klich,M.(2003). Mycotoxins.*Clinical Microb. Reviews*. 16:497-516.

Benzoni,E.;Minervini,F.;Giannoccaro,A.;Fornelli,F.;Vigo,D. and Viscont,A. (2008). Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swin sperm quality.*Reproductive Toxico*.25:461-467.

Berthiller,F.;Krska,R.;Domig,K.J.;Kneifel,W.;Juge,N.and Schuhmacher, R.(2011). Hydrolytic fate of deoxynivalenol-3-glucoside during digestion. *Toxicology Letters*.206(3):264-267.

Blanc,P.J.,Loret,M.O.and Goma,G.(1995). Production of citrinin by various species of Monascus.*Biotechol.Lett.*17:291-294.

Blaney, B.J.and Dodman,R.L.(2002).production of zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol. And acetylated derivatives by Australian isolated of *Fusarium graminearum* and *F.pseudogramnearum* in relation to source culturing conditions. *Australian journal of Agri. research* 53:1317-1326.

Bloomquist,C.;Davidson,J.N.and Pearson,E.G.(1982). Zearalenone toxicosis in prepubertal dairy heifers,*J.Am.Vet.Med.Assoc*.180:146-52.

Booth, C.(1971). The genus *Fusarium*. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Booth,C.;Gorrire,S.and Mabsin,T.M.(1988). Life Strategies among fungal; assemblages on *Salicornia eurooase* egg.*Mycol*.80:176-191.

Bottallico,A.(1997). Taxigenie *Fusarium* species and their mycotoxins in pre-harvest cereals in Europe.Bulletin of the Institute for Comprehensive Agricultural Seiences Kinki University.Nara.Japan.5:47-62.

Branton,S.L.;Deaton,J.W.;Hagler,W.M.;Maslin,W.R. and Hardin, J.M. (1989). Decreased egg production in commercial laying hens fed zearalenone and deoxynivalenol contaminated grain sorghum.*Avian Dise*.33:804-808.

Broadbent,P.;Baker,K.F. and Waterworth,Y.(1971). Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungi root pathogens in Australian soils. *Austr.J.Biol.Sci.*24: 925-944.

Brown,B.A.(1976). Principles and procedure.2nd ed.Lea and Febiger. Philadelphia.A New York.pp.78.

Cahagnier,B.;Melcion,D and Richard,M.D.(1995). Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as afunction of different water activities.*Lett. Appl.Microbiol.*20:247-251.

Caldwell,W.R.,Jhon,T.;Martin,S.and Robert B.(1970). Zearalenone Production by *Fusarium* Species.*Appl.Micro*.20:31-34.

Carr,F.J.;Chill,A. and Maida,N.(2002). The Lactic acid bacteria:a literature survey.*Critical Reviews in Micro*.28:281-370.

Chandra,S.N.;Shankar,A.C.U.;Niranjana,S.R. and Prakash,H.S. (2008). Molecular detection and characterization of *Fusarium verticillioides* in maize(*Zea maysL.*) grown in southern India.*Ann. of Micro*.58(3):359-367.

Chen,X.H.;Koumoustsi,A.;Scholz,R.and Eisenreich,A.(2007). Comparative analysis of the plant growth-Promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42.*Nature bio*.25(9):16-20.

Chiou,A.;Verger,R.;Kokotos,G.(2001). Synthetic routes and lipase inhibiting activity of long chain alpha-keto amides.63(5):535-542.

Citak,S.;Yucel,N.and Orhan,S.(2004). Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese.*Int.J.Dairy Technol.* 57(1):27-31.

Clark,F.E.(1965). Agar-plats method for total microbial(C.F:Black, 1965 methods of soil analysis.Part 2 publisher Madison,Wisconsin.USA.pp.1572.

Clements,M.J.;Campbell,K.W.;Maragos,C.M.;Pilcher,C.;Headrik,J.M.;Patak y,J.K.and White,D.G.(2003).influence of Cryl Ab protein and hybrid genotype on fumonisin contamination and *Fusarium* ear rot of corn.*Crop.Sci*.43:1283-1293.

Cloherty,E.K.;Livine K.B.and Carruthers.A.(2001). The red blood cell glucose transporter presents multiple nucleotide sensitive sugar exit sites.*Bioch.* 40:15549-15561.

Collee,J.G.;Fraser,A.G.;Marmion,B.P.and Simmons,A.(1996). Practical Medical Microbiology. (14th ed).Churchill Livingston.London.

Collins,T.F.;Sprando,R.L.;Black,T.N;Olejnik,N.;Eppley,R.M.and Alam,H.Z. (2006). Effects of zearalenone on in utero development in rats.*Food Chem Toxicol*.44(9):1455-1465.

Coombs,J.T.and Franco,C.M.M.(2003). Isolation and identification of Actinobacteria from surface sterilized wheat root.*Appl.Env.Micro*. 69:5603-5608.

Cotter,P.D. and Hill,C.(2003).surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low PH.MMPR.67(3):429-453.

Dacie,J.V.and Lewis,S.M.(1975). Practical Haematology.Churchill Livingstone.London.pp.317.

Dailey,R.E.and Reese,R.E.(1980). Metabolism of($_{14}$C)zearalenone in laying hens.*J.Agric.Food Chem.*28:286-291.

De Vuyst,L.;Callewaert,R.and Crabbe,K.(1996). Primary metabolite Kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions.*Micro*.142:817-827.

Dunne,C.L.;O'Mahony, L. M.;Thornton,G.;Mortissey,D.;O'Halloran, S.; Feeney,M.and Flynn,S.(2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin:Correlation with *in vivo* findings.*Am.J.Clin. Nutr*.73(2):386-392.

Edens,F.W.(2003). An alternative for antibiotic use in poultry:Prpbiotics. *Rev.Bras.Sci.Avic*.5(2):101-134.

Edwards,S.;Cantley,T.C.;Rottinghaus,G.E.;Osweiller,G.D. and Day,B.N. (1987). The effects of zearalenone on reproduction in swine.I.The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in-pregnant,sexually mature gilts, Theriogenology.28:43-49.

Eklow,L.;Rossi,L.;Thor,H.and Orrenius,S.(1986). Effects of oxidative stress caused by hyperoxida and diquat. A study in isolated hepatocytes.*Free-Radic-Res-common*.2(1-2):57-68.

El-Makawy,A.;Mohammed,S.H.;and El-Sayed A.(2001). Genotoxic evalution for the estrogenic.mycotoxin Zearalenone.*Reprod.Nutr.Dev*.41:79-89.

El-Nezami, H.S.; Kankaanpa'a,P.E.;Salminen,S.and J.T.Ahokas. (1998). Physico-chemical altertions enhance the ability of dairy strains of lactic acid bacteria to remove aflatoxins from contaminated media.*J. Food Prot.*61:466-468.

El-Nezami,H.S.; Mykka'nen, H.;Kankaanpa'a, P.;Salminen,S.and Ahokas, J.T.(2000). Ability of *Lactobacillus* and Propionibacterium strains to remove aflatoxin B1,from the chicken duodenum.*J.Food.Prot.* 63:549-552.

El-Nezami, H.;Polychronaki,S.; and Mykkeanen,H.(2002). Binding rather than metabolism may explain the interaction of two food-gra de lactobacillus strains with zearalenone and its denvative- α-zearalenol. *Appl. and Envi.Micro*.68(7): 3545-3549.

El-Taee,Z. K. T.(2015). Bioremediation of Zearalenone by using *Lactococcus lactis subsp. Cremoris* in Albino Rats. MSC Thesis . Department of Biology .Faculty of Science.University of Kufa pp 81.

Eriksen,G.S.and Alexander,J.(1998).*Fusarium* Toxins in Cereals-aRisk Assessment. TemaNord 1998:502. Nurdie Council of Ministers. Ekspressen Tryk and Kopicenter.Copenaghen.Denmark.146pp.

F.A.O.(2004).World Wide regulation for mycotoxin.(2003). Acompendium fao food and nutrition paper.Rome,Italy.Cited from (EFSA,2004).

Fandohan,P.; Hell,K.; Marasas,W.F.O.and Wingfield,M.J.(2003). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in africa. *African J. Bio*. 2(12):570-579.

Fazeli,M.R.;Hajimohammadali,M.;Moshkarin,A.;Samadi,N.,Jamalifra,H. and Khoshay,M. R.(2009). Aflatoxin B1 binding capacity of auto chthonous strains of lactic acid bacteria.*Jou. of Food Pro*.72(1):189-192 .

Feng,J.;Shan,M.;Du,H.;Han,X.;and Xu,Z.(2008).*In vitro* adsorption of zearalenone by cetyltrimethyl ammonium bromide-modified montmorillonite nanocomposites. *Microporous and Mesoporous Materials*.113(1):99-103.

Fiddman,P.J.and Rossall,S.(1995). Selection of bacterial antagonists for the biological control of *Rhizoctonia solani* in oli seed rape(*Brassica napus*).*Plant Pathology*.44:695-703.

Forbes,B.A.;Sahm, D.F.and Weissfeld,A.S.(2007). Baily and Scott's Diagnosis Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier company.USA.

Friend,D.W.;Trenholm,H.L.;Thompson,B.K.;Hartin,K.E.;Fiser,P.S.; Asem,E.K. and Tsang,B.K.(1990). The reproductive efficiency of gilts fed very low level of zearalenone.*Can.J.Anima.Sci*.70:635-645.

Fryer,T.F.and Rossi,J.(2004). Lactic acid bacteria in cheddar cheese *J.Dairy Res*.3:325-331.

Fuchs,S.;Sontag,G.,Stidl;R.;Ehrlich,V.;Kundi,M.and Knasmu,S. (2008). Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Che. Toxico*. 46(4):1398-1407.

Gaumy,J.L.;Bailly,J.D.;Benard,G.and Guerre,P.(2001). Zearalenone:origin and effects on farm animals.*Rev.Med.Vet.*152:123-136.

Giantsis,I.A.;Chaskopoulou,A.and Bon,M.C.(2017).Direct Multiplex PCR(dmPCR) for the Identification of Six Phlebotomine Sand Fly Species (Diptera:Psychodidae)including major leishmania vectors of the mediterranean. *Jou. of econo.Entm*.110(1):172-182.

Gilbertson,R.L.;Brown,W.M.;Ruppel,E.G and Capinera,J.L.(1986). Associationn of corn rootworm beetles in Colorado.*Phyto*.76:1309-1014.

Gimeno,A.and Quintanilla,J.A.(1983). Analytical and mycological study of a natural outbreak of zearalenone mycotoxicosis in horses.in Naguib K,Park D L,Naguib M M and Pohland A E.Proceedings of the International Symposium

on Mycotoxins.6-8 Sept,National Research Centre,Cairo(Egypt). *Rockvill. MD.FDA*.387-92.

Golder,B.(2007). The Anemias.in:KligmanR. M.,H.B.Jenson,R.E. Behrman and B.F.2007.Stanton. Nelson textbook of pediatric. Saunders. USA.P:2005.

Gourama,H.(1997). Inhibition of growth and mycotoxin of *Penicillium* by *Lactobacillus* species.*Lebensm-Wiss.Technol*.30:279-283.

Govindasamy,T.;Vidya,S.;Vinola,J.S.;Babu,V.;Shanthi,V.and Kathiresan, k. (2014). Identification of *Lactobacilli* Isolated from Mangrove Biotopes of East Coast of India.2(2):33-37.

Guandalin,S.;Pensabene,L.;Zikri,M.A.;Casali,L.G.;Hoekstra,H.;Kolacek,S.; Massar,K.;Micetic-Turk,D.;Papadopoulou,A.;De Sousa,J.S.;Sandhu, B.;Szajewska,H.and Weizman,Z.(2000).*Lactobacillus* GG admin-istered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: amulticenter European trial.*J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr*.30:54-60.

Hanlin,M.B.;Kalchayanand,N.;Ray,p.and Ray,B.(1993). Bacteriocins of lactic acid bacteria in antibacterial activity *J.of food prot*.50(3):252-255 .

Haskard,C.A.;Hani,E.N.;Kankaanpa,P.E;Salminen,S. and Ahokas,J.T. (2001). Surface Binding of Aflatoxin B1 by Lactic Acid Bacteria.*Appl.Env.Microbi.* 67(7):3086-3091.

Hawar,S.;Vevers,W.;Kanieb,S.;Ali,B.K;Billington,R.and Beal,J.(2013). Biotransformation of patulin to hydroscladiol by *Lactobacillus plantarum*. *Food Cont*.34(2) :502-508.

Hedberg,M.;Hasslo,F.and Twetman,S.(2008). Sugar fermentation in probiotic bacteria-an *in vitro* study.*Oral Micro. Immu*.23:482-485.

Hidy,P.H.;Baldwin,R.S.;Greasham,R.L.;Keith,C.L.and Mc-Mullen,J.R. (1977). Zearalenone and some derivatives production and biological activities .*Advances in Appli.Micro* .22:59-82.

Holt,J.G.;Krieg,N.R.;Staley,J.T.and Williams,S.T.(1994). Bergeys manual of determinative acteriology.9th ed.Williams and Wilkins. Baltimors, Maryland, USA.787 pp.

Hsuan,H.M.;Baharuddin,S.and Latiffah,Z.(2011). Molecular Identification of *Fusarium* Species in *Gibberella fujikuroi* Species Complex from Rice,Sugarcane and Maize from Peninsular Malaysia. *International Jou. of Mole. Scie*.12:6722-6732.

Huang,A.;Li,Shen,Z.Q.;Wang,X.W.;Jin,M.(2016). High-throughput identification of clinical pathogenic fungi by hybridization to an oligonucleotide microarray.*Jou. Cli. Microbio*.44:3299-3305.

Huttunen,E.;Noro,K.and Yang,Z.(1995).Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Jou*.5:503-513.

IARC (International Agency for Research on Cancer).(1993). Monographs on the evaluation of chemicals in humans, some naturally occurring substances:

Food Items & Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins.Lyon.IARC.

Ishii,K.;Sawano,M.;Ueno,Y.and Tsnnoda,H.(1974). Distribution of Zearalenone-producing *Fusarium* spp.*In Japan.Appl.Microbiol*.27: 625-628.

James, L.J.and Smith,T.K.(1982). Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine,*J.Anim.Sci*.55:110-118.

James,M.J.(2000). Modern Food microbiology 6th Edition.An ASPEN publishers,Inccontnersbin,Mary land.113-117.

Jawetz,E.; Melink,J.L;Adeberg,E.A.;Book,G.F.;Butel,J.S. and Morse, S.A.(2004). Medical Microbiology 24 th. ed.Appleten and lang New York.Connectical.pp.45-60.

JECFA.(2000). Joint FAO/WHO expert committee on food additives,53rd report. Safety evaluation of certain food additives.WHO Food Additives Series 44.

Jelinek,C.F;Pohland,A.E.and wood,G.X.(1999). World wide occurrence of Mycotoxins in Foods and feeds.An update.*J.Assoc.off.Anal.Chem*.72:223-230.

Jenkins, B.;Holsten,S.;Bengmark,S.and Martindale,R.(2003). Probiotics:A practical Review of their Role in specific clinical scenarios, Nutrition in Clinical Practice.20(2):262-270.

Jenkins,F.,Smith,J.(2003). Effect of sublethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp, Cyprinus carpio. Bull.Environ.Contam.*Toxicol*.70:947-993.

Jimenez, M.;T.Huerta and R.Mateo.(1997). Mycotoxin production by *Fusarium* species isolated from banana. *Appl.And Environm.Microbiol*.63:364-369.

Kankaanpaa,P.;Tuomola,E.;El-Nezami,H.;Ahokas,J.and Salminen, S.P. (2000). Binding of aflatoxin B1 alters the adhsion properties of *Lactobacillus* strain GG in acaco-2 model.*J.Food Prot.*63:412-414.

Karunaratne,A.;Wezenberg,E.and Bullerman,L.B.(1990). Inhibition of mould growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp.*Jou. of Food Prot*.53:230-236.

Kazmar,R.E.and Robert,M.G.(2000). Regression Analyses for evaluating the influence of *Bacills cereus* on Alfalfa Yield under variable disease intensity.*American Jou. of plant patho*.90:657-665.

Khanafari, A.;Soudi,H.;Miraboulfathi M.and Karamei Osboo,R.(2007). An *in vitro* investigation of aflatoxin B1 *biolo. Scie*.10(15):2553-2556.

Kontiokari,T.;Sundgvist,K.;Nuntinen,M.and Uhari,M.(2001). Randomised trial of cranberry juice and *Lactobacillus* Ggdrink for the prevention of urinary tract infection in women.*B.M.J*.1:453-456 .

Kubena,L.F.;Harvey,R.B.;Corrier,D.E.and Huff,W.E.(1987). Effects of feeding deoxynivalenol(DON,vomitoxin)-contaminated wheat to female white leghorn chickens from day old through egg production.*Poult Sci.* 66(10):1612-18. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.0661612 PMID:3432188 .

Kuiper-Goodman,T.;Scott,P.M.and Watanabe,H.Risk.(1987). assessment of the mycotoxin zearalenone.*Regul.Toxicol.Pharma.*7: 253-306.

Lacey, J.;Bateman, G.L. and Mirocha, G.J.(1999). Effects of infection time and moisture on development of ear blight and Deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. In wheat. *Ann. Appl.Biol*.134: 277-281.

Lanza,G.M.; wash burn,W.and Wxatt,R.D.(1980). Stroin Variation in Hematological response science.9:2686-2691.

Laura,A.S.and Eric,V.S.(1998). Target range of Zwittermicin A,an amino polyol antibiotic from *Bacillus cereus*.*Current Micro*.37:6-11.

Lavermicocca,P.;Valerio,F.;Evidente,A.;Lazzaroni,S.and Corsetti,A. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B.*Appl Env. Micr*.66:4084-4090.

Lew,H.; Adler A.and Edingre,W.(1997). Dynamics of the *Fusarium* Toxin distribution in maize plants affected by stalk rot.*Cereal Research Communications* 25:467-470.

Lortal, F.;Valence,C.;Bizet,J.and Maubois,L.(1997). Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases,a new tool for bacterial species identification: Application to 10 *Lactobacillus* species. *Res.Microbiol.*148(6):461-474.

Luty,S.; Przebirowska,D.O.; Latuszynska,J. and Rodak,M.T.(2001). Histological and Ultra structural studies of rats exposed to Mycotoxins. *Ann.Agric.Environ. Med*.9:12-34.

Macfaddin,J.F.(2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria.(3 rd.ed.).Williams and Willkins CO.USA.912 pp.

Macky,D.R. and Jones,R.K.(2000). The effect of previous crop residues and tillage on *Fusarium* head blight of wheat.*Plant Dis*.84:71-76.

Macsween,R.W. and Whaley,k.(1992). Murices development and survey.*Food Addit.Cutam*.16:253-265.

Madigan,M.T.and Martinko,J.(2005). Brock Biology of micro organisms (11^{th} ed.).Prentice Hall.ISBN 0-13-1443291.

Magan,N.and Olsen,M.(2000). Mycotoxin in food.Cambridge, England: Wood Head publishing Limited.pp.700.

Magan,N.and Olsen,M.(2004). Mycotoxins in food:Detection and control. USA: CRC press LLC.461pp.

Maggi,O.;Tosi,S.;Angelova,M.;Lagostina,E.;Fabbri,A.A.;Lorenzo,P.; Altobelli,E.;Picco,A.M.;Savino,E.;Branda,E.;Turchetti,B.;Zotti,M.,Vizzini, A. and Buzzini,P. (2013). Adaptation of fungi, including yeasts,to cold environments,Plant Biosystems.An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology:*Official Jou. of the Societa Botanica Italiana*. 147(1):247-258.

Magnuson,B.A.; Shiefer,H.B.; Hancock,D.S. and Bhatti,A.R.(1987). Cardiovascular effects of mycotoxin T-2 after topical application in rat. *Can.J.Physiol Pharma*.65(5):799-802.

Mahfouz ,M.;Sherif,E.and Ahmed,H.(2015).A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on Oreochromis niloticus health status .*The J.of Basic & Appl. Zoology*.71:48-59.

Malekinejad,H.;Schoevers,E.J.;Daemen,I.J.J.M.;Zijstra,C.; Colenbrander, B.; Fink-Gremmels,J.and Roelen,A.J.(2007). Exposure of oocytes to the *Fusarim* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs.*Biol. of Repro*.77:840-847.

Marasas,W.F.O.(2001). Discovery and Occurrence of the fumonisins: A Historical Perspective. *Envir. Health Persp.* 109(2):333-336.

Marin,D.E.;Taranu,I.R.;Bunacin,P.;Pascale,F.;Tudor,D.S.;Avarm,N.;Sarca, M.;Cureu,I.;Criste,R.;Stuta,V. and Oswald,I.P.(2002). Changes in Performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in wealing piglets exposed to low doses of aflatoxin.*J.Anim .Sci.*80: 1250-1257.

Marin,S.Magan,N.;Belli,N.;Ramos,A.J.;Canela,R.and Sanchis,V.(1999).and Twodimensional profiles of fumonisin B sub(1) production by *Fusarium moniliforme Fusarium proliferatum* in environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain.*Int.J.Food Microbiol.*51:159-67.

Mathiyazhagan,S.;kavitha,K.;Nakkeeran,S.;Chandrasekar,G.;Manian, K.;Renukadevi,P.;Krishnamoorthy,A.S.and Fernando,W.G.D.(2004). PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) Wei.*Arch.Phytopathol.Plant Protect.*33:183-199.

Mcspadden-Gardener,B.B.(2004). Ecology of *Bacillus* and *paenibacillus* spp. In agricultural systems.The American phytopathological society.94:1252-1258.

Megharaj,M.I.;Garthwaite,M.I.and Thiele,J.H.(1997). Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture.letters in *appli. Micro.*24: 329-333.

Miksicek,R.J.(1994).Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor.J. Steroid Biochem.*Mol. Biol*.49:153-160.

Millette,M.; Fran,C.M.L.; Marcia,T.R. and Monique,L. (2008). Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains.*Dairy Sci.Technol*.88:695-705.

Mirocha,C.J.;Pathre,S.V.;Sachauerhamer,B.and Christensen,C. M.(1976). Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feed stuffs. *Appl.Envi.Microbiol*. 32:533-545.

Mirocha,C.J.;Robison,T.S.;Pawlosky,R.J.and Allen,N.K.(1982). Distribution and residue determination of($_3$H)zearalenone in broilers.Toxicol.*Appl. Pharm*.66:77-87.

Morikawa,M.(2006). Beneficial Biofilm Formation by Industrial Bacteria *Bacillus subtilis* and Related Species. *Jou. of Bioen.*101(1):1-8.

Motawee,M.M.and El-Ghany,A.M.(2011). Effect of Some Lactic Acid Bacteria Strains on Aflatoxins Reduction in Some Dairy Foods.Development of Higher Specific Education Programs in Egypt and the Arab World.pp.2110-2124.

Moyne,A.,L.;Shelby,R.;Cleveland,T.E.and Tuzun,S.(2001). Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus.J.of Appl.Micro*. 90:622-629.

Mozzi,F.;Raul,R.R.and Graciela,M.V.(2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications.Blackwell Publishing.USA.PP.393.

Muller,H.M.; Reimann,J.; Schumacher,Y. and Schwadorf,K. (1997). Occurrence of Fusarium toxin in barley harvested during five years in an area of SW Germany. Mycopathologia 137:185-192.

Munimbazi,C.and Bullerman,L.B.(1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus. J.Appl Microbiol*.84: 959-968.

Niku-Paavola,M.L;Laitila,A.;Mattila-Sandholm,T.and Haikara,A. (1999). New types of antimicrobail compounds produced by *Lactobacillus plantarum. J.Appl. Microbiol*.86:29-35.

Norris,J.R.R.;Berkeleg,C.W.;Logan,N.A.and Donnel,A.G.(1981).The general *Bacillus* and *Lactobacillus* in the prokaryotes starr M.P, stop J. Tuber HG Balows A. And schelgel, HG eds springer verlag co. Berlin Heidelbrg. New York.2:1772-1774.

Nour,M.(1998).16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobadlli: nucleotide sequence,secondary structure and comparative analysis. *Res. Microbiol*.149:433-448.

Oldenburg, E.(1993). Occurrence of zearalenone in maize .*Myco.Rese*.9:72-78.

Oyetayo,V.O.;Adetuyi,F.C.and Akinyosoye,F.A.(2003). Safety and Protective effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* and used in probiotic agent *in vitro.African J.Biote*.2:448-452.

Pacin, A.M.; Broggi, L.E.; Resnik, S.L.and Gonzalez, H.H.L.(2001). Mycoflora and mycotoxins natural occurrence in corn from Enter Rios province.Argentina. *Myco .Res*.17:31-38.

Pal,K.K.and Gardener,B.M.(2006). Biological control of plant pathogens.*The plant health Instructor*.10(2):1094-1117.

Pallaroni,L.(2003). New Approaches for Zearalenone Analysis.Ph.D. Thesis. Technischen University Munchen.Germany.

Pea,J.A.;Li,S.Y.;Wilson,P.H.;Thibodeau,S.A.;Szary,A.J. and Versalovic,J. (2004). Genotypic and Phenotypic studies of mrine intestinal lactobacilli: Species differences in Mice with and without colitis, *Appl.Env.Micro.*70(1):558-563.

Peraica,M.;Radic,B.;Lucic,A.and Pavlovic,M.(1999). Toxic effects of mycotoxins in humans.*Bulletin of the World Health Organization*.77(9):754-766.

Pereira,P.;Nesci,A.;Castillo,C.and Etcheverry,M.(2010). Impact of bacterial biological control agents on Fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize.*Biolo. Cont.* 53(3):258-266.

Pestka,J.J.and Bondy,G.S.(1990). Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure.*Con.J. physiol. Pharma*.68-125.

Pestka,J.J.and Forsell,J.H.(1988). Inhibition of human lymphocyte transformation by the macrocyclic trichothecenes roridin A and verrucarin A.*Toxicol.Lett*.41:215-222.

Pieridis,M.;El-Nezami,H.K.;Peltonen,S.Salminen,S.and Ahokas, J.T.(2000). Ability of dairy strains lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model.*J.Food Prot.*63:645-650.

Preidis,G.A.and Versalovic,J.(2009). Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics,and prebiotics:Gastroenterology enters the metagenomics era.*Gastro*.136(6):2015-2031.

Rajasinghe,M.;Abeywickrama,K.and Jayasekera,R.(2009). Aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and Aflatoxin formation in selected spices during storage. *Trop.Agr.Res.Ext*.12(1):1-6.

Reid,G.; Zalai,C.and Gardiner,G.(2001). Urogenital Lactobacilli probiotics. reliability and regulatory issues.*J.Dairy.Sci.*84:146-154.

Rheeder,J.P.;Marasas,W.F.O.and van Wyk, P.S.(1990). Fungal association in corn kernel and effect on germination.*Phyto.* 80: 131-134.

Ricciardi,A. and Clementi F.(2000). Exopolysccharides form lactic acid bacteria:Structure, production and technological application.*Italian J. of food Sci*.12:23-45.

Richardson,K.E.;Nelson,L.A.and Hamilton,P.B.(1987). Effect of dietary fat levels on dose response relationships during aflatoxicosis in young chickens. *Poultry scie*.66(9):1470-1478.

Rinkinen, M.; Jalava, K.; Westermark, E. and Salminen, S.(2003). Interaction between probiotic Iactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal Enterococcus faecium colonization Vet. Microbiol. Mar. 92(1-2), 111-119.

Rocken,W.(1996). Applied aspects of sourdough fermentation.*Adv. Food Sci*.18:212-216.

Rumjuankiat,K.;Perez,R.H.;Pilasombut,K.;Keawsompong,S.;Zendo,T.;Sono moto,K.and Nitisinpraser,S.(2015). Purification and characterization of a novel plantaricin,KL-1Y,from *Lactobacillus plantarum* KL-1.World J.of *Microbio.and Bio*.31:983-994.

Rustum,Y.S.I.(1997). Aflatoxin in food and feed occurance,Legistatation an activation by physical methods.*Food chem*.59:57-67.

Saenz,de.;Rodringuz,C.A.;Bongiovanni A.M.;Conde,de.and Borrego, L.(1985). An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *J.Pediatrics*.107:393-396.

Sambrook,J.;Fritschi,E.F.and Maniatis,T.(1989). Molecular colning a laboratory manual 3rd(ed).Cold spring Harbor laboratory press,New York. USA. pp.261.

Sandor,G.(1984).Occurrence of mycotoxins in feed animal organs and secretion.*Act.Vet.Hung*.32:7-69.

SAS.Version, Statical Analysis system.(2001). Institute Inc.USA.Gary. Nc.27512-8000.

Schnurer,J.and Magnusson,J.(2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives.Trends in Food *Scie. and Techno*.16:70-78.

Scott,P.M.; Lau,P.Y. and Kanhere,S.R.(1981). Gas Chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of Deoxynivalenol in wheat and other grains.*J.Assoc.Off. Anal. Chem*. 64:1364-1371.

Seifert, K.(1996). Fus key (*Fusarium* interactive key) Agriculture and Agrifood Canada Cat.No.A42-66/1996E-IN, ISBN 0-662-24111-8.

Setlow,P.(2006). Spores of *Bacillus subtilis*,their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals.*J.Appl.Microbiol.*101:514-525.

Sezer,G.;Abamuslum,G.;Nebahat,B.O.and Leyla,V.(2013). Detoxification of aflatoxin B1 by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria.*Turk. J.Vet.Anim.Sci*.37: 594-601.

Sharma,R.;Bhuwan,B.;Bhagwan,S.S.;Gulab,S.T.;Pallavi,J.;Nitin,Y.;Anjana,S. and Prakash,S.B.(2014). Probiotic Efficacy and Potential of *Streptococcus thermophilus* modulating human health:Asynoptic review.*Jou.pha.and Bio.Sci*. 9(3):52-58.

Shier,W.T.;Shier, A.C.;Xie,W.and Mirocha,C.J.(2001). Structure- activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins.*Toxicon* 39(9):1435-1438.

Shinozuka,J.;Li,G.;Kiatipattanasakul,W.;Uetsuka,K.and Nakayama,H.(1997). T-2 toxin-induced apoptosis in lymphoid organs of mice.*Exp Toxicol Pathol* .49(5):387-392.

Shurtleff,M.C.(1980). Compendium of Diseases.The American Phytopathological Society.128 pp.

Stiles,J.and Bullerman,L.(2002). Inhibition of *Fusarium* species and mycotoxin production by *Bacillus pumilus* NEB1and *Lactobacills rhamnosus* VT1. Proceedings of 13th International Reinhardsbrunn Symposium.In:Modern Fungicides Antifungal Compounds IIIAgro GmbH.

Susheela,A.K.;Kumar,A.and Bhatnagar,M.(1992). Prevalence of mycotoxins with gastrointestinal manifestation in animals.*J.Med*.12(5): 26-78.

Symbert, R.M. and N.R. Krieg.(1981). General characterization in manual of methods for bacteriology.Gerhard, P murry, R.G.E., Costilow, R.N.Society of Microbiology Washignaton. 410-443.

Tamura,M.;Mochizuki,N.;Nagatoni,Y.;Harayama,K.;Toriba,A.and Hayakawa,K.(2015).A Method for Simultaneous Determination of 20 *Fusarium* Toxins in Cereals by High-Resolution Liquid Chromatography-

Orbitrap Mass Spectrometry with a Pentafluorophyenyl Column.*J.Toxins*. 7:1664-1682.

Teniola,O.D.;Addo,P.A.;Brost,I.M.;Farber,P.;Jany,K.D.;Alberts,J.F.; Vanzyl, W.H.;Steyn,P.S.and Holzapfel,W.H.(2005).Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans sp.*Nov. DSM44556T.*Int.J.Food Microbiol*.105:111-117.

Todar,K.(2009). Todar's online textbook of bacteriology:The genus *Bacillus*.University of Wisconsin-Madison.Department of Bacteriology.

Tomaszweski,J.;Miturski,R.;Semczuk, A.;Kotarski,J.and Jakowicki,J. (1998). Tissue zearalenone concentration in normal,hyperplastic and neoplastic human endometrium.*Ginekol.Pol*.69:363-366.

Truper,H.G.and De Clari,L.(1997). Taxonomic note:necessary correction of specific epithets formed as substantives(nouns) in apposition.*Int.J.System. Bacteriol*.47:908-911.

Tuzcu,M.(2010). Effect of aflatoxin on the proprtions of peripheral blood leukocytes and alpha-naphtyl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes in the mouse.Kafkas Univ.*Vet.Fak.Derg.*16(2):337-341.

Valerio,F.;Lavermicocca,p.;Pascale,M.and Visconti,A.(2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria:an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation.*FEMS Microbiology Letters*.233:289-295.

Verma,J.Swain,B.K.and Johri,T.S.(2002). Effect of various levels of Aflatoxin and Ochratoxin A and Combinations their on protein and energy utilisation in broilers.*J.Sci.of Food and Agric.*82:1412-1417.

Wannemacher,R.W.;Bunner,D.L.and Neufeld,H.A.(1991). Toxicity of trichothecenes and other related mycotoxins in laboratory animals. In: Smith,J.E. Anderson,R.A.(Eds.) Mycotoxins and Animal Foods.CRC Press.Boca Raton.FL. pp.499-552.

Watanabe, T.(2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of culture Fungi and Key to Species. Second Edition. CRC PRESS. pp. 486.

WHO.(2000). Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants,53rd Report of JECFA, www.inchem.org/documents/jecmono/v44jec14.htm.

WHO.(1998).WHO Food Additive Series 40.Safety evaluation of certain food additives and contaminants. pp.359-468.

Wintrobe,M.M.(1967). Clinical Hematology, 6th ed. Lea and Febiger, Philadelphia,USA.

Witeska,M.(2003). The effects of metals (Pb, Cu, Cd, and Zn) on hematological parameters and blood cell morphology of common carp. Rozprawa naukowa nr 72, Wydawnictwo Akademii Podlaskiej Siedlce (In Polish).

Wullt, M., Johansson Hagslatt, M-L., Odenholt, I. and Berggren, A.(2007). *Lactobacillus plantarum* 299v enhances the concentrations of fecal short-

chain fatty acids in patients with recurrent Clostridium difficile-associated diarrhoea. *Digestive Dise. and Scie.* 52: 2082-2086.

Wyllie,D.T.and Morehouse,G.L.(1977). mycotoxic fungi,mycotoxins,.an encyclopedia handbook V1. Marcel Dekker. INC. NY.USA.

Yang,G.H.;Jarvis,B.B.;Chung,Y.J. and Pestka,J.J.(2000). Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK,p38MAPK, and SAPK/JNK activation.*Toxicol. Appl. Phar.*164:149-160.

Yates,I.E;Arnold,J.W.;Hinton,D.M,;Basinger,W.and Walcott,R.R.(2003). *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control.*Can.J. Bot*.81:422-428.

Yuming,B.;Xiaomin,Z.and Donald,L.S.(2003). Enhanced soy bean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with Bradyrhizobium japonicum. *Candin Jou.of crop scie*.43:2-13.

Zhang,S.;Zhao,X.;Wang,Y.;Li,J.;Chen,X.;Wang,A. and Li,J.(2012). Molecular detection of Fusarim oxysporum in the infected cucumber plants and soil.*Pakistan Jou.of Bot*.44(4):1445-1451.

Zhao,L.;Jin,H.;Lan J.;Zhang R.;Ren,H.;Zhang,X.and Yu,G.(2015). Detoxification of zearalenone by three strains of *Lactobacillus plantarum* from fermented food *in vitro*.*Food Control* .54:158-164 .

Zimmerman,H.J.and Seeff,L.B.(1970). Enzymes in hepatic disease. In:Coodley EL (ed) Diagnostic enzymology.Lea and Febiger, Philadelphia.pp 1-38.

Zou,Z.Y.;He, Z.F.;Li,H.J.;Han,P.F.;Meng,X.and Zhang,Y.(2012). *In vitro* removal of deoxynivalenol and T-2 toxin by lactic acid bacteria. *Food Scie. and Bio.*21(6):1677-1683 .

Zwierzchowski,W.;Przybylowicz,M.and Obremski,K.(2005)."Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone micotoxicosis" Polish *J. of Vete.Sci*.8(3):209-218.

Summary

This study aimed to isolate the bacteria thats found in dairy and evaluate their activity in detoxification of zearalenone toxin(*In vitro*) and then select the the most efficenceone of bacteria in detoxification and reducing zearalenone toxicity (*In vivo*)

Isolation and diagnosiste identificalt tests showed *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. appearance were 96% and 32% respectively.

Also results of *Fusarium* spp. have ability to produce test on the production of zearalenone toxin by Thin layer chromatography(TLC) appeared at rate by 72.22%.

diagnosis of isolates produced by zearalenone was using polymerase chain reaction (PCR). The results of the nucleotide sequence analysis of the double nucleic acid package showed that the isolates produced were due to *Fusarium verticillioides*.

On the other side three bacterial types of dairy were isolated and diagnosed were *Lactobacillus plantarum*,*Lactobacillus rhamnosus* and *Streptococcus thermophilus*.

As well as study of activity of bacteria *Bacillus subtilis* in protection of yellow maize seeds from *F.verticillioides* under natural storage percentage of from 100% infecton to 48.88%for seeds treated with fungus after storage period for three months .

*L.plantarum*showed activity in reducing the toxicity of zearalenone externally(*In vitro*)when shine spotsof toxin zearalenon disappearedthats treatedpreviously with bacteriaby test of plateThin layer chromatography(TLC) and exposed to UV at a 360nm wavelength, then it was strengthned this result by in vivo bio assay of albino male Rats and the transactionof zearalenone pre-treated with bacteria*L.plantarum* and dairy.The physiological blood parameters were completely healthy but showed clear variances in the physiological blood parameters in animals treated with zearalenone only. The count of red blood cell in the treatment bacteria and toxin,dairy and toxin $6.66x10^6$ cell/$mm^3$and $6.83x10^6$ cell/mm^3 respectively. While its numbers decreased in the treatment of toxin only,reached $4.81x10^6$ cell/mm^3The number of lymphocytes in the treatment of bacteria and toxin, dairy and toxin $10.13x10^3$ cell/mm^3 and $10.17x10^3$ cell/mm^3 respectively and their numbers in the toxin treatment decreased to $7.74x10^3$ cell/$mm^3$the most recent zearalenone toxin reduced the amount of hemoglobin(Hb) in the blood of animals treated with the toxin zearalenone only at 8.5 g/100ml. There were important role of*L.plantarum* and dairy in maintaining normal hemoglobin levels in

animals,which treated individual then followed by the toxin zearalenone ,amount at 14.06 g/100ml and 13.47 g/100ml respectively.

The results explained the ability of *L. plantarum* bacteria to protect the tissues of treated animals, which were Oraldosage with the toxin zearalenone after that results of the histological examination of tissue sections for the organs hncludedheart, intestines, liver, kidney and spleen safety of any disease, while showed clear changes in all of these tissues Members of animals treated with the toxin zearalenone only.

Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and

Scientific Research

Kerbala University-Agriculture College

Department of Plant Protection

Bioremidation of Zearalenone toxin that produce by Fusarim verticilloides contamination of seeds corn by using Bacillus subtilis and Lactobacillus plantarum

Thesis Submitted to

The Council of the College of Agriculture

University of Kerbala as Partial Fulfillment of the

Requirements for the Degree of Master of

Sciences in Agriculture - Plant Protection

By

Noor Al-huda Abdul munem Al-aboudy

Supervisrd By

Prof.Dr.Sami Abdul Redha Al-Jumaili

2018 A.D **1349 A.H**