وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء – كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1 ومبيد bifenthrin باستخدام بعض انواع البكتريا

اطروحة مقدمة
الى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
جزء من متطلبات نيل درجة دكتوراه فلسفة علوم الحياة / علم الحيوان – سموم بيئية
من قبل

هدى عبد الرضا عبد الله الهاشمي
(ماجستير علوم حياة / علم الحيوان)

بإشراف

أ . د. سامي عبد الرضا علي الجميلي أ. م. د. جاسم محمد سلمان

1435 هـ 2014 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

الَّذِيْنَ يَسْتَمِعُوْنَ الْقَوْلَ فَيَتَّبِعُوْنَ أَحْسَنَهُ أُوْلَئِكَ الَّذِيْنَ هَدَاهُمُ اللهُ وَأُولَئِكَ هُمْ أُوْلُوا الأَلْبَابِ.

صدق الله العلي العظيم

سورة الزمر ﴿١٨﴾

إقرار المشرف

نشهد أن هذه الاطروحة الموســـــــومة بـــ

"المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1 ومبيد bifenthrin باستخدام بعض انواع البكتريا " تمت بإشرافنا في كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في علوم الحياة / سموم بيئية .

التوقيع

الاسم: أ. د. سامي عبد الرضا علي الجميلي

اللقب العلمي : استاذ

العنوان: كلية العلوم الطبية التطبيقية – جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2014

التوقيع

الاسم : أ. م. د. جاسم محمد سلمان

اللقب العلمي: استاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم- جامعة بابل

التاريخ: / / 2014

توصية رئيس القسم

بناءا" على التوصية المقدمة من قبل الاستاذين المشرفين , ارشح هذه الاطروحة للمناقشة .

التوقيع :-

الإسم :- د. نصير حمزة مرزه

الدرجة العلمية :- مدرس

العنوان :- كلية التربية للعلوم الصرفة –جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2014

إقرار المقوم العلمي

اشهد باني قد قومت اطروحة الدكتوراه الموسومة بـ **(المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1 ومبيد bifenthrin باستخدام بعض انواع البكتريا)** علميا" لطالبة الدراسات العليا **(هدى عبد الرضا عبدالله)** في قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء .

التوقيع:

الاسم : أ. م . د. فريال جميل عبد

العنوان : كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / / 2014

إقرار المقوم اللغوي

اشهد أني قومت اطروحة الدكتوراه الموسومة بـ **(المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1و مبيد bifenthrin باستخدام بعض انواع البكتريا)** لغويا" للطالبة الدراسات العليا **(هدى عبد الرضا عبد الله)** في قسم علوم الحياة /

كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء .

التوقيع :

الاسم : أ . م. د. محمد حسين المهداوي

العنوان : كلية التربية للعلوم الانسانية / جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2014

اقرار لجنة المناقشة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة باننا اطلعنا على هذه الاطروحة الموسومة (**المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1 ومبيد bifenthrin باستخدام بعض انواع البكتريا)** المقدمة من قبل الطالبة **هدى عبد الرضا عبد الله** , وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ 29 / 6 / 2014 ونعتقد انها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة / سموم بيئية , وبتقدير (امتياز) .

التوقيع
الاسم: أ . د. اسعد عبد الحمزة الجنابي
اللقب العلمي : استاذ
كلية الطب / جامعة الكوفة

التاريخ :   /   / 2014
رئيسا"

التوقيع :
الاسم: أ . د. عبدالله كاظم هندي
اللقب العلمي : استاذ
كلية العلوم / جامعة بابل
التاريخ :   /   / 2014
عضوا"

التوقيع :
الاسم: أ . م . د. رافد عباس علي العيسى
اللقب العلمي : استاذ مساعد
كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
التاريخ :   /   / 2014
عضوا"

التوقيع :
الاسم: أ .م . د. وفاء صادق الوزني
اللقب العلمي : استاذ مساعد
كلية العلوم / جامعة كربلاء
التاريخ :   /   / 2014
عضوا"

التوقيع :
الاسم: أ . م . د. بهيجة عبيس حمود
اللقب العلمي : استاذ مساعد
كلية التمريض / جامعة القادسية
التاريخ :   /   / 2014
عضوا"

التوقيع :
الاسم: أ . د. سامي عبد الرضا علي الجميلي
اللقب العلمي : استاذ
كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء
التاريخ :   /   / 2014
عضوا" ومشرفا"

التوقيع :
الاسم: أ .م . د. جاسم محمد سلمان
اللقب العلمي : استاذ مساعد
كلية العلوم / جامعة بابل
التاريخ :   /   / 2014
عضوا" ومشرفا"

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التوقيع :
الاسم : أ . م. د. نجم عبد الحسين نجم
عميد كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
التاريخ :   /   / 2014

الى ...
وطني العزيز الذي ذاق الويلات ....
العراق الجريح .
الى ...
التي ضمتني بقبلاتها وبسماتها ... الى التي وقف لساني عاجزا" وانحنى القلم اجلالا لها ... الى التي تم نجاحي بدعائها والتي ابقى مدينة لها بكل ما وصلت اليه ما حييت ....
امي امد الله عمرك بالصالحات .
الى...
قنديل ظلامي ونور ايامي ...ووسام فخري وشمس حياتي
والدي اطال الله بعمره
الى ...
سندي في الحياة ورفيق دربي الى من سار معي نحو الحلم خطوة بخطوة ..بذرناه معا" ..وحصدناه معا" ..وسنبقى معا" ان شاء الله
زوجي الحبيب .
الى ...
من اعانني في شدتي ...الى ينبوع الحنان
اخي يوسف

الى ...
روحي وفلذات كبدي واغلى ما وهبني الله
ولديّ نور الهدى ومحمد

الى ...
رياحين حياتي
اخواتي

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين وأفضل الصلاة وأتم التسليم على رسول الرحمة و خاتم النبيين محمد وآله الطيبين الطاهرين .

وأنا أنهي رسالتي أتوقف للحظات لأشكر كل الجهود الخيرة التي لولا رعاية الله تعالى ولولاها لما تسنى لي أن أصل إلى هذه المرحلة , ويطيب لي ان اقف بأجلال واقدم اول الشكر والاحترام الى أستاذي وأبي الأستاذ الدكتور سامي عبد الرضا علي الجميلي الذي كان من عطايا ونعم الله تعالى لنا وهو بحق المفكر الذي انار لي طريقي بدعمه علميا" ومعنويا" ولم يبخل بوقته او معرفته اذ كان بمثابة الاب الموجه للمسيرة العلمية و كانت هذه الاطروحة ثمرة توجيهاته السديدة وادعوا الله تعالى ان يمن عليه بالصحة والسلامة والعمر المديد ويجزيه عني كل الخير والتوفيق ويبارك في عمره خدمة للعلم والمعرفة .

ويدعوني الواجب ان اتقدم با صدق كلمات الشكر والامتنان الى استاذي الدكتور جاسم محمد سلمان الذي كان بمثابة الاخ الموجه للمسيرة العلمية في اكمال هذا البحث اسال الله تعالى ان يحفظه ويطيل في عمره بالخير والصحة .

وأتقدم بالشكر الجزيل الى رئاسة جامعة كربلاء وعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة وقسم علوم الحياة لإتاحتهم الفرصة لي لإكمال دراسة الدكتوراه وأخص بالشكر والثناء الدكتور قيس السماك رئيس القسم سابقا" والدكتور نصير حمزة مرزه رئيس قسم علوم الحياة حاليا" لكل المساعدة الأخوية التي قدمت لي طيلة فترة البحث متمنية لهم دوام الموفقية والتقدم العلمي.

ويدعوني واجب الاعتراف بالفضل إلى أن أقدم امتناني وشكر ي وتقديري لكل من إخوتي وأخواتي الأعزاء واخص منهم اخي الغالي ذوالفقار عباس المسعودي الذي تقف كلماتي عاجزه عن شكره واخواتي دعاء عادل ودعاء فائق وكل الزملاء في الدراسة على كل المساعدة والدعم المعنوي طيلة فترة البحث . وشكري وامتناني الى الاخت الحنون الست اميرة – مختبر الصحة العام لكل ما قدمت من مساعدة في تشخيص العزلات البكتيرية .

ويدعوني الواجب ان اشكر وبامتنان افراد عائلتي والديّ واخوتي واخواتي وزوجي الحبيب واولادي لتحملهم الكثير من العناء خلال فترة الدراسة وتوفيرهم لي كل ما يمكن ان يساعدني على اكمال دراستي والوصول الى هذه المرحلة .. واخيرا" التمس عذرا" الى كل من قدم يد العون لي لاكمال مشواري العلمي و فاتني ذكر اسمه والله ولي التوفيق .

الباحثة

هــدى عبد الرضا

الخلاصة

هدفت الدراسة الى تقييم فعالية بعض انواع البكتريا المعزولة من الالبان في معالجة سمية الافلاتوكسين B_1 وامكانية توظيف عزلة واحدة منها كعقار مضاد لسم الافلاتوكسين B_1 داخل الجسم الحي *Invivo* فضلا" عن تقييم كفاءة نوعي البكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* في تحطيم مبيد Bifenthrin وامكانية تصنيع مستحضرات حيوية من لقاح نوعي البكتريا لمعالجة تلوث التربة بهذا المبيد . استخدمت الاختبارات الكيميائية والحيوية في تحديد فعالية الانواع البكتيرية المستخدمة في معالجة سم الافلاتوكسين B_1.

اظهرت نتائج الدراسة فعالية البكتريا *Lactococcus lactis* في اختزال سمية الافلاتوكسين خارجيا" (*Invitro*) اذ اختفى تألق بقعة سم الافلاتوكسين B_1 المعالج بالبكتريا من لوحة Thin layer chromatography عند تعريضها الى الاشعة فوق البنفسجية وعززت هذه النتيجة الاختبارات الحيوية التي اجريت داخل جسم حيوانات الجرذ الابيض *Rattus rattus* والمعاملة بسم الافلاتوكسين المعالج مسبقا" بالبكتريا *Lactococcus lactis* اذ كانت جميع الاعضاء المدروسة والمتمثلة بالكبد والكلى والامعاء والطحال سليمة تماما" في حين ظهرت تغايرات نسجية مرضية واضحة في تلك الاعضاء لدى الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 الغير معالج بالبكتريا .

وقد اثبتت التحضيرة المصنعة من لقاح بكتريا *L. lactis* والمقتولة حراريا" فعالية عالية في اختزال سمية الافلاتوكسين B_1 تجلى ذلك من خلال بقاء كل من اعداد الصفيحات الدموية والنسبة المئوية للخلايا اللمفية ضمن الحدود الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة اولا" بالتحضيرة الحيوية تبعها المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 وكانت اعداد خلايا الدم الوحيدة ضمن الحدود الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة بالتحضيرة متبوعا" بالسم الافلاتوكسين B_1 , اذ بلغت 548.3×10^3 صفيحة/ مل و 59.9 % على التوالي في حين كانت اعداد الصفيحات في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 فقط 1045×10^3 صفيحة /مل والنسبة المئوية لاعداد الخلايا اللمفية 32.7 % .

من جانب اخر كان للتحضيرة الحيوية دور مهم في حماية انسجة الحيوانات المعاملة بها متبوعا" بمعاملتها بالافلاتوكسين B_1 اذ اظهرت نتائج الفحص النسيجي للمقاطع النسيجية لاعضاء الكبد والكلى

والامعاء والطحال سلامتها من اية تغيرات مرضية في الوقت الذي ظهرت تغيرات مرضية شديدة في جميع تلك الاعضاء في انسجة اعضاء الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 فقط , وبينت نتائج هذه الدراسة ايضا" ان التحضيرة الحيوية المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* مادة حيوية امينة لم يكن لها اية تاثيرات سلبية في النظم الحيوية لحيوانات الجرذ الابيض المعامل بها .

وبرهنت هذه الدراسة على فعالية بكتريا *Pseudomonas fluorescens* في اختزال سمية المبيد الحشري bifenthrin وتجلى ذلك من خلال عدم حدوث اي انخفاض في مستويات الهيموغلوبين واعداد كريات الدم الحمر في دم الحيوانات معاملة بالمبيد الكيميائي المعالج مسبقا" بالبكتريا *P. fluorescens* عن مستواهما في معاملة السيطرة (حيوانات لم تعامل بالمبيد) . اذ بلغا في المعاملة الاولى 12.23 غم /100مل و 7.1 ×10^6 كرية /ملم^3 على التوالي في حين كان مستواهما في معاملة السيطرة 11.7 غم / 100مل و 6.4 × 10^6 كرية /ملم^3 على التوالي في الوقت الذي اثر مبيد Bifenthrin سلبا" في كمية الهيموغلوبين (10.93 غم /100مل) واعداد كريات الدم الحمر (4.9 ×10^6 كرية/ملم^3) .

كما حافظت اعداد الصفيحات الدموية والنسبة المئوية للخلايا اللمفية على مستوياتها الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة بالمبيد الكيميائي المعالج احيائيا" بالبكتريا .وجاءت نتائج الدراسة النسيجية متسقة مع نتائج الدراسة الفسلجية لتؤكد على فعالية بكتريا *P. fluorescens* في معالجة المبيد الكيمياوي المدروس اذ اظهرت نتائج الفحص النسيجي عدم وجود اية تغيرات مرضية في انسجة اعضاء الكبد والكلية والامعاء والطحال للحيوانات المعاملة بالمبيد المعالج مسبقا" بالبكتريا . في الوقت الذي تاثرت سلبا" تلك الاعضاء في الحيوانات المعاملة بالمبيد bifenthrin الغير المعالج احيائيا" اذ اظهرت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسيجية وجود تغيرات مرضية في انسجة الاعضاء المذكورة . وكانت نتائج الفعالية العلاجية لبكتريا *Bacillus subtilis* اقل نسبيا" عن بكتريا *P. fluorescens*

وجاءت نتائج اختبار الفعالية التحطيمية لمبيد Bifenthrin بدلالة انبات بذور الحنطة ليعضد نتائج الاختبار الحيوي باستخدام الحيوانات المختبرية (ذكور الجرذ الابيض) اذ اظهرت البكتريا *P. fluorescens* فعالية عالية في اختزال سمية المبيد الكيميائي وتمثل ذلك بقدرة حبوب الحنطة المعاملة بالمبيد المعالج احيائيا" بهذه البكتريا على الانبات (في الاطباق) بنسبة 90 % في حين كانت النسبة 0% في معاملة المبيد الكيميائي الغير معالج بالبكتريا , اما بكتريا *Bacillus subtilis* فكانت فعاليتها اقل من البكتريا *P. fluorescens* .

واثبتت التحضيرة الحيوية المصنعة من البكتريا *P. fluorescens* فعالية عالية في معالجة المبيد الكيميائي bifenthrin في التربة اذ بلغ معدل انبات حبوب الحنطة المعاملة بالمستحضر الحيوي 79.1

% عند زراعتها في تربة ملوثة بالمبيد وبتركيز 1% بعد عشرة ايام من الزراعة في حين كانت نسبة الانبات لنفس الحبوب والمزروعة في تربة ملوثة بالمبيد وبنفس التركيز اعلاه والمعاملة بالمستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* 50.6 % كما تميز المستحضر الحيوي لنوعي البكتريا بقابليته على الخزن لمدة 6 أشهر .

قائمة المحتويات

التسلسل	الموضــوع	الصفحة
1	الفصل الاول.....المقدمةIntroduction	3-1
2	الفصل الثاني .....استعراض المراجع Litretures review	4- 34
2. 1.	علم السموم البيئية	4
2. 2.	انواع السموم	4
2. 2. 1.	السموم الطبيعية	4
2. 2. 2.	السموم المصنعة	4
2. 3.	السمية البيئية	4
2. 4.	مستويات السمية	5
1	السمية الحادة Acute toxicity	5
2	السمية المزمنة Chronic toxicicty	5
2. 5.	السموم الفطرية Mycotoxins	6 - 5
2. 5. 1.	التاثيرات السمية للسموم الفطرية	6
2. 5. 2.	المستويات الصحية للسموم الفطرية	7
2. 5. 3.	الصفات التشخيصية للفطر *Aspergillus flavus*	9- 8
2. 5. 4.	الافلاتوكسينات	12 – 10
2. 5. 5.	التاثيرات السمية للافلاتوكسينات في الانسان والحيوان	12
2. 5. 6.	التحولات الحيوية للافلاتوكسين	14
2. 5. 7.	تحطيم سموم الافلاتوكسين	22- 15
1	التحطيم الفيزيائي	15
2	التحطيم الكيميائي	16
3	التحطيم الحيوي Biodegradation لسم الافلاتوكسين	22- 16

اولا"	التحطم الحيوي باستخدام البكتريا	17
ثانيا"	التحطيم الحيوي باستخدام الفطريات	20
2. 5. 8.	الخصائص التصنيفية والفسلجية لبكتريا *Lactococcus lactis* واهميتها البيئية	22
2. 6.	السموم الكيميائية المصنعة (المبيدات)	24
2. 6. 1.	الفوائد والمضار لمبيدات الافات	24
2. 6. 2.	المبيد قيد الدراسة bifenthrin	26
2. 6. 3.	دور الاحياء المجهرية في تحطيم المبيدات	27
2. 6. 4.	الخصائص التصنيفية والفسلجية لبكتريا *Bacillus subtilis*	28
2. 6. 5.	اليات التضاد الميكروبي في بكتريا *Bacillus subtilis*	29
2. 6. 5. 1.	الانزيمات الحالة	29
2. 6. 5. 2.	المضادات الحيوية	30
2. 6. 6.	الصفات والخصائص العامة لبكتريا *Pseudomonas fluorescens*	31
2. 6. 7.	دور البكتريا *Pseudomonas fluorescens* في المكافحة الاحيائية	32
3	**الفصل الثالث .....المواد وطرائق العمل**	**34 -60**
3. 1.	الاجهزة والمواد المستعملة في تنفيذ الدراسة	34
3. 1. 1.	الاجهزة والزجاجيات المستعملة	34
3. 1. 2.	المواد الكيميائية المستعملة	35
3. 1. 3.	الاوساط الزرعية المستعملة في الدراسة	35
3. 1. 4.	الحيوانات المختبرية	36
3. 2.	طرائق العمل	36 -60
3. 2. 1.	تحضير المحاليل والصبغات	36
3. 2. 2.	تحضير الاوساط الزرعية	37
3. 2. 3.	المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B1	38
3. 2. 3. 1.	عزلة الفطر *Aspergillus flavus*	38
3. 2. 3. 2.	اختبار قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلاتوكسين باستعمال كشف الامونيا	38
3. 2. 3. 3.	اختبار قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلاتوكسين B1 باستعمال تقنية صفائح	39

	الكروموتوغرافيا الرقيقة TLC	
3. 2. 3. 4.	استخلاص وتنقية سم الافلاتوكسين B1	40
3. 2. 3. 5.	عزل وتشخيص بعض الانواع البكتيرية من الحليب واللبن	40
3. 2. 3. 5. 1.	جمع عينات الحليب واللبن	40
3. 2. 3. 5. 2.	حفظ العزلات البكتيرية	41
3. 2. 3. 5. 3.	اختبار الفعالية التضادية لعزلات البكتريا ضد الفطر *Aspergillus flavus*	41
3. 2. 3. 5. 4.	اختبار قدرة العزلة البكتيرية الاكفا في تحطيم سم الافلاتوكسين B1 خارجيا" باستعمال تقنية TLC	42
3. 2. 3. 5. 5.	دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية للعزلة البكتيرية الاكفا في تحطيم سم AFB1	42
3. 2. 3. 5. 6.	التشخيص التاكيدي لعزلة البكتريا *Lactococcus lactis*	43
3. 2. 3. 5. 7.	اختبار الفعالية السمية لسم AFB1 والمعامل مسبقا" بالبكتريا *Lactococcus spp.* الاكفا في تحطيمه في حيوانات الجرذ الابيض	43 -45
اولا"	تهيئة الحيوانات ومعاملاتها	43
ثانيا"	المعايير المدروسة	44
أ	معايير الدم الفسلجية	44
ب	الدراسة النسجية	44
3. 2. 3. 5. 8.	تاثير الملوحة ودرجة الحموضة في نمو بكتريا *L. lactis*	46
أ	الملوحة	46
ب	الدالة الحامضية pH	46
3. 2. 3. 5. 9.	اختبار قابلية بكتريا *L. lactis* في تحطيم AFB1 داخليا" وبشكل وقائي	47
اولا"	تهيئة الحيوانات	47
ثانيا"	معاملة الحيوانات	47
3. 2. 3. 5. 10.	اختبار فعالية البكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في تحطيم سم الافلاتوكسين B1 داخليا"	48
اولا"	تهيئة الحيوانات	48
ثانيا"	معاملة الحيوانات	48
3. 2. 3. 5. 11.	تصنيع تحضيرة من عزلة البكتريا *L. lactis*	49

3. 2. 3. 5. 12.	اختبار فعالية التحضيرة من بكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في حماية النظم الحيوية للجرذ الابيض من التاثيرات السمية لسم الافلاتوكسين B1	49
اولا"	تهيئة الحيوانات	49
ثانيا"	معاملة الحيوانات	50
3. 2. 4.	تقييم فعالية نوعي البكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* في معالجة مبيد bifenthrin بدلالة الاختبارات الحيوية	51
3. 2. 4. 1.	المبيد المستهدف في الدراسة bifenthrin	52
3. 2. 4. 2.	العزلات البكتيرية	
3. 2. 4. 3.	التشخيص التاكيدي لنوعي البكتريا *B .subtilis* و *P . fluorescens*	52
3. 2. 4. 4.	تاثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم ودرجة الحموضة في نمو العزلتين *B. subtilis* و *P . fluorescens*	52
3. 2. 4. 4. 1.	اختبار تاثير ملح كلوريد الصوديوم في نمو العزلتين	52
3. 2. 4. 4. 2.	تاثير درجة الحموضة PH في نمو العزلتين *B. subtilis* و *P . fluorescens*	53
3. 2. 4. 5.	تقييم كفاءة نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens* في اختزال سمية المبيد Bifenthrin	53
1	معاملة مبيد bifenthrin بلقاح نوعي البكتريا	54-53
2	تهيئة الحيوانات	53
3	معاملة الحيوانات	54
3. 2. 4. 6.	تاثير مبيد bifenthrin في نمو نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	55
3. 2. 4. 7.	المعالجة الاحيائية لمبيد bifenthrin بدليل نسبة الانبات لحبوب بعض المحاصيل	57-55
أ	تهيئة الحبوب	55
ب	تحضير تراكيز من مبيد bifenthrin المعامل بعزلتي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	56
ج	معاملة الحبوب	57
د	حساب نسبة الانبات	57
3. 2. 4. 8.	تصنيع مستحضرات حيوية من لقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	60- 57
3. 2. 4. 8. 1.	تحديد الوسط التخمري المناسب لتنمية لقاح نوعي البكتريا	57
3. 2. 4. 8. 2.	تحديد مادة التحميل المناسبة لانتاج المستحضر الحيوي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و	58

	P . fluorescens	
3. 2. 4. 8. 3.	تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة	58
3. 2. 4. 8. 4.	انتاج المستحضر الحيوي النهائي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	59
3. 2. 4. 8. 5.	اختبار فعالية المستحضر الحيوي في تحطيم مبيد Bifenthrin الملوث للتربة	59
3. 2. 4. 8. 6.	قابلية المستحضر الحيوي للخزن	60
3. 3.	التحليل الاحصائي	60
4	**الفصل الرابع .....لنتائج والمناقشة Results & Discussion**	**142 -61**
4. 1.	المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B1	109 -61
4. 1. 1.	اختبار قابلية عزلة الفطر *A. flavus* على انتاج AFB1	61
أ	طريقة الامونيا	61
ب	طريقة TLC	62
4. 1. 2.	التشخيص الاولي لعزلات البكتريا المعزولة من الحليب واللبن	63
4. 1. 2. 1.	الصفات المظهرية والمجهرية للعزلات البكتيرية على الاوساط الزرعية	63
4. 1. 2. 2.	اختبار الفعالية التضادية للعزلات البكتيريا المعزولة ضد فطر *A. flavus*	64
4. 1. 2. 3.	اختبار قدرة العزلة الاكفا في تحطيم سم AFB1 (خارجيا") باستعمال تقنية TLC	66 -65
4. 1. 2. 4.	الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا الاكفا في تحطيم سم AFB1	66
4. 1. 2. 5.	التشخيص التاكيدي لعزلة البكتريا *L. lactis*	66
4. 1. 2. 6.	اختبار الفعالية السمية لسم AFB1 والمعاملى مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* الاكفا في تحطيمه في حيوانات الجرذ الابيض	67
4. 1. 2. 6. 1.	فحوصات الدم الفسلجية	67
4. 1. 2. 6. 2.	الفحوصات النسجية	78 -71
4. 1. 2. 7.	تاثير الملوحة و درجة الحامضية PH في نموبكتريا *L. lactis*	79
4. 1. 2. 8.	تقييم فعالية بكتريا *L. lactis* في تحطيم سم AFB1 (داخل الجسم الحي) وبشكل وقائي	84 -80
4. 1. 2. 8. 1.	فحوصات الدم الفسلجية	80
4. 1. 2. 8. 2.	الفحوصات النسجية	84 -83
4. 1. 2. 9.	تقييم فعالية بكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في تحطيم سم AFB1 (جسم داخل الحي)	94 -89

4. 1. 2. 9. 1.	الفحوصات الفسلجية	89
4. 1. 2. 9. 2.	الفحوصات النسجية	98-94
4. 1. 2. 10.	اختبار فعالية التحضيرة من البكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في حماية النظم الحيوية للجرذ الابيض من التاثيرات السمية لسم AFB1	99
4. 1. 2. 10. 1.	فحوصات الدم الفسلجية	99
4. 1. 2. 10. 2.	الفحوصات النسجية	109 -104
4. 2.	تقييم فعالية نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens* في معالجة مبيد Bifenthrin بدلالة الاختبارات الحيوية	142 -110
4. 2. 1.	التشخيص التاكيدي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	110
4. 2. 2.	تاثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم ودرجة الحامضية في نمو عزلتي *B. subtilis* و *P . fluorescens*	110
4. 2. 2. 1.	اختبار تاثير ملح Nacl في نمو البكتريا*B. subtilis* و *P . fluorescens*	111 -110
4. 2. 2. 2.	اختبار تاثير PH في نمو العزلتين *B. subtilis* و *P . fluorescens*	112
4. 2. 3.	تقييم فعالية نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens* في اختزال سمية المبيد Bifenthrin	113
4. 2. 3. 1.	فحوصات الدم الفسلجية	113
4. 2. 3. 2.	الفحوصات النسجية	128 -118
4. 2. 4.	تاثير مبيد Bifenthrin في نمو العزلتين *B. subtilis* و *P . fluorescens*	129
4. 2. 5.	المعالجة الاحيائية لمبيد Bifenthrin بدليل نسبة الانبات لحبوب بعض المحاصيل	130
4. 2. 5. 1.	حساب نسبة الانبات لبعض انواع الحبوب المعاملة بالمبيد في الاطباق	133 -130
4. 2. 6.	تصنيع مستحضرات حيوية من لقاح نوعي الكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	134-133
4. 2. 6. 1.	تحديد الوسط التخمري المناسب لتنمية لقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P . fluorescens*	133
4. 2. 6. 2.	تحديد مادة التحميل المناسبة لانتاج المستحضر الحيوي لنوعي البكتريا	135
4. 2. 6. 3.	تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة	136
4. 2. 6. 4.	تصنيع المستحضر النهائي	137
4. 2. 6. 5.	اختبار فعالية المستحضرين الحيويين في تحطيم مبيد Bifenthrin الملوث للتربة	141-139

4. 2. 6. 6.	قابلية المستحضر الحيوي على الخزن	142-141
	الاستنتاجات والتوصيات	144-143
	الاستنتاجات Conclusion	143
	التوصيات Recommendation	144
	المصادر	169-145
	المصادر العربية Arabic References	148-145
	المصادر الاجنبية English References	169 -149

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	متوسطات ومديات الحدود القصوى لمستوى سموم الأفلاتوكسينات في الاغذية والاعلاف وعدد الدول المطبقة لقوانين التحديد .	8
2	الخواص الفيز وكيميائية للافلاتوكسينات	12
3	تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة (NaCl) في معدل نمو نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده المنماة على وسط N. agar والمحضنة بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة	111
4	تأثير مستويات (PH) في معدل نمو نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده المنماة على وسط N. agar والمحضنة بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة	112
5	تأثير تراكيز مختلفة من مبيد bifenthrin في معدل اعداد الخلايا لنوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis*	130
6	اختبار فعالية بكتريا *B. subtilis* في اختزال سمية المبيد الكيمياوي Bifenthrin بدلالة معدلات	132

	نسب انبات (%) حبوب بعض انواع المحاصيل (في الاطباق) .	
7	اختبار فعالية بكتريا *P. fluorescens* في اختزال سمية المبيد الكيمياوي Bifenthrin بدلالة معدلات نسب انبات (%) حبوب بعض انواع المحاصيل في الاطباق .	133
8	تأثير نوع الوسط التخمري في نمو نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B.subtilis*	134
9	تاثير نوع المادة الحاملة في معدل اعداد الخلايا البكتيرية لكل من نوعي*P. fluorescens* و *B. subtilis* في الغرام الواحد من المادة الحاملة.	135
10	تأثير نسبة الوسط التخمري الى المادة الحاملة على معدل اعداد خلايا نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* في الغرام الواحد من المادة الحاملة	137
11	تأثير المستحضرات الحيوية المصنعة من لقاح نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدلات نسب الانبات لحبوب الحنطة في التربة .	141
12	تأثير المدة الخزنية على معدل لوغارتم اعداد خلايا نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* في المستحضر الحيوي .	142

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
	الفصل الثاني	
1	التركيب الكيميائي لسم الافلاتوكسين B1	10
2	التركيب الكيميائي لسم الافلاتوكسين B2	11

3	التحطيم الحيوي للافلاتوكسين B1 بواسطة *Terhymena pyrformis*	21
4	التحطيم الحيوي للافلاتوكسين B1 بواسطة *Armillariella tabescens*	22
	الفصل الرابع	
1	الفعالية التضادية لبعض العزلات البكتيرية المعزولة من الحليب واللبن ضد الفطر *A. flavus*	65
2	تاثير سم الافلاتوكسين B1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل كمية الهيموغلوبين لذكور الجرذ الابيض .	68
3	تأثير سم الأفلاتوكسين B1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الابيض .	69
4	تأثير سم الأفلاتوكسين B1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الابيض .	70
5	تأثير سم الأفلاتوكسين B1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الابيض .	71
6	تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة (NaCl) في معدل نمو بكتريا *L. lactis* المنماة على وسط MRS الصلب , والمحضنة بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة	79
7	تأثير مستويات الحموضة (PH) في معدل نمو بكتريا *L. lactis* المنماة على وسط MRS السائل , والمحضنة بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة	80
8	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض	81
9	تأثير المعاملة الداخلية *invivo* لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض	82
10	تأثير المعاملة الداخلية *invivo* لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض	83

11	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض	90
12	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد كريات الدم الحمراء لدى ذكور الجرذ الابيض	90
13	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض	91
14	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض	93
15	تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد خلايا الدم الوحيدة لدى ذكور الجرذ الابيض	93
16	تاثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB1 (داخليا") , بدلالة معدل كمية الهيموغلوبين لذكور الجرذ الابيض	99
17	تأثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB1 (داخليا") , بدلالة معدل اعداد كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الابيض	101
18	تأثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB1 (داخليا") , بدلالة معدل اعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الابيض	102

19	تأثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB1 (داخليا") , بدلالة معدل النسبة المئوية لاعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الابيض	103
20	تاثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB1 (داخليا") , بدلالة معدل اعداد خلايا الدم الوحيدة لذكور الجرذ الابيض	104
21	تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض	114
22	تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل اعداد خلايا الدم الحمراء لدى ذكور الجرذ الابيض	116
23	تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض	117
24	تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض	118

قائمة الصور

رقم الصورة	العنوان	رقم الصفحة
1	عزلة الفطر *A. flavus* النامية على وسط PDF والمعاملة بالامونيا	62
2	استخدام تقنية TLC في الكشف عن قدرة الفطر *A. flavus* على انتاج سم AFB1 a - السم القياسي الافلاتوكسين b –مستخلص الفطر *A.flavus*	63
3	نتيجة اختبار Epi20 لبكتريا *Lactococcus lactis*	67
4	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين B1فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 10 و X 40) a - احتقان وعائي , b – ضمور الكبيبة وتضخم جدار الكبيبة , c – تنخر , e – نزف دموي	75
5	مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 40 X) a – تجمع الخلايا الالتهابية , b – احتقان وعائي , c – تنخر , d – نزف دموي , e – توسع الوعاء الدموي	76
6	مقطع نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 10 و 40 X) .	77

	a – تنخر , b – تحلل الزغابات .	
7	مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* (D) AFB1 + *L. lactis* معاملة البكتريا *L. lactis* فقط .(قوة تكبير 40 X) a – تنخر الخلايا اللمفية في الفص الاحمر والابيض , b – احتقان وعائي	78
8	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط (قوة تكبير 40 X) a – تنخر , b – ضمور الكبيبة , c - تضخم جدار الكبيبة .	85

9	مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 40 X) a – ارتشاح الخلايا الالتهابية , b – احتقان وعائي	86
10	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 40 X) a- تحلل الزغابات , b – تنخر	87
11	مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط . (قوة تكبير 40 X) a – تنخر	88

12	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* فقط (قوة التكبير 40 X) . a – تنخر وموت خلايا النبيبات الكلوية , b- توسع واحتقان وعائي .	95
13	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* فقط (قوة تكبير 40 X) . a – ارتشاح خلايا التهابية , b– توسع الوعاء الدموي , c– تنخر , d- جسور التهابية , e- احتقان وعائي	96
14	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة *in vivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* فقط (قوة تكبير 40 X) . a – التحلل التام للزغابات مع التنخر الخلوي .	97
15	مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* فقط (قوة التكبير 40 X) . a – احتقان وعائي , b- تنخر خلوي .	98
16	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة الفورملة (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة الفورملة المعاملة حراريا + AFB1 (D) معاملة الفورملة المعاملة حراريا فقط (E) معاملة الحليب + AFB1 (F) معاملة الحليب فقط (قوة التكبير 40 X) . a- تنخر خلوي , b– احتقان وتوسع وعائي , c– ضمور الكبيبة وتضخم الجدار	106
17	مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة الفورملة (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة الفورملة المعاملة حراريا + AFB1 (D) معاملة الفورملة المعاملة حراريا فقط (E) معاملة الحليب + AFB1 (F) معاملة الحليب فقط (قوة التكبير X40) .	107

	a- ارتشاح الخلايا الالتهابية , b – احتقان وعائي .	
18	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة الفورملة (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة الفورملة المعاملة حراريا + AFB1 (D) معاملة الفورملة المعاملة حراريا فقط (E) معاملة الحليب + AFB1 (F) معاملة الحليب فقط (قوة التكبير X40) . a– تحلل الزغابات , b - تنخر	108
19	صورة (19) مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة الفورملة (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة الفورملة المعاملة حراريا + AFB1 (D) معاملة الفورملة المعاملة حراريا فقط (E) معاملة الحليب + AFB1 (F) معاملة الحليب فقط (قوة التكبير X40) . a- تنخر خلوي , b- احتقان وعائي .	109
20	التشخيص التأكيدي لعزلة البكتريا *P. fluorescens* باستعمال اختبار Epi20	110
21	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Pseudo.*+ المبيد(D) معاملة بكتريا *Pseudo.* فقط (قوة تكبير 40 X) . a- اختفاء الكبيبة , b– احتقان دموي c- ضمور الكبيبة , d – تنخر كبيبي	121
22	مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Pseudo.*+ المبيد(D) معاملة بكتريا *Pseudo.* فقط (قوة تكبير 40 X) . a – موت وتحلل الخلايا , b – تنخر خلوي , c - نزف الدموي	122
23	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Pseudo.*+ المبيد(D) معاملة بكتريا *Pseudo.* فقط (قوة تكبير 40 X) . a- تقرح بؤري , b – تحلل الزغابات , c – تنخر خلوي	123
24	مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Pseudo.*+ المبيد(D) معاملة بكتريا *Pseudo.* فقط (قوة تكبير 40 X) . a- نزف دموي , b- احتقان وتوسع وعائي , c- موت الخلايا , d – تنخر الفص الابيض	124
25	مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير 40	125

	(X a -ضمور الكبيبة , b- نزف دموي , c– تنخر خلوي , d – تحلل الكبيبة .	
26	مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير 40 X) a- احتقان مع توسع وعائي , b– تحلل الخلايا , c – تنخر خلوي	126
27	مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير 40 X) a- تنخر خلوي , b- تحلل الزغابات	127
28	مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة المبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير 40 X) a – تحلل الخلايا , b– احتقان وعائي , c – تنخر خلوي .	128
29	تحضيرة من المستحضر الحيوي على شكل مسحوق قابل للبلل A- مستحضر حيوي لبكتريا *B. subtilis* , B – مستحضر حيوي لبكتريا *P. fluorescens*	138
30	تراكيز متدرجة من المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* مكبسلات مبلمرة A- مستحضر بكتريا *B. subtilis* تركيز 500ملغم , B- مستحضر بكتريا *B. subtilis* تركيز 250ملغم C - مستحضر بكتريا *P. fluorescens* تركيز 500ملغم , D - مستحضر بكتريا *P. fluorescens* تركيز 250ملغم .	138

قائمة المختصرات

ت	المختصر	المصطلح بشكل كامل
1	DMSO	Dimethyl sulfoxid
2	AFB1	Aflatoxin B1
3	TLC	Thin layer Chromatography
4	HPLC	High perfomancce liquid chromatography

المقدمة Introduction

تشكل السموم بانواعها المختلفة سواء الطبيعية منها او المصنعة خطرا" على صحة الانسان كونها تؤثر في النظم الحيوية بتراكيز منخفضة , ومن هذه السموم ما هو ملوث للاغذية اذ تعد السموم الفطرية احدى اهم مجاميع السموم الطبيعية والتي تنتج بواسطة كائنات حية دقيقة متباينة التغذية Heterophlic microorganism تتواجد في الطبيعة وتحتاج في نموها وتكاثرها لعوامل عدة منها درجة الحرارة والرطوبة ومواد غذائية كمصدر للطاقة كالمواد العضوية , وخلال دورة حياتها تنتج مركبات ايضية ثانوية مختلفة ذات اوزان جزيئية واطئة تعرف بالسموم الفطرية Mycotoxins تنتج خلال طور النمو الثابت Stationary phase وممكن ان تتواجد في ابواغ الفطر ايضا" (Hussein and Brasel , 2001) .

تكمن مشكلة السموم الفطرية في كونها ذات اوزان جزيئية واطئة لا تستحث الجهاز المناعي لمعادلة سميتها وفضلا" عن مقاومتها لدرجات الحرارة العالية Heat stable وبالتالي لا تتحطم بدرجة حرارة المستخدمة في طهي الطعام , ويتسبب التسمم الفطري Mycotoxicosis في احداث العديد من الامراض كالسرطانات والفشل الكلوي واحداث الطفرات الوراثية مع اضعاف فعالية الجهاز المناعي والجهاز التناسلي وغيرها من الفعاليات الحيوية الاخرى (Verma , 2004) .

تستخدم المبيدات الكيميائية المصنعة Pesticides في مكافحة الافات الزراعية المختلفة , ولا يقتصر تأثيراتها على الافة انما تعد من الملوثات البيئة الخطرة على صحة الانسان من خلال متبقياتها في الاغذية المختلفة كالحبوب والفواكه والخضار والحليب او نتيجة تلوث مياه الشرب وبالتالي يكون تاثيرها مزمن Chronic effects , او التعرض لجرع حادة Acute doses وهذا ما يحدث للعاملين في مجال مكافحة الافات ومعامل تصنيع المبيدات مما يؤدي الى احداث تاثيرات سمية شديدة Acute effects , تتمثل باحداث السرطان اذ ان اكثر من 25% من مبيدات الافات تصنف كمسرطنات للمثانة والدم والغدد اللمفاوية والبنكرياس (Ji *et al.*, 2001)

ينتمي مبيد bifenthrin المستهدف في هذه الدراسة الى مجموعة المبيدات الحشرية Pyrethroid ويتميز هذا المبيد بمدة بقاءه في البيئة لفترة طويلة مقارنة بالمبيدات الاخرى المنتمية لنفس هذه المجموعة وتتمثل المادة الفعالة فيه بمركب bifenthrin وبتركيز 10% ويستخدم في مكافحة الافات الزراعية كالحلم على الخضروات والسونة والارضة على الحنطة والشعير (العادل , 2006) .

استخدمت وسائل متعددة في تحطيم السموم البيئية كالوسائل الكيميائية والفيزيائية ولكنها لم تكن فعالة بالقدر المطلوب فضلا" عن كلفتها العالية , مما حدا بكثير من الباحثين في مختلف انحاء العالم للاتجاه نحو دراسة امكانية توظيف بعض الاحياء الدقيقة وانزيماتها في تحطيم السموم الفطرية كاستراتيجية لعلاج او اختزال السموم الفطرية وبخاصة الافلاتوكسينات كون ان هذه الاحياء الدقيقة كفوءة وغير مؤثرة على البيئة والانسان وبنفس الوقت قادرة على اختزال وازالة الملوثات المختلفة ومنها سموم الافلاتوكسينات في الاغذية (Qinghua *et al*., 2009) .

تتضمن المعالجة الاحيائية استخدام احياء دقيقة كالبكتريا والفطريات والخمائر لمنع حدوث الاصابات الفطرية قبل وبعد الحصاد وهذا يمثل معالجات احيائية وقائية (اي قبل حدوث التلوث) فضلا" عن امكانية استخدام المعالجة الاحيائية بعد حدوث التلوث للأغذية وبخاصة الحبوب الاستراتيجية كالحنطة والشعير والذره الصفراء وامكانية استخدامها كاعلاف للحيوانات ومن ثمّ تقليل الاضرار الاقتصادية الناجمة عن التلوث بالسموم الفطرية (Dorner,2005; Alberts *et al*., 2006). وهناك ا لعديد من الاحياء الدقيقة القادرة على تحطيم السموم الفطرية كبكتريا *Lactobacillus plantarum* و *Leuconostoc mesentroides* و *Bacillus subtilis* (Jong, 2007) .

و توجد بعض انواع الفطريات غير المنتجة للسموم الفطرية ذات فعالية في تحطيم الافلاتوكسينات فمثلا" سلالات الفطر *Aspergillus niger* غير المنتجة للافلاتوكسينات قادرة على تحطيم تلك السموم المنتجة من عزلات نفس الفطر فضلا" عن قدرة بعض انواع الفطريات مثل *Rhizopus sp*. و *Eurotium herbariorum* الغير منتجة للسموم الفطرية على تحويل سم AFB_1 الى Aflatoxicol A من خلال اختزال Cyclopentenone carbonylal للافلاتوكسين B_1 ومركب Aflatoxicol A بدوره يتحول الى Aflatoxicol B بفعل بعض المركبات الوسطية والحوامض العضوية المنتجة من الفطريات المشار اليها سابقا" (Nakazato *et al*., 1990) .

من جانب اخر استخدمت الاحياء الدقيقة في معالجة الملوثات ومنها المبيدات الكيميائية فقد اشارت العديد من الدراسات الى فعالية الاحياء الدقيقة في التحطيم الحيوي (Biodegradation) للمبيدات من خلال تكسير المادة الكيمياوية بفعل الانزيمات المنتجة من قبل الكائنات الدقيقة مؤديا" الى فقدان المركب الكيمائي لتخصصه الوظيفي مع امكانية حدوث تغير في فعاليته السمية وعملية التكسير هذه تحدث بالاكسدة او الاختزال , ويمكن استخدام هذه الطريقة في معالجة البيئات المائية والتربة وتنظيفها من الملوثات البيئية بما فيها المبيدات الكيميائية (Strong & Burgess , 2008 ; Furukawa , 2003) . فعلى سبيل المثال استخدمت عزلات من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus*

megaterium و *Bacillus licheniformis* في اختزال كمية مبيد Carbendazin وبنسبة تراوحت بين 44% - 53% (Kalwasinska *et al* ., 2008) .

وكما هو واضح من الدراسات السابقة انها لم تتطرق الى ماتؤول اليه منتجات التحلل لذلك يجب فهم ان عملية التحلل تتطلب الكثير من التحريات لان الكثير من الدراسات توضح فقط تجزئة المبيدات ولكن لا تتحرى عن المنتج الجديد من التحلل واثاره السمية على النظم الحيوية للانسان والحيوان . وعلى ضوء ما تقدم تم اجراء هذه الدراسة وفقا" لبعض الموجبات منها انفتاح السوق العراقية على الاسواق العالمية الذي ادى الى دخول كمية كبيرة من السلع الغذائية , وهناك دراسات محلية اكدت على ان الكثير من هذه السلع ملوثة بالسموم الفطرية وخاصة الافلاتوكسينات فضلا" عن عدم وجود عقار لمعالجة حالات التسمم بهذه السموم . بالاضافة الى ان استخدام مبيد bifenthrin في مكافحة الافات الزراعية في العراق ومدة بقاءه في البيئة تكون طويلة نسبيا" ولا توجد طريقة معروفة لمعالجة هذا المبيد الملوث للبيئة . كما ان جميع الدراسات المتوفرة تناولت تحطيم السموم البيئية خارجيا" (*invitro*) فقط ولم تتطرق الى سمية نواتج التحطيم والتي قد تكون اكثر سمية من المركب السام الاصل . لذلك استهدفت الدراسة الحالية الى :

1- تقييم الفعالية التحطيمية لعدد من عزلات بكتيرية معزولة من الحليب واللبن خارج الجسم الحي *invitro* وداخل الجسم الحي *invivo* وامكانية تصنيع تحضيرة Formula حيوية فعالة في اختزال سمية الافلاتوكسين B_1 يمكن استعمالها مستقبلا" (بعد اجراء دراسات تكميلية) كعقار لمعالجة التسمم بالافلاتوكسين B_1 .

2- تقييم فعالية نوعي البكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* في تحطيم مبيد Bifenthrin ودراسة امكانية تصنيع مستحضرات منها يمكنها معالجة التربة الملوثة بهذا المبيد .

2. استعراض المراجع

2. 1. علم السموم البيئية Toxicology

علم السموم البيئية هو العلم الذي يهتم بدراسة الملوثات السامة والتي تؤثر في تركيب ووظيفة النظم البيئية فضلا" عن دراسة طبيعة وخواص ومعالجة المادة السامة Toxicant والتي تعرف على انها مركبات كيميائية طبيعية او مصنعة تؤثر سلبا" في النظم الحيوية للكائنات الحية عند التعرض لها (Curtis&John, 2003) .

2. 2. انواع السموم Types of toxins

هناك انواع عديدة من السموم ويمكن تلخيصها بالاتي

2. 2. 1. السموم الطبيعية Natural toxins

وتشمل السموم المنتجة من قبل الكائنات الحية كالسموم البكتيرية والفطرية والفايروسية وغيرها , او تلك السموم المرتبطة ببيئة الكائنات الحية كالنباتات والحيوانات والطحالب السامة . (Curtis & John, 2003)

2. 2. 2. السموم المصنعة Artificial toxins

وتشمل المواد الكيمائية والمصنعة من قبل الانسان كالمبيدات الزراعية والمواد الحافظة والمركبات الهايدروكاربونية المختلفة فضلا" عن مخلفات المصانع والمعامل وغيرها من المواد الكيماوية الملوثة للبيئة (Curtis & John, 2003) .

2. 3. السمية البيئية Environmental toxicity

يمكن فهم السمية البيئية في ثلاث فعاليات اساسية هي :

أ – تداخل المادة الكيمائية او المادة الغريبة Xenobiotic مع البيئة فضلا" عن كمية تلك المادة (الجرعة) والتي يمكن ان يتعرض لها الكائن الحي .

ب – تداخل المادة الغريبة مع موقع التأثير Site of action على المستوى الجزيئي والذي يكون غالبا" بروتين خاص او اي جزئ حيوي يتداخل مع المادة السامة .

ج- تفاعل المادة السامة مع موقع التأثير منتجا" تـأثيرات سمية فـي الـنظم الحيويـة تظهـر علـى مسـتوى المجتمع بحيث يصبح بالإمكان التنبؤ الـدقيق بالتـأثيرات التـي تحـدثها الملوثـات البيئيـة . (عبـد الحميـد , 2000) .

2. 4. مستويات السمية Levels of toxicity

يقصد بالسمية مقدار الضرر والتلف الذي تسببه مادة كيميائية لكائن حي معين , ويمكن تقسيمها الى

1- **السمية الحادة Acute toxicity** : ويقصد بها مقدار تاثر الكائن الحي عند تعرضه الـى جرعـة كبيرة واحدة من المادة السامة عن طريق الفم او الجلد او عن طريق الجهاز التنفسي والتي تؤدي الى المرض الشديد او الموت .
2- **السمية المزمنة Chronic toxicity** : يقصد بها مقدار تاثر الكائن الحي بـالمواد السـامة نتيجـة لتعرضه الى كميات ضئيلة منها ولفترة طويلة (Curtis&John, 2003) .

2 . 5. السموم الفطرية (Mycotoxins)

لم تكن السموم الفطرية والحالات الناتجة عنها مشخصة ومعروفـة بالمسـتوى العلمـي الـدقيق قبـل سنة (1960) ، على الرغم من حصول عدد من الحالات المرضية المجهولة السبب لسنوات طويلة والتي ادت الى وفيات كثيرة في انحاء عديـدة مـن العـالم (Mislivec ,1981) وذلـك لان هـذه الحـالات كانـت تحصل في فصول معينة من السنة وفي مناطق جغرافية متباعـدة ومعزولـة ولـذلك لـم تجلـب الانتبـاه لهـا كثيرا, وفي سنة (1960) حدثت حالة تسمم وموت لاكثر من (100.000) من طيور الـديك الرومـي فـي انكلترا، وسمي هـذا المـرض فـي البدايـة (Turkey x disease) بسـبب عـدم معرفـة مسـببه، وادى هـذا المرض الى ولادة علم السموم الفطرية واعتبر هذا العام نقطة البداية الحقيقية للاهتمـام بالسـموم الفطريـة اذ بدأت الدراسات في هذا الموضـوع ووجـد بـان سـببه يعـود الـى تنـاول هـذه الطيـور لمسـحوق الفسـتق

البرازيلي. (FAO, 2003) . وقد تم الحصول على مستخلص كحولي من هذا الفستق ادى الى حصول حالة تسمم لطيور البط عند معاملتها به ووجد بان لهذا المستخلص فعالية تالق ويؤدي الى تسرطن كبد الحيوانات، بعدها تم عزل الفطر *Aspergillus flavus* من عينات الفستق والذي ثبت بانه المسبب لمرض (Turkey x - disease) واعطي تسمية Aflatoxins لهذه المواد المتألقة. (Ciegler *et. al.*, 1983; Mislivec, 1981) .

اوضح (1971)Detroy *et. al* ان الصفات التي تتميز بها حالات التسمم الفطري بصورة عامة تشمل:

1- المرض الناتج عن التسمم بالسموم الفطرية يكون غير معدي.

2- لا تؤثر العقاقير والمضادات الحياتية في معالجة الامراض والعلل الناتجة عن السموم الفطرية .

3- التسمم غالبا ما تكون له علاقة بتناول مادة غذائية معينة.

4- يرافق المادة الغذائية الملوثة بالسموم الفطرية نوع او انواع فطرية ذات نمو كثيف.

تعرف السموم الفطرية (Mycotoxins) بأنها مركبات إيضية ثانوية سامة ذات اوزان جزيئية واطئة نسبيا تنتجها مجموعة الفطريات الخيطية التي يمكن ان تلوث الغذاء البشري او الاعلاف الحيوانية ابتداء" بالحقل وانتهاء بالمستهلك وقد تم الى يومنا هذا اكتشاف عدة مئات من انواع السموم الفطرية لعل اهمها الافلاتوكسينات (Aflatoxins) , الزيرالينون (Zearalenone), الترايكوثسين (Trichothecen), الاوكراتوكسين (Ochratoxins), والاركوت (Ergot), وجميعها سامة تؤثر في الفعاليات الحيوية لجسم الكائن الحي بشتى الصور وربما تؤدي في نهاية المطاف الى هلاكه اذا ما تناولها بمستويات تفوق الحدود التي اتفق دوليا على السماح بوجودها في المواد الاولية سواء تلك المستخدمة في غذاء الانسان او التي تدخل في صناعة الاعلاف الخاصة بالحيونات الزراعية . ;2002, Creppy) .Magan & Olsen, 2002)

اختلفت الاحصائيات في تسجيل عدد المركبات الايضية الثانوية المكتشفة لحد الان , فقد ذكر Turner (1978) ان هنالك 1200 مركب ايضي ثانوي ينتج من قبل 500 نوع فطري وبين الباحثان Turner and Alderidage(1983) ان هنالك 2000 مركب ايضي ثانوي منتج من قبل 1000 نوع فطري أي لكل فطر القابلية على انتاج مركبين ايضيين على الاقل . واشار Hawkworth(1991) ان هنالك 1.5 مليون نوع فطري له القابلية على انتاج مركبات ايضية ثانوية وبواقع مركبين لكل فطر أي وجود ثلاث

ملايين مركب . Esser and Lemke(1996) فقد ذكر ان هناك 100 الف نوع فطري لـه القابليـة علـى انتاج المركبات الايضية وبمعدل مركبيين لكل فطر وبهذا يبلغ عدد المركبات الايضية 200 الف مركب . وذكر Cast (2003) ان عدد المركبات الايضية المدروسة هي 6000 مركب وهذا العدد يمثل (0.2%) من اصل 3 مليون مركب في دراسة Hawkworth(1991) و (3%) من اصـل 200 الـف فـي دراسـة Esser and Lemke(1996) وهذا يوضح انه لا توجد احصائية دقيقة لعدد المركبات الايضـية الثانويـة المنتجة من قبل الفطريات اذ درس البعض منها والبعض الاخر من دون اهتمام ولا تعتبر كـل المركبـات الايضية الثانوي مركبات سامة ومثالها المضادات الحياتية .

2. 5. 1. التأثيرات السمية للسموم الفطرية

تؤدي السموم الفطرية دورا مهما في احـداث تـاثيرات صـحية مختلفـة فهـي امـا توجـد فـي الاغذيـة وتشكل خطرا ملحوظا على الكائن المستهلك عند تناوله للغذاء الملـوث بهـا او توجـد فـي الهـواء وتسـبب مشاكل صحية خطرة عند استنشاقها من قبل الكائن الحـي ويطلـق علـى هـذه الطريقـة بـالطرق المباشـرة Direct route (Garrido *et.al*., 2003) وتتفاقم المشاكل الصـحية هنـا عنـدما تحـدث فـي جماعـات سكانية تكون معتمدة على نوع واحد من الغـذاء , اذ يـزداد تـاثير السـموم الفطريـة بشـكل تراكمـي نتيجـة التعرض المستمر لها مقارنـة مـع الجماعـات التـي تعتمـد علـى التنـوع الغـذائي فـي معيشـتها Belgin) (*et.al*.,2004 . امـا التعـرض الغيـر المباشـر Indirect route فيكـون عـن طريـق تنـاول منتجـات الحيوانات التـي تغـذت سـابقا علـى مـواد علفيـة ملوثـة بالسـموم الفطريـة (Verma , 2004) . وتكمـن المشكلة في تأثيراتها المسرطنة والمطفرة وتلك المشابهة لتاثيرات الاستروجينات وهي تـاثيرات تراكميـة تحدث عند التعرض المستمر للسموم الفطرية في المستويات المسـموح بهـا وتعتمـد هـذه التـاثيرات علـى تراكم السم في الموقع الهدف له (Williams *et.al*., 2004) . يطلق على الحالة الناتجة عن التعـرض للسموم الفطرية مصـطلح التسـمم الفطـري Mycotoxicosis وهـو مصـطلح عـام يشـير الـى التـاثيرات المرضية الناتجة عن تناول الاغذية الملوثة بالسموم الفطرية وتعتمد اعراض التسمم الفطـري علـى نـوع السم وكميته ومدة التعرض له والعمـر والجـنس والحالـة الصـحية ويكـون التسـمم علـى نـوعين امـا حـاد Acute mycotoxicosis وينتج عند التعرض لتراكيز عالية من السموم الفطرية ولمدة قصيرة , يرافقه قلـة مقاومـة الجسـم للامـراض نتيجـة ضـعف الجهـاز المنـاعي , او يكـون التسـمم مـزمن Chronic

mycotoxicosis ينتج عن التعرض لمدة طويلة للسموم الفطرية وبتراكيز قليلة وينتج عنه تاثيرات صحية غير عكسية ومنها السرطان Cancer (Sassahara *et*. *al*., 2005) .

2. 5. 2. المستويات الصحية للسموم الفطرية

منذ اكتشاف سموم الافلاتوكسينات (1961) وثبوت مخاطرها على الصحة العامة للأنسان والحيوان ، شرّعت كثير من دول العالم قوانين تحدد فيها نسب تواجد السموم في الأغذية والمحاصيل ا لمختلفة لحماية المستهلكين من الأثار السلبية لهذه السموم التي قد تتلوث بها بعض الأغذية (Van Egmond ,1989). ففي نهاية الستينيات (1968) بدأت الولايات المتحدة الأميركية بتطبيق قوانين تحدد مستويات السموم الفطرية في الأغذية والأعلاف . وباتت الدول تشرع القوانين الخاصة بها وقد حددت التشريعات مستوى تواجد الافلاتوكسين , وعلى سبيل المثال لا الحصر حدد مستوى سم افلاتوكسينات B_1 في المملكة المتحدة في منتجات فستق الحقل المستخدمة في العلائق بـ 50 مايكروغرام / كغم عليقة في حين حددت كمية السم في غذاء الانسان بالصفر ، وفي عام 1992 حدد المستوى 10 مايكروغرام / كغم كحد مسموح به في العلائق الحيوانية (Moss , 1998) . وفي الولايات المتحدة وضعت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية مستويات تشريعية لهذه السموم في الأغذية والعلائق ، اذ تمنع بيع الحبوب التي يتجاوز فيها مستوى سم الافلاتوكسينات B_1 عن 20 مايكروغرام / كغم , كما لا يسمح بنقلها عبر حدود الولايات المتحدة ، اذ يمكن استعمالها محليا لتغذية الحيوانات (Wood، 1992). وشهدت الثمانينيات والتسعينيات من القرن المنصرم زيادة كبيرة في عدد الدول المشرعة للقوانين الخاصة بتحديد مستويات السموم الفطرية في الاغذية والاعلاف وصلت الى 77 دولة حتى عام 1995 و13 دولة لها ضوابط عامة في حين لا تزال 50 دولة لا تمتلك أي نوع من المقاييس (جدول 1) .واللافت للنظر ان المستويات الموضوعة من الدول المشرعة تختلف من بلد لاخر تبعا لعوامل عدة كالعوامل الآقتصادية والسياسية والأجتماعية (Erik , 2004) . وبنهاية عام 2003 ارتفع عدد الدول التي اعطت معلومات الى منظمة الزراعة والأغذية الدولية Foods and Agricultuer Organization (FAO) تخص التشريعات التي وضعتها على مستويات التلوث بالسموم الفطرية في مختلف الأغذية واالمحاصيل الى 99 دولة بزيادة بلغت 30 % عن العدد في عام 1995 ويمثل المواطنون في هذه البلدان حوالي 87 % من مجموع سكان العالم .

جدول(1) متوسطات ومديات الحدود القصوى لمستوى سموم الافلاتوكسينات في الاغذية والاعلاف وعدد الدول المطبقه لقوانين التحديد (VanEgmond,1999) .

نوع سم الافلاتوكسين	1996			1987		
	المتوسطات (PPm)	المديات (PPm)	عدد الدول	المتوسطات (PPm)	المديات (PPm)	عدد الدول
B_1 في الاغذية	4	50-0	29	4	30-0	33
B_1 وB_2 وG_1 وG_2 في الاغذية	7	50-0	30	8	50-0	48
B_1 في اغذية الاطفال	0.2	5.0-0	4	0.3	5.0-0	5
M_1 في الحليب	0.05	1.0-0	13	0.05	1.0-0	17
B_1 في الاغذية	30	1,000-5	16	20	1,000-5	19
B_1 وB_2 وG_1 وG_2 في الاغذية	5	1,000-10	8	50	1,000-0	21

ولم يكن العراق ضمن الدول التي ارسلت ما يخص تشريعا او تجديدا للقوانين الخاصة بهذا المجال (WHO, 2003) . ان الناس في الدول الغنية يمتنعون عن تناول الأغذية الملوثة بالسموم وان كانت بنسب واطئة وضمن الحد المسموح بها ، غير انه في البلدان الفقيرة حيث يواجه كثير من السكان خطر المجاعة وحيث لا يوجد قانون ملزم بضوابط او تشريع او لا يكون موجودا اصلا فأن الناس لا يستطيعون ان يختاروا بين الغذاء السليم من التلوث بالسموم الفطرية والغذاء الملوث بتلك السموم (Cook, 1996).

2. 5. 3. الصفات التشخيصية للنوع *Aspergillus flavus*

وصف الفطر *A. flavus* لاول مرة من قبل العالم Link عام 1809 , على انه يمتلك حامل كونيدي (Conidiophore) متثخن الجدار عديم اللون وذات طبيعة خشنة ويبلغ طول الحامل اقل من 1 ملم وتتسع نهاية الحامل لتكون حويصله (Vesicle) والتي تمتلك شكل متطاول في المراحل الاولى من النمو وفيما بعد يصبح شكلها شبه كروي او كروي ويتروح قطرها (10- 65) مايكرومتر (Hedayati *et.al.*, 2007) . تغطي التراكيب القارورية سطح الحوصلة بالكامل , وفي بعض العزلات تغطي التراكيب القارورية ثلاثة ارباع سطح الحوصلة فقط, يلاحظ صف واحد من التراكيب القارورية في الحويصلات الحديثة التكوين يتضاعف بتقدم عمر الحوصلة وتحمل التراكيب القارورية كونيدات مشوكة ذات شكل كروي او بيضوي . (Kown-Chung and Bennett, 1992) يتكاثر الفطر لاجنسيا ولكن بعض السلالات تتكاثر جنسيا اذ تسلك الفطريات الكيسية بتكوين ابواغ كيسية Ascospores منتظمة داخل اكياس وتكون الاخيرة ضمن جسم ثمري ذي شكل كروي Cleistothecium (Hocking & Pitt, 1997) . يصعب التمييز بين الضروب التابعة للنوع *A. flavus* مظهريا , ويعود السبب الى التداخل في الخصائص المظهرية والمجهرية , بشكل عام تمتلك جميعها مستعمرات خضراء اللون مظللة باللون الاصفر , اما ظهر المستعمرة فيكون لونها ذهبي الى بني محمر , بينما تتصف نسجة المستعمرة بكونها مترابطة غير مفككة غائرة في الوسط الغذائي وذات طبيعة مخملية Velvety , وعند تقدم المستعمرة بالنمو فانها تتحول الى اللون البني (Koh and Tseng,1975) وفي حالة تعرض الفطر الى ظروف بيئية غير ملائمة فانه يكُون ما يعرف بالأجسام الحجرية Sclerotia ذات لون ابيض او بنية غامقة الى سوداء , وحسب شكل ومعدل نمو الجسم الحجري فقد قسم الفطر *A. flavus* الى سلالتين L & S تقوم السلالة L بانتاج عدد قليل من الاجسام الحجرية الكبيرة الحجم يبلغ قطرها اكثر من 400 مايكرومتر , اما السلالة S فتنتج عدد كبير من الاجسام الحجرية صغيرة الحجم اذ يبلغ قطرها اقل من 400 مايكرومتر (Cotty, 1989) و 98% من عزلات هذه السلالة منتجة للافلاتوكسين (Nelson *et.al.,*1998) تنمو مستعمرات الفطر بمدى حراري واسع يتروح بين (10- 50) م° والمحتوى الرطوبي لمرتفع للحبوب ولاسيما في بداية التخزين يكون مشجعا للنمو , اذ وجد ان الفطر ينتج الافلاتوكسينات خلال يومين عند درجة حرارة 25 م° وبمحتوى رطوبة 30% , وفي عشرة ايام عند 21 م° ورطوبة حبوب 20% .

(Payane , 1992; Lillehoj *et.al.,*1987) . وراثيا فان العديد من الانواع العائدة الى جنس ال *Aspergillus* تكون ذات موروثات متشابهة نسبيا , يمتلك الفطر *A. flavus* ثمان كروموسومات ,

ويبلغ حجم الجينوم بما يقدر 36.3 ميغا من زوج قاعدي (bp) ويحتوي الجينوم على 13071 جين (Yu *et.al.,*2005) . ويبلغ طول الجين 1384 زوج قاعدي .

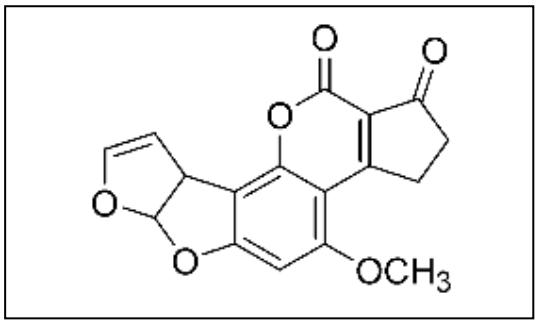
(Hedayati *et.al.,* 2007)

2. 5. 4. الافلاتوكسينات Aflatoxins

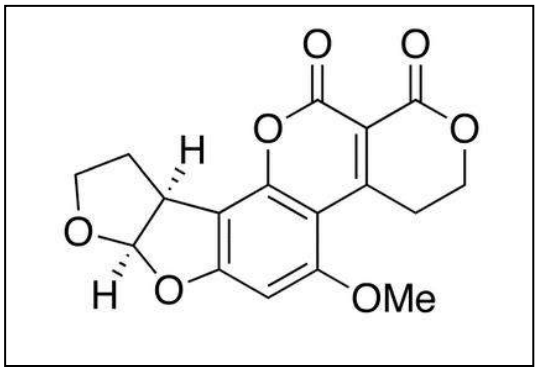
الافلاتوكسينات هي مركبات ايضية ثانوية مسرطنة وسامة تعود الى مجموعة ثنائي الفيورانوكومارين (Difuranocoumarine) وتنتجها مجموعة من الفطريات اهمها *Aspergillus flavus* والذي ينتج كل من الافلاتوكسين B_1 , B_2 والفطر *A. parasiticus* المعروف بانتاجه G_2 , G_1 , B_2 , B_1 ومن الفطريات الاخرى التي تنتج السم افلاتوكسين B_1 لكن بكفاءة اقل *A. niger* و *A. wentii* . و *A. rubber* وانواع من الجنس *Penicillium* المعروفة بانتاجها للافلاتوكسين B_1 مثل *P. citrinum* و *P. frequentans* و *P. puberulum* اضافة الى *Rhizopus* spp. ( ). Murphy *et.al*., 2006

تمتاز مجموعة الافلاتوكسينات بشدة توهج الفلورة المنبعث منها عند تعرضه للموجات الطويلة من الاشعة فوق البنفسجية وهذه الخاصية تجعل من الممكن الكشف عن تواجد هذه المركبات السامة بمستويات واطئة جدا (0.5 نانوغرام او اقل من ذلك لكل بقعة من بقع الكشف المثبتة على الواح الفحص الكروماتوغرافي) كما تمتاز بكونها بلورات عديمة اللون او بيضاء تذوب بشكل كامل في المذيبات متوسطة القطبية مثل الكلوروفورم والميثانول وبشكل خاص في مذيب اوكسيد الكبريت ثنائي المثيل الذي يستخدم عادة كمادة حاملة عند تجريع الافلاتوكسينات للحيوانات المختبرية اما قابلية ذوبانه في الماء فهي محدودة اذ تكون بحدود (10 – 20) ملغم / لتر , لا تتحطم بالمعاملات الحرارية اثناء الطبخ الاعتيادي او البسترة لوجود حلقة اللاكتون في جزيئة الافلاتوكسين والتي يجعلها اكثر عرضة للتحلل المائي في المحاليل القاعدية . (ابراهيم والجبوري ، 1998) .

يوجد في الوقت الحاضر (18) نوع مختلف من الافلاتوكسينات وتعد الانواع B_1 , B_2 , G_1 , G_2من اهم انواع الافلاتوكسينات المدروسة بالاضافة M_1 و M_2 اللذين يمثلان الناتج الايضي للـ B_1 وB_2 على التوالي.(Carlson *et. al.*, 2002).



الشكل (1) التركيب الكيميائي لسم الافلاتوكسين B_1 (Cotty, 1988)



الشكل(2) التركيب الكيميائي لسم الافلاتوكسين B_2 (Cotty, 1988)

تقسم الافلاتوكسينات الى مجموعتين رئيسيتين هما:

1- مجموعة سم الافلاتوكسين B :

وتضم سم افلاتوكسين B_1 ، B_2، B_{2a}، M_1، M_2، M_{2a}، Ro، P_1، Q_1 وجميعها تعكس تحت الأشعة فوق البنفسجية وميضا ازرق ما عدا M_{2a} الذي يعكس وميضا اخضر مزرق.

2- مجموعة سموم الافلاتوكسين G :

وتضم سم الافلاتوكسين G_1 ، G_2 ، G_{2a} ، GM_1 ، GM_2، GM_{2a}، B_3 وجميعها تعكس تحت الأشعة فوق بنفسجية وميضا ازرق مخضر ما عدا سم افلاتوكسين B_3 فيعكس لونا ازرق

(Saif *et.al.,*2003) .

ويعد الباحث Hartley et al.,(1963) اول من عزل واستخلص اربعة انواع من الافلاتوكسينات المنتجة من قبل *A. flavus* و *A. parasiticus* بشكل بقع متالقة اطلق عليه B_1 ، B_2 ، G_1 ، G_2 اذ تشير الاحرف الى لون التالق الذي تظهره البقع على صفائح الكروماتوغرافي عند فحصها تحت الاشعة فوق البنفسجية، ويرمز الحرف B الى اللون الازرق والحرف G الى اللون الاخضر اما الارقام 1 و2 فترمز الى معامل الترحيل Rate of flow (Rf) التي تظهرها البقع على صفائح TLC (Meerdink , 2004). و تم التعرف على نوعين آخرين من الافلاتوكسينات وهما M_1 و M_2 وتسمى سموم الحليب Milk toxins وتنتج من الافلاتوكسين B_1, B_2 على التوالي بعملية Hydroxylation في الحيوانات الحلوبة (الابقار والاغنام) التي تتغذى على عليقة ملوثة بالافلاتوكسينB_1, B_2. تفرز سموم الحليب M_2 , M_1 بمعدل يقارب (1.5)% من معدل الافلاتوكسين B المستهلك (Forbish, *et al*., 1986) .

درست الافلاتوكسينات بعد ذلك بشكل مستفيض وقسمت حسب درجة سميتها ونسب تواجدها في الاغذية والاعلاف وسم الافلاتوكسين B_1 اكثرها خطورة وتواجداً في الاغذية البشرية والاعلاف من بقية السموم يليه الافلاتوكسين G_1 ثم B_2 و G_2 (Turcksess and wood , 1997) . وتم تحديد الصيغة الجزيئية لمركبات الافلاتوكسين B_1 وG_1 من قبل(Asao *et. al.*(1963 بينما حددت الصيغة التركيبية للافلاتوكسين B_2 وG_2 من قبل (1963) Chang *et. al.* .

وهناك مشتقات هيدروكسيلية لهذه الافلاتوكسينات الرئيسة يمكن ان تنتج من قبل انواع الفطر *Aspergillus* وتسمى الافلاتوكسين B_{2a} و G_{2a} (Dutton and Heathcote, 1969) وفيما يأتي الخواص الفيزيوكيميائية للافلاتوكسينات :

جدول (2) الخواص الفيزيوكيميائية للافلاتوكسينات

نوع السم	الصيغة الجزيئية	الوزن الجزيئي (KD)	التوهج عند التعرض للـ (UV)	معامل الترحيل Rf
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	Blue	0.56
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	Blue	0.53
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	Green	0.48
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	Green	0.46
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	Blue	-
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	Blue	-

(Heathcot and Hibbert, 1978)

2. 5. 5 . التأثيرات السمية للافلاتوكسينات في الإنسان والحيوان

حظيت سموم الافلاتوكسينات باهتمام كبير جدا بسبب تأثيرها الفعال في الإنسان والحيوان , فهي تعد من أهم مسببات سرطان الكبد في الإنسان (FAO, 2003) كما ان لها تأثيرات مثبطة للجهاز المناعي فضلاً عن تأثيراتها المطفرة واحداثها للتشوهات الخلقية (Sassahara *et. al .*,2005) .

وجد ان هناك علاقة تأزرية Synergistic بين بعض الامراض وسموم الافلاتوكسينات ومنها مرض التهاب الكبد الفايروسي Hepatitis B virus ، فحدوث هذا المرض بوجود الافلاتوكسينات يؤدي الى سرطان الكبد حيث اثبت ان وجود Hepatitis B virus يعتبر حافزا" يؤدي الى زيادة احتمالية حصول سرطان الكبد بسبب الافلاتوكسين . اكتشفت هذه الحالة نتيجة حدوث مرض Hepatitis في الهند سنة (1974) والتي ادت الى اصابة (400) شخص ووفاة (100) منهم وكان سببها مؤكدا هو وجود الافلاتوكسين (Krishnamachari *et. al.*, 1975) ووجدت علاقة موجبة بين كمية الافلاتوكسينات سواء الماخوذة من عينات الاغذية المعروضة في الاسواق او المطبوخة من جهة ووبائية

سرطان الكبد من جهة اخرى وذلك في عدة دراسات اجريت في الاقطار الافريقية والاسيوية (Bhatnagar *et. al.*, 1992). لقد تم التعرف على سمية الافلاتوكسينات عن طريق اعطاء حيوانات التجارب علائق ملوثة بالافلاتوكسينات وملاحظة التأثيرات التي يحدثها في هذه الحيوانات بعد تشريحها، كحدوث حالات نزفية وموت للانسجة في الكبد واحتقان الدم في الكلى وحدوث تكاثر سريع للخلايا الظهارية الموجودة في قناة الصفراء . (Yabye and Hamasaki , 1993).

في دراسة مقارنة خارج الجسم الحي لمعرفة تأثير الافلاتوكسين على التركيب الدقيق لخلايا الكبد لكل من الانسان والفئران والجرذان، وجد حدوث تغيرات في التركيب الدقيق لانوية خلايا الكبد بعد تعريضها للافلاتوكسين B_1 ، وان معظم التغيرات التي حدثت للانوية كانت للمكونات النووية التي تشبه في ذلك خلايا كبد الجرذان المعرضة للافلاتوكسين B_1 داخل الجسم الحي (Cole *et. al.*, 1986) .

تختلف جرع الافلاتوكسينات المميتة باختلاف انواع الافلاتوكسين اذ ان AFB_1 هو الاكثر خطورة يليه AFG_1 ، اما الافلاتوكسين B_2 وG_2 فانهما اقل خطورة من AFB_1 ، اما الافلاتوكسين M_1 فيعد مسبب سرطانيا كامنا وخطيرا , ويمكن تحديد المستوى السمي باعتماد قيم LD_{50} للافلاتوكسين B_1 في انواع مختلفة من الحيوانات والتي تتراوح بين (0.37) ملغم / كغم من وزن الجسم بالنسبة لافراخ البط الى (9.0) ملغم / كغم للفئران Mice . (Smith *et al.*, 1995)

وسببت الأفلاتوكسينات في عدد من البلدان الأفريقية تأثيرات سمية على المستوى الوراثي والمتمثلة بالجينات وعملية الاستنساخ وبناء الحوامض النووية DNA و RNA وتؤثر في بناء الأحماض الامينية وبالتالي تثبط تكوين البروتينات(سهلب وآخرون , 1990) .

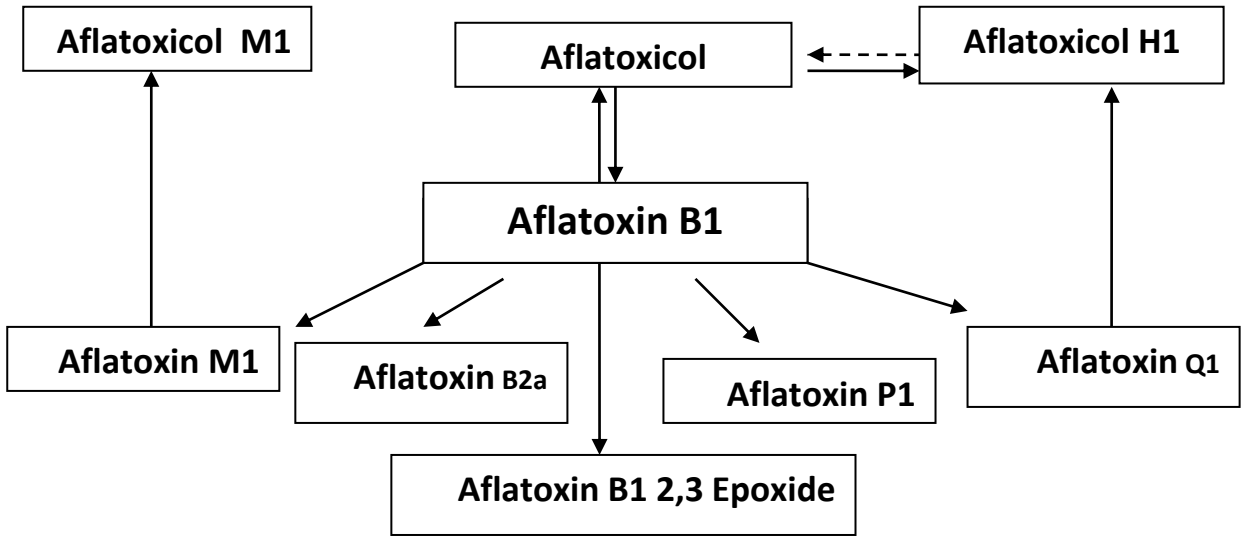
وانها سببت الكثير من التشوهات الخلقية في الأجنة فضلا عن هلاك نسبة عالية منها أما عند وصولها إلى مرحلة البلوغ فانه يسبب اضطرابات عديدة في الصفات الجنسية ، وللافلاتوكسينات خواص تثبيط المناعة ، حيث أن أعطاء الدواجن جرعات من الافلاتوكسينات تتراوح مابين 0.25 - 0.5 ملغم/ كغم في العلف سبب انخفاض في مناعة الطيور ضد الإصابات البكتيرية والفايروسية . (إبراهيم والجبوري1998 (,

وأثبتت دراسة أجراها حمودي والدوري (2001) أن أعطاء علائق ملوثة بالافلاتوكسين B_1 للدجاج وبنسب متزايدة أدى إلى حصول زيادة في معدل أوزان الأعضاء الداخلية (طحال ، قلب ، المعدة ، القانصة) لكن هذه الزيادة كانت أوضح في وزن الكبد لأنه أسرع الأجزاء تأثرا بالسموم الفطرية .

2. 5. 6. التحولات الحيوية للأفلاتوكسين

تتعرض الأفلاتوكسينات الى عمليات ايضية متعددة اذ تشير الدراسات الى ان الافلاتوكسين B_1 يتم تحويله الى عدة مركبات ايضية ثانوية وان احدها هو M_1 وهو من المركبات شديدة السمية وبالرغم من هذه الخاصية السمية لهذا المركب الثانوي فان للجسم القابلية لابطال مفعوله السمي وذلك من خلال ارتباطه بحوامض الغدة الصفراء في الكبد قبل طرحها في كيس الصفراء او مع البول , وكذلك تبين حديثا ان هناك مركبين ايضيين ثانويين هما P_1 و Q_1 يمران بنفس التحولات لابطال مفعوله السمي (Agag, 2004) .

ويتم في الكبد تحويل الافلاتوكسين B_1 الى Aflatoxicol ومن ثم الى H_1 Aflatoxicol وكذلك يمكن ان يتحول الافلاتوكسيكول B_1 الى المركب الايضي الثانوي الافلاتوكسين Q_1 والذي بدوره يمكن ان يتحول الى الافلاتوكسين H_1 وتتم هذه التحولات من خلال مساعدة الانزيمات الموجودة في الكبد . ولقد وجد ان خلايا الكبد لبعض انواع الطيور والقوارض لها فعالية كبيرة في تحويل الافلاتوكسين B_1 و G_1 الى مركبات ايضية ثانوية تدعى B_{2a} وG_{2a} ولهذه المركبات القدرة العالية للارتباط بالبروتينات , وتؤدي الى التسبب في الكثير من التاثيرات السلبية الحادة المصاحبة لحالات التسمم بهذه المركبات . (ابراهيم والجبوري ، 1998) . والمخطط الاتي يوضح التحولات الحيوية للافلاتوكسين في الكبد .



مخطط يوضح التحولات الحيوية للأفلاتوكسين في الكبد (ابراهيم والجبوري،1998)

2. 5. 7. تحطيم سموم الأفلاتوكسين

1- التحطيم الفيزيائي

أ – الحرارة :

السموم الفطرية بصورة عامة مقاومة لدرجات الحرارة العالية وعليه لاتكون ذات فعالية كبيرة في تحطيمها , فسموم الافلاتوكسينات لايمكن تحطيمها الا عند تعرضها لدرجة 250 م ولكن هذه الدرجة لايمكن الوصول اليها في اثناء المعاملات الحرارية لبسترة بعض انواع الاغذية كالحليب مثلا" وكذلك درجة حرارة طهي معظم الاغذية لايمكن الوصول لمثل هذه الدرجة والحرارة العالية تؤدي الى اتلافها , ومع ذلك هناك بعض انواع الاغذية كالبن الاخضر يمكن تعريضه لدرجة حرارة تصل الى 200م ولمدة 12 دقيقة مؤديا" الى اختزال 74% من الافلاتوكسينات الملوثة لحبوب البن بينما تصل نسبة الاختزال الى 94% عند التعرض لنفس الدرجة ولمدة 15 دقيقة . (الجميلي , 2014) .

ب – الموجات الدقيقة :

استخدمت الموجات الدقيقة في معاملة بعض انواع الاغذية لغرض اختزال السموم الملوثة له , فسموم الافلاتوكسينات سواء منها النقية او الملوثة للاغذية تتحطم عند تعرضها للموجات الدقيقة ولكن نسبة التحطيم تعتمد على قوة الموجات الدقيقة ومدة التعرض , حيث بلغت نسبة اختزال الافلاتوكسينات 95%

عند تعرض بذور فستق الحقل للموجات الدقيقة لمدة 16 دقيقة وبمعدل طاقة بلغت 1-6 كيلو واط او تعريض البذور لمدة 5 دقائق وبمعدل طاقة تراوحت بين 2-3 كيلو واط , بالرغم من النجاحات التي حصل عليها بعض الباحثين الذين استخدموا تلك التقنية في التحطيم الا انه لايمكن تطبيق هذه التقنية على الاغذية جميعها وذلك بسبب طبيعة وتركيب المادة الغذائية . (الجميلي , 2014) .

ج – الاشعاع :

استخدم الاشعاع كوسيلة فيزيائية لتحطيم السموم الفطرية في المنتجات الزراعية والاغذية المصنعة فضلا" عن مساهمتها في تعقيم بعض الاغذية وبصورة عامة هذه التقنية تستلزم التعرف على الجرعة الاشعاعية ذات التاثير المحطم للسم الفطري كون ان السموم النقية تختلف فيما بينها من حيث الجرعة المطلوبة لتحطيمها وكذلك الجرعة المحطمة للسم النقي لاتماثل جرعة الاشعاع المطلوبة لتحطيم السم الملوث للاغذية . ولوحظ ان تشعيع لقاح بعض انوع الفطريات ومنها المنتجة للافلاتوكسينات يؤدي الى زيادة افرازها لتلك السموم وفي بعض الاحيان وجد ان الحبوب المعاملة بالاشعاع يزداد مستوى السموم الفطرية فيها مقارنة بالحبوب الغير المشعة **.** (الجميلي , 2014) **.**

2 – التحطيم الكيميائي

أ - الاستخلاص بالمذيبات :

تعد طريقة الاستخلاص بالمذيبات احدى اهم الطرق لازالة السموم من الاغذية , وهذه الطريقة ذات فعالية عالية في ازالة سموم الافلاتوكسينات وبنسبة تتروح بين 80 – 95% (تعتمد على نظام الفصل المستخدم خلال عملية المعالجة) ولكن عند استخدام تلك الطريقة فلابد من استخدام نظام فصل مناسب لكل سم من السموم الفطرية فسموم الافلاتوكسينات لاتذوب في الماء لذلك يتم استخلاصها بالمذيبات العضوية . (الجميلي , 2014) .

ب – استخدام المواد الكيميائية :

تتمثل هذه الطريقة باستخدام المواد الكيميائية ذات القدرة على ابطال الفعالية السمية للسموم الافلاتوكسينات الملوثة للاغذية من دون التاثير في قيمتها الغذائية وصفاتها الطبيعية من النكهة والطعم

تشمل تلك المواد القواعد والعوامل المؤكسدة والمختزلة وتعتمد قدرة تلك المواد على تحطيم السموم على عوامل عدة هي محتوى المادة الغذائية من الماء ودرجات الحرارة والضغط المستعمل اثناء المعالجة بتلك المواد فضلا" عن مستوى السم الفطري في المنتج الغذائي , المواد الكيميائية ذات الفعالية العالية في ابطال سمية الافلاتوكسينات هي مثيل الامين وهايدروكسيد الصوديوم والفورمالدهايد وبيروكسيد الهيدروجين وغاز الكلوريد وهايبوكلورات الصوديوم وثنائي كبريتيد الصوديوم . حيث يعمل المركب الاخير على تحطيم سم الافلاتوكسين B1 في الذرة الصفراء من خلال ارتباطه مع حلقة الفيوران وتكوين معقد aflatoxinB1-S وبالتالي فقدان الافلاتوكسين فعاليته السمية , واستخدمت الامونيا في ازالة سمية الافلاتوكسينات من خلال قدرتها على تكسير حلقة اللاكتون (الجميلي , 2014) .

3 - التحطيم الحيوي Biodegradation لسم الافلاتوكسين

يمكن ازالة السموم الفطرية حيويا" باستخدام احياء دقيقة قادرة على تحطيم تلك السموم وهذه الطريقة يمكن بواسطتها ازالة السموم الفطرية تحت الظروف الطبيعية من دون استخدام مواد كيميائية خطرة فضلا" عن كونها لاتؤثر على القيمة الغذائية للمواد الغذائية او الاعلاف الحيوانية وذلك من خلال عمليات التخمر الميكروبي (اللاكتيك او الكحول) او المدعمات الحيوية او اية احياء دقيقة تعاونية اخرى فضلا" عن امكانية توظيف الاحياء الدقيقة المتواجدة في التربة او المياه في تحطيم السموم الفطرية . (الجميلي , 2014) .

اولا" : التحطيم الحيوي باستخدام البكتريا

هنالك العديد من انواع بكتريا التربة لها القدرة في تجزئة الافلاتوكسين مثل بكتريا *Flavobacterium aurantiacum* NRRL-184 التي اثبتت قدرتها على ازالة سمية الافلاتوكسين من الاطعمة والاغذية (Cigler *et al*., 1966) . حيث عند حضن بكتريا

F . aurantiacum مع الافلاتوكسين في درجة حرارة 28 م لمدة 12 ساعة بينت النتائج ازالة سم AFG وكذلك تقليل سم AFB وازالة سمية AFM1 من الحليب بشكل كامل (Shapira, 2004).

وفي دراسة اخرى استخدمت بكتريا *Flavobacterium aurantiacum* في تحطيم الأفلاتوكسينات من خلال تتبع ذرة الكاربون المشعة C_{14} في الكشف عن تأثير البكتريا بالمادة السامة وكيفية اختزال فعاليتها , ومن خلال التاثير في الايونات الموجبة وبعض المركبات الكيميائية على AFB_1 المتحللة بفعل هذه البكتريا مثل Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} واختزالها بفعل البكتريا (D' Souza & Brackett, 2000 ; D' Souza & Brackett, 2001) .

هنالك كثير من التطبيقات لبكتريا *F. aurantiacum* تؤكد تأثير انزيماتها في عمليات التحلل وقدرتها في ازالة الملوثات السامة في الاغذية (Bata & Lasztity , 1999) .

في دراسة اخرى لبكتريا *Mycobacterium fluoranthenivorans* المعزولة من التربة الملوثة بهيدروكربونات الاروماتية polycyclic aromatic Hydrocarbons وجد انها تمتلك القدرة ايضا في تحطيم سم B_1 كمصدر مفرد للكاربون (Hormisch *et al*., 2004) .

وبينت دراسة اخرى فعالية بكتريا *M. fluoranthenivorans* في اختزال كمية الافلاتوكسين B_1 وبنسبة وصلت الى 80 % خلال 36 ساعة وبعد مرور 72 ساعة اصبح من غير الممكن الكشف عنه وذلك بفعل الخلايا الحرة للبكتريا . (Teniola *et al*.,2005) .

Teniola وجماعته (2005) تحرى عن قابلية بكتريا *Rhodococcus erythropolis* المعزولة من التربة الملوثة بالهيدروكربونات الاروماتية في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 فوجد انها ذات فعالية عالية في اختزال السم اذ لم يتبقى منه الا 17% بعد 48 ساعة من مدة الحضن في حين لم يبقى سوى 3- 6 % فقط بعد مدة حضن 72 ساعة .

وفي دراسة اخرى لنفس البكتريا لوحظ بقاء 32% فقط من سم AFB_1 تم الكشف عنها بعد 72 ساعة (Alberts *et al* ., 2006) .

أظهرت نتائج البحوث ان البكتريا *Bacillus subtilis* استطاعت اختزال كمية الافلاتوكسينات المنتجة في مزرعة مشتركة مع فطر *Aspergillus* منتج للافلاتوكسينات .ومن المحتمل أن المنتجات الأيضية لبكتريا *B.subtilis* تثبط كلا من انبات السبورات واستطالة الهايفات الفطرية والذي بدوره يؤدي إلى اختزال تطور الفطر وبالتالي اختزال انتاج الافلاتوكسين. كما أن *B.subtilis* تستطيع اختزال مستويات الافلاتوكسينات مباشرة دون التأثير على نمو الفطر من خلال تحطيم السموم الفطرية انزيميا (Bata and Lasztity,1999).

وفي دراسة أخرى أثبتت إمتلاك بكتريا *B.subtilis* على فعالية عالية في في تثبيط نمو عزلات الفطر *A.flavus* المنتجة والغير منتجة للأفلاتوكسينات وبنسبة 100% وعزيت هذه الفعالية إلى قدرة البكتريا على إنتاج الإنزيمات الحالة Lytic enzymes والتي تقوم بتحليل العديد من المركبات البوليمرية كالبروتينات والدهون ومنها إنزيم Chitinase المحلل لمادة الكايتين والتي تعد المكون الأساسي لجدران الفطريات ومنها الفطر *A.flavus* فضلا عن إنزيم Lecithinase الفعال في تحليل الدهون الفوسفاتية (العميدي,2009).

في دراسة اجريت في الهند استخدم فيها بكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Trichoderma virens* و *Bacillus subtilis* كعوامل للسيطرة الحيوية في نمو وانتاج الافلاتوكسينات المنتج من قبل فطر *A . flavus* في حبوب الرز , حيث كانت نسبة تثبيط النمو 93% و 80% و 68% على التوالي اما اختزال المادة السامة فكانت النسبة 83.7 % , 72.2% , 58% على التوالي وتم الكشف عن تلك النسب بجهاز Enzyme –linked immunosorbent assay(ELISA) . (Reddy, *et al*.,2009)

وفي دراسة محلية وجد ت الساعدي (2012) ان بكتريا *B. subtilis* ذات فعالية عالية في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 في انبوبة الاختبار *invitro* وعند معاملة حيوانات الجرذ الابيض بسم الافلاتوكسين B_1 المعامل مسبقا"(خارجيا") بالبكتريا *B. subtilis* فقد السم فعاليته السمية في النظم الحيوية المدروسة لحيوانات الجرذ الابيض اذ كانت معايير الدم الفسلجية و الكيموحيوية طبيعية , كما انه لم تظهر اية تأثيرات مرضية في انسجة اعضاء الكبد والكلى والامعاء .

وتوصلت كثير من الدراسات التي استخدمت الأحياء المجهرية وخاصة بكتريا Lactic acid في تكسير او اعاقة تخليق الأفلاتوكسينات الى نتائج مختلفة عند التحري عن فعالية هذا النوع من البكتريا في تحطيم الأفلاتوكسينات خارج الجسم الحي *invitro* باختلاف الظروف البيئة وتأثيراتها (El Khoury *et al* .,2011) .

ذكر Zinedine *et al*., (2005) في دراستهم ان الظروف البيئة المختلفة من مستوى PH والحرارة تعيق تخليق السموم او تختزل مستوياتها وانتشارها .

وجد Kabak (2002) ان بكتريا Probiotic lactic acid ذات قدرة على تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 في الاغذية بنسبة(32 – 46.5) % .

وتوصلت دراسة حول امكانية اختزال كمية سم AFB1 باستخدام بكتريا *Lactobacillus plantarum* و *Lactococcus lactis* , حيث بينت الدراسة قدرة بكتريا *L. plantarum* في خفض كمية السم بنسبة 46% اما بكتريا *L. lactis* فكانت نسبة الاختزال 27% في الوسط السائل خارج الجسم الحي وعند مزج النوعين كانت نسبة التحلل للمادة السامة 59% .(Sezer *et al* ., 2013) .

ان ميكانيكية اختزال الافلاتوكسين بفعل بكتريا حامض الاكتيك تعتمد على ارتباط السم بمكونات الجدار الخلوي للبكتريا (Blanco *et al* ., 1993) .

وقد تم التحري عن قدرة 12 سلالة لبكتريا Lactobacillus , 5 سلالات لبكتريا Bifidobacterium و 3 سلالات لبكتريا Lactococcus في اعاقة انتاج الافلاتوكسين B1 وهذه الانواع البكترية شائعة الاستعمال في صناعة الاغذية مثل منتجات الحليب واللحوم وغيرها . (Peltonen *et al* ., 2001)

وفي دراسة اخرى تم استخدام ستة انواع من بكتريا Lactic acid المعزولة من عصيدة الحبوب المخمرة محليا" وشخصت الانواع *Lactobacillus fermentum OYB* و *L. fermentumRS2* و *L. plantarum MW* و *L. plantarum YO* و *L. brevisWS3* و *Lactococcus* spp.*RS3* اخبرت فعاليتها في تثبيط نمو الفطريات المنتجة للافلاتوكسينات والمعزولة من مصادر مختلفة من الاغذية وهي *Aspergillus parasiticus C7* و *A. Parasiticus AF7* المنتجة لسم (AFB1 , AFG) *A. flavus* (*M1* و *A. flavus B4* و *flavus B5* و *A. flavus C6* المنتجة لسم (AFB1) وقد اثبتت نتائج البحث ان تثبيط النمو واختزال المادة السامة كان واضحا" من قبل جميع العزلات المختبرة ولكن نسبة التثبيط الاعلى كانت بفعل البكتريا *L. plantarumYO* ثبطت النمو الخضري والسبوري لجميع الفطريات المدروسة والمنتجة للافلاتوكسينات و بكتريا *Lactococcus* spp. *RS3* و *L. brevis* *WS3* اثبتت قابليتها على تثبيط *A. parasiticus C7* و *A. flavus B5 & C6* . (Onilude *et al*., 2005)

وفي دراسة اجريت في كوريا حول بعض انواع الأغذية الكورية التقليدية المتخمرة التي تم عزل انواعا من البكتريا منها مثل *Leuconostoc mesenteroides* و *Lactobacillus plantarum* و *LB. casei* و *Bacillus subtilis* حيث اثبتت الدراسة قدرة العزلات البكترية الاربعة على اختزال نمو mycelial للفطر *A. parasiticus* وتثبيط انتاج سموم الافلاتوكسين , وقد تم الكشف عن نسبة تثبيط الانتاج من خلال استعمال تقنية (High perfomancce liquid chromatography HPLC)

حيث تراوحت نسبة اختزال السم بين 21.6 % الى 70.4 % ونسبة تثبيط النمو بين 20.9% الى 86.2 % . (Jong , 2007) .

وقد درس EL-Nezami *et al*., (1998) قابلية السلالات البكتيرية العائدة لجنس *Lactobacillus* على ازالة سمية AFB_1 من الاوساط الزرعية .

من جانب اخر اظهرت سلالات *L. rhamnosus* GG و *L. rhamnosus* LC-705 فعالية معنوية في ازالة سم AFB_1 من الوسط وبنسبة 80 % , حيث تعمل هذه البكتريا على اختزال تجمع الافلاتوكسين في الامعاء بواسطة الزيادة في عملية الطرح من خلال تكوين معقد (البكتريا – الافلاتوكسين) . (Kankaankpaa*, et al*.,2000) .

ثانيا " : التحطيم الحيوي باستخدام الفطريات

ظهر دور كبير ايضا لنوع اخر من الاحياء الدقيقة في تحطيم السموم الفطرية هي الفطريات نفسها, لكن السلالات الغير منتجة للسموم , فبعض السلالات لاتنتج الافلاتوكسينات لكن قادرة على تحطيمه , مثل الفطر *Penicillium raistrickli* الذي يمتلك القابلية على تحويل AFB_1 الى مركب مشابه لـ AFB_2 (Ciegler *et al*., 1966) .

وقد استخدمت الفطريات الشعاعية في هذا المجال فالفطر *A.niger* يستطيع تحويل سم الأفلاتوكسين B_1 الى أفلاتوكسين B_{2a} كما أن الفطر *Armillariella tabescens* يستطيع تحطيم السم B_1 من خلال فتح حلقتي difuran وأن *Tetrahymena pyrformis* يقوم بتحويل AFB_1 الى Aflatoxicol من خلال قدرته على إحلال مجموعة هيدروكسيل (OH) محل ذرة الأوكسجين في إحدى الحلقات الخماسية المكونة للسم (Mishra and Das,2003) بالإضافة الى السلالات الغير منتجة للسموم من كلا النوعين *A. flavus* و *A.parasiticus*

. (Dorner, 2005)

وإن مشكلة الافلاتوكسين B_1 هي ان أيضه 8,9-epoxide يكُون معقدات اولية مع النايتروجين رقم 7في القاعدة النايتروجينية للكوانين الموجودة في الـDNA .(Cullen & Newberne,1994) .

وجـد الباحـث Kusumaningtyas *et al*., (2006) فطريـات اخـرى *مثـل* *Rhizopus oligosporus* قادرة على تثبيط تخليق AFB_1 عندما يزرع مع الفطر *A. flavus* المنتج للافلاتوكسين B_1. وتلعب بعض الانزيمات المنقاة مـن انظمـة الاحيـاء الدقيقـة دورا مهمـا فـي تحطـيم او ازالـة السـموم وتسمى العملية التحطيم الانزيمي للسموم الافلاتوكسين (Shapira, 2004) .

مثل بعض الانزيمات المنتجـة مـن قبـل بعـض السـلالات الفطريـة والتـي لهـا القـدرة فـي تحطـيم فعاليـة الافلاتوكسين مثل فطر *Pleurotus ostreatus* حيث تعمل بميكانيكة فتح حلقة اللاكتـون للافلاتوكسـين (Motomura *et al* ., 2003).

وفي دراسة اخرى كشف عن انزيم يسـمى aflatoxin – detoxifizyme(ADTZ) يمتلـك فعاليـة على تحلـل الافلاتوكسـين B_1 والمعـزول مـن فطـر *Armillariella tabescens* (E-20) وكانـت اليـة عملها معتمدة على فتح حلقتي difuran للافلاتوكسـين عنـد درجـة حـرارة 35م^{o} و 6.8 PH . (Liu, *et al*., 2001) .

الشكل (3 و 4) مثال على الية تحطم سم الافلاتوكسين B_1 بواسطة استخدام بعض الفطريات مثل *Tetrahymena pyrformis* و *Armillariella tabescens* .

ولكن يبقى السـؤال عـن سـمية منتجـات الـتحطم الانزيمـي وآثـار التخمـر الغيـر مرغوبـة لهـذه الكائنـات, بالإضـافة إلـى أن وجودهـا الغيـر طبيعـي يـؤثر علـى نوعيـة الطعـام المتواجـدة عليـه . (Allameh *et al*.,2001) .

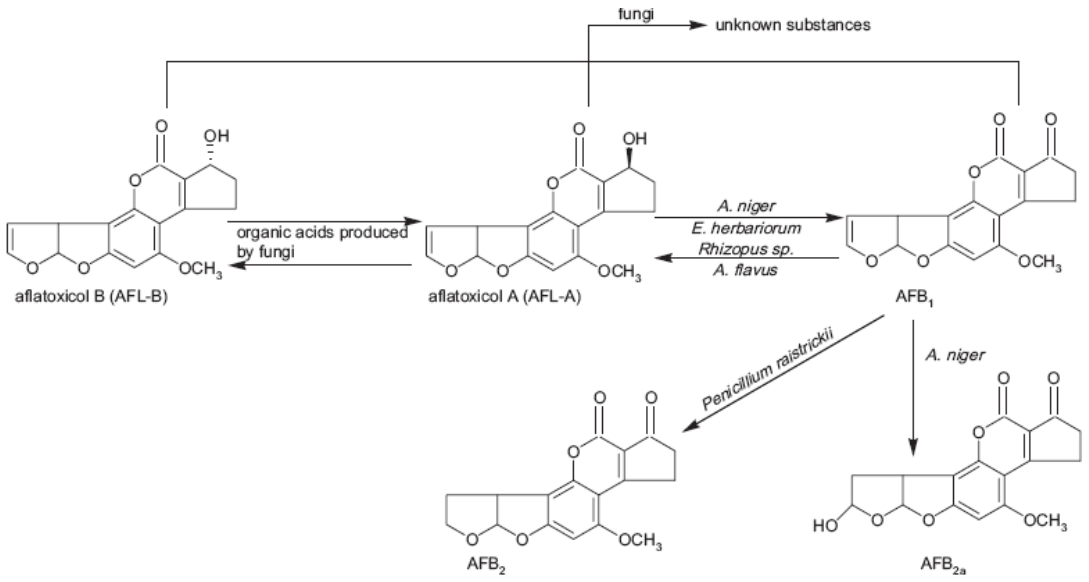
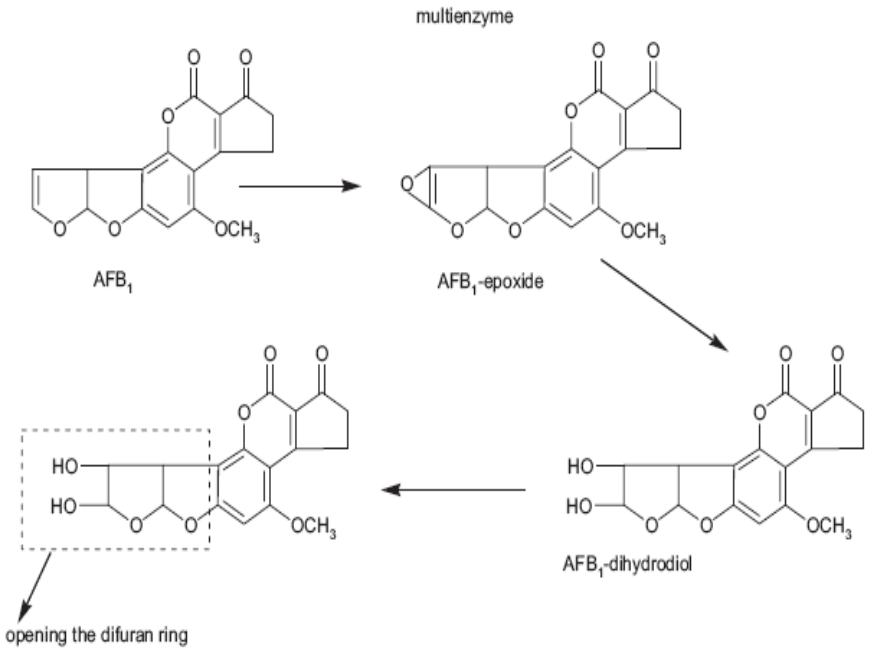


Figure 1. Metabolic pathways of aflatoxin B_1 by fungi.

الشكل (3) التحطيم الحيوي للافلاتوكسين B1 بواسطة *Tetrahymena pyrformis*

(Qinghua Wu *et al*.,2009)



الشكل (4) التحطيم الحيوي للافلاتوكسين B1 بواسطة *Armillariella tabescens*

.(Qinghua Wu *et al*.,2009)

2. 5. 8. الخصائص التصنيفية والفسلجية لبكتريا *lactococcus lactis* واهميتها البيئية

.

يعـود هـذا النـوع مـن البكتريـا الـى صـنف Bacilli , رتبـة Lactobacillales , عائلـة Streptococcaceae , جنس Lactococcus . (Schleifer *et al*., 1986) .

الخلية المفردة لبكتريا *L . lactis* مكورة الشكل وتتصل مع بعضها اما بشكل زوج من الخلايا او بشكل سلسلة قصيرة , بالاعتماد على شروط النمو , موجبة لصبغة كرام , سالبة لاختبار Catalase وOxidase غير منتجة للسبورات وليست متحركة تمتلك مؤيضات متجانسة التخمر وكذلك قادرة على انتاج حامض اللاكتك L-(+) Lactic acid , تنمو ضمن مدى حراري 10 – 40 م^{o} و لكن درجة الحرارة المثلى 30 م^{o} (Braat *et al*., 2006 ; Madigan & Martinko, 2005) .

كذلك تستطيع بكتريا *L . lactis* تثبيت حامض D-(-) Lactic acid في ظروف نمو خاصة عند انخفاض مستوى PH . (Akerberg *et al*., 1998) .

قابليتها على انتاج حامض اللاكتيك و كفاءتها في تخمر اللاكتوز كان احد الاسباب التي جعلتها من اهم الكائنات المجهرية المستخدمة في صناعة الالبان , وتعتبر من الكائنات الامينة كونها لا تسبب أي امراض انتهازية للانسان (FDA, 2012 ; Wessels *et al*., 2004) .

تستخدم البكتريا الانزيمات في انتاج جزئيات الطاقة ATP من لاكتوز الحليب , والناتج العرضي من هذه العملية هو Lactic acid والذي يعمل على تخمر الحليب ثم تحويله الى الجبن , وتدخل ايضا" في صناعة الخضار المخلل و البيرة و النبيذ و بعض انواع الخبز وتخمر مواد غذائية اخرى . (Madigan & Martinko, 2005) .

من الناحية الجينية البلازميد الخاص ببكتريا *L . lactis* يحمل الجينات المسؤولة عن هدم اللاكتوز وانتاج انزيم proteinase بالاضافة الى السيطرة على ايض الكالكتوز والمانوز والكلكوز وتنظيم تخليق DNA وانتاج Bacteriocine . (Gasson, 1993)

ولم تقتصر اهمية بكتريا *L . lactis* على صناعة المنتجات الغذائية فقط بل كان لها دور ا مهما في بعض الجوانب العلاجية او الطبية , وكذلك الدور التضادي لبعض انواع الفطريات والبكتريا المرضية , اذ بينت الدراسات امتلاك بعض العزلات المحلية لهذه البكتريا الفعالية التضادية اتجاه فطر *Penicillium* spp. وابواغه في الاوساط الصلبة والسائلة حيث اثبتت الدراسة قدرة خمسة عزلات منها على تثبيط النمو الفطري بطريقة الاقراص وازدادت مناطق التثبيط عند استخدام طريقة الانتشار في الحفر للرواشح البكتيرية (محسن , 2005) .

اوضح شعبان وثلج (2013) دور مادة النيايسين Nicine التي تنتجها بكتريا *L . lactis* المعزولة من منتجات محلية الصنع في تثبيط بعض انواع الاحياء المجهرية المرضية من الانواع *Escherichia coli , Pseudomonas aeruginoa , Salmonella enteritidis , Sreptococcus fecalis , Staphylococcus aureus* , هذا بالإضافة الى استخدامه في علاج بعض الحالات المرضية لاسيما قرحة المعدة والقولون وفي المجالات الصناعية والتجميلية والادوية البيطرية . (Brotz & Sahl , 2000) .

وفي دراسة اخرى حول القدرة العلاجية لبكتريا *L . lactis* للفئران المصابة بطفيلي *Cryptosporidium parvum* و *Giardia lamblia* حيث بينت الدراسة الاستجابة العالية والسريعة

التي ابدتها الفئران المصابة للعلاج بعالق البكتريا بعد 7- 12 يوم وبكفاءة علاجية بلغت 67 – 92.6 % على التوالي (محمد , 2009) .

2. 6. السموم الكيميائية (المبيدات Pesticides)

يعرف المبيد pesticide بأنه مادة أو خليط من مواد كيميائية مصنعة أو طبيعية تستعمل لسيطرة على الآفات بغية التقليل من الأضرار التي تسببها الحشرات و الفطريات و نباتات الأدغال و الحلم وغيرها من الكائنات غير المرغوب فيها أثناء الزراعة والنقل أو الخزن أو البيع وكذلك قد تستعمل لمكافحة الحشرات الناقلة للأمراض المختلفة للإنسان والحيوان والنبات (العادل وعبد , 1979) . ولهذه المبيدات تاثيرات سمية على الانسان , وهذه السمية اما ان تكون شديدة نتيجة التعرض لجرع عالية من المبيدات تؤدي الى الوفاة وبالتالي يطلق عليها بالسمية الحادة Acute toxicity وهذا ما يتعرض إليه غالبية العاملين في مجال مكافحة الآفات وفي معامل تصنيع المبيدات . (WHO , 1992)

أما إذا كان الضرر ناتج عن تعرض الانسان لجرعات قليلة من المادة السامة ولمدة طويلة في حياة الكائن الحي فهذا يطلق عليه بالسمية المزمنة Chronic Toxicity وهذا النوع من التسمم يشمل المستهلكين عن طريق تناولهم للخضروات والفواكه التي تحوي على بقايا المادة السامة . (شعبان والملاح , 1993) .

2. 6. 1. الفوائد والمضار لمبيدات الآفات

اسهمت المبيدات الكيماوية مساهمة فعالة في زيادة إنتاج المحاصيل الزراعية عن طريق وقايتها من الآفات المختلفة , إذ ساعدت على زيادة الكفاءة الإنتاجية المختلفة للمحاصيل الزراعية عن طريق تقليل التلف الذي تسببه الافات مما أدى إلى توفير المنتجات الزراعية بأسعار مناسبة (Bloomquist , 1993)

وللمبيدات أثرٌ كبيرٌ في مجال الصحة العامة ولاسيما في الحد من انتشار الحشرات والمفصليات الناقلة للأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان , ومن الأمثلة الواضحة على ذلك التخلص من مرض Typhus الوبائي في الأربعينيات من القرن الماضي باستعمال مبيد DDT للقضاء على حشرة القمل الناقلة للمرض عن طريق تعفير الملابس والأجسام بمساحيق التعفير الحاوية على المبيد (Ware & Whitere , 2004)

سكان الدول النامية معرضون للخطر الأكبر في التعرض لتلك المبيدات وذلك بسبب ظروف العمل الرديئة وغير المطورة وسوء الاستعمال وقلة الوعي بالأخطار المحتملة أثناء تصنيع وتطبيق أو استعمال المبيدات مؤديا" ذلك إلى الوصول إلى مستويات عالية من التعرض وذلك عند النقص في التعرف على إجراءات المعالجة الآمنة . (Bull *et al*., 2006 ; Bhalli *et al*., 2006) .

ولكن في كل الأحوال فان النتيجة الحتمية لاستعمال المبيدات يكون له العديد من الآثار المباشرة وغير المباشرة على البيئة و التي بدأت تتضح بصورة أكثر في السنوات الأخيرة كما في حالات التسمم للإنسان الناتج من التغذية على مواد تحوي متبقيات من المبيدات بمستويات عالية أو نتيجة التعرض المباشر لها . إن المواد الغذائية الملوثة بالمبيدات والتي يتناولها الإنسان والحيوان على السواء بدأت آثارها بالظهور على نحو واسع في العقود القليلة الماضية . (Sabbioni & Numann ,1990) .وأكدت تقارير منظمة الصحة العالمية WHO إن للمبيدات أثرا" في ظهور العديد من حالات الإصابة بالأورام السرطانية و تشوه الأجنة و الإجهاض وحالات مرضية تتمثل في حدوث خلل بالأنزيمات والهرمونات المنظمة للنمو والتسمم الحاد الناتج عن تناول الأغذية الملوثة بالمبيدات , وقد سجل ارتباط بين التعرض للمبيدات وبين حدوث السرطانات في مواقع مختلفة من الجسم وكذلك الدم , كما انها تؤثر على التكاثر والخصوبة في الانسان . (Bolognesi, 2003 ; Bhalli, 2006)

وبسب انتشار الأخطار الصحية على الإنسان نتيجة التعرض للمبيدات فقد أصبح لزاما" اعطاء اهتمام خاص من قبل الباحثين للكشف عن أضرارها ومراقبة الجوانب الوراثية للسكان المعرضين للمواد الكيميائية ومراقبة الإصابة المحتملة بالأمراض الخطيرة والتعرف عليها . ومنها المخاطر المحتملة للسمية الجينية. (Kassie *et al*., 2003 ; Bolognesi *et al*., 2002) .

ودعا ذلك إلى مراقبة حالات التسمم الوراثية genotoxicity المحتملة لدى عمال المزارع التي يمكن أن تعد أداة مهمة في تخمين دور المبيدات في احداث التسمم الوراثي (Bolognesi , 2003 ; McCauley *et al*., 2006) .

وقد عدت مبيدات الآفات من المواد الكيميائية المحتملة التطفير Mutagens إذ بينت كثيرٌ من البيانات التجريبية بامتلاكها القدرة على احداث تغيرات كروموسومية مؤثرة في سلسلة الحامض النووي .(Lucero *et al*., 2000; Muniz*, et al*., 2008) .

استخدمت مبيدات pyrethroid الصناعية في الكثير من تجارب السمية الجينية المختلفة ووجد ان البعض منها لها تاثيرات مطفرة محتملة EL-Khatib and Rokaya, 2001)) .

وتشكل روابط تساهمية مع مراكز مختلفة من الخلايا وانويتها التي تتضمن وجود DNA وتتسبب لها بالتغيرات أو كسر لجزيئاتها (Bolognes *et al*., 1997).

فقد اثبت الهاشمي (2009) في دراسة لها ,ان احد مبيدات مجموعة pyrethroid وهو مبيد bifenthrin ذو تاثير تطفيري لبكتريا *Salmonella* في اختبار Ames test للتراكيز الادنى من الحد المسموح بها كمنتج تجاري وتوصلت الدراسة الى التاثير نفسه عند فحص متبقيات المبيد المستخلصة من بعض الخضروات المعاملة بالمبيد .

2. 6. 2. المبيد قيد الدراسة bifenthrin

مبيدات Pyrethroid تمثل احدى مجموعات المبيدات الصناعية التي ينتمي أليها المبيد قيد الدراسة يكمن تأثير أفراد هذه العائلة بصور عامة في تعطيل نقل ايونات الصوديوم و البوتاسيوم في اغشية الخلايا العصبية وتتسبب في تعطيل (توقف) عملية نقل الايعازات العصبية وتتشابه أعراض الاصابة جراء هذه المبيدات تشابهاً كبيراً مع أعراض التسمم بمبيد (DDT) من حيث حالات

الارتجاف , افراط الطعام , ارتفاع درجة الحرارة , وزيادة افراز اللعاب , زيادة نسبة سكر الدم و الادرينالين , و تكون الاعراض طويلة المدى (أي بعد مدة أيام او أسابيع) أي تحدث بشكل متسلسل بين تشوهات جنينية و خلقية , أعراض سرطان , تلف جهاز المناعة , هبوط الإفرازات الهرمونية من الدماغ . (Wardhaugh, 2005)

bifenthrin من المبيدات الحشرية الزراعية التي تنتمي الى عائلة pyrethroid وهو من الجيل الثالث من تلك العائلة الصناعية ويتميز هذا المبيد بأنه اكثر صمودا في البيئة سواء أكان في التربة او في المياه لذلك يعد من المبيدات الأكثر خطورة ويحتوي على EC% 10 من المادة الفعالة المتمثلة بمركب Bifenthrin , وتكمن تاثيراته في عملية نقل الايعازات العصبية حيث يؤثر في عملية دخول وخروج ايونات الصوديوم والبوتاسيوم في نهايات الخلايا العصبية ماقبل الاشتباك وبذلك تفقد الخلايا العصبية توازن الايونات على جانبي الغشاء وبالتالي يؤثر في وظيفة الخلايا العصبية ., (العادل , 2006) .

وتتمثل الية عمله كذلك من خلال تثبيطه لعمل أنزيم Acetylcholinesterase (AChE) الذي يؤدي دوراً هاماً في نقل الإشارات العصبية Nerve impulses transmission في الجهاز العصبي للفقريات و اللافقريات حيث يعمل على تحليل المادة الناقل Acetylecholine -ACh بعد اتحاده معها كيميائياً ، ويمكن استعادة نشاط الأنزيم غير أن المدة التي يستغرقها لاستعادة نشاطه تعتمد على التركيب الكيميائي للمبيد والجرعة المستعملة بصورة عامة (Murphy ,1986).

إن فقدان هذا الأنزيم يعني تراكم المادة الأساس Acetylcholine في مناطق التقاء الأعصاب مع العضلات أو الغدد ومن ثم يؤدي إلى زيادة تقلص العضلات وزيادة إفراز الغدد ، أما تراكمها في أعصاب الدماغ فيؤدي إلى اضطرابات سلوكية حسية , ، في حين يسبب تراكمها في عقد الجهاز العصبي المحيطي اللاإرادي زيادة في عدد ضربات القلب Heart beats وزيادة في ضغط الدم Blood pressure (Buffin, 2000).

واشار Geiger واخرون (1986) الى ان مبيد bifenthrin يتسبب في احداث اصابات سرطانية عند الجرع العالية المعامل بها الفئران .

2. 6. 3. دور الاحياء المجهرية في تحطيم المبيدات

ان عملية التحطم الحيوي(Biodegradation) تعني تكسير المادة الكيمائية بفعل الانزيمات المنتجة من الكائن المجهري مؤدية الى فقدان المركب الكيمائي تخصصه الوظيفي مع امكانية حدوث تغير في فعاليته السمية وعملية التكسير للمركبات بشكل كامل تحدث بالاكسدة او الاختزال الكامل لجزيئات بسيطة مثل ثاني اوكسيد الكاربون والميثان والنترات والامونيوم والماء ولكن يجب ملاحظة نواتج التحلل اذ يمكن ان تكون اكثر ضررا من المادة الاصلية (Finley *et al* ., 2010) .

التربة تضم مجموعات هائلة من الاحياء المجهرية التي تعيش بها , هناك انواع كثيرة تظهر القابلية على تحلل بعض انواع المبيدات من خلال طرق استخدامها كمواد او مصدر غذائي او مصدر للطاقة والكاربون وذلك بسبب الطبيعة الكيميائية (Aislabie & Lioyd-jone , 1995) .

ومن هذه المجاميع مثلا مبيدات الفوسفات العضوية (Organophosphat) بعض انواع البكتريا قادرة على تحويلها الى sulfons و oxons أي منتجات متحلله اخرى (Hill , 2003) .

وهنالك العديد من البكتريا التي تمتلك القابلية على تحلل المبيدات الكارباميت تكون معزولة من الترب حول العالم (Desaint *et al*., 2000) .والكثير من الدراسات السابقة بينت ان تحلل atrazine في التربة (مركب عضوي يستخدم كمبيدات للاعشاب herbicide) كان بفعل سلالات بكتيرية مفردة وسلالات متحدة تزيد من نسبة التحلل atrazine في التربة (Mandelbaum *et al*., 1995) .

تم استخدام بعض انواع العزلات البكتيرية المعزولة من التربة في تحلل مبيد Methomyl ومبيد Carbofuran من مجموعة مبيدات الكاربميت (حشرية وفطرية) حيث تم عزل بكتريا تابعة للاجناس *Pseudomonas* و *Alcaligenes* مثل *P. putida* و *P. fluorescens* و *P. flavus* و *P. plecoglossicida* و *Alcaligenes faecalis* وقد كان لها القابلية على تحليل مبيد Carbofuran بشكل كامل خلال 100يوم واستعمل المبيد كمصدر للطاقة والكاربون للبكتريا , اما العزلات *Flavobacterium odoratum* و *Rhodobacter capsulatus* و *Rhodobacter sphaeroides* اثبتت قدرتها على تحلل مبيد methomyl بشكل كامل خلال 40 يوم وكانت تقنية HPLC متبعة في الكشف عن نسبة التحلل (Omolo *et al*., 2012) .

استعملت ثلاث سلالات بكتيرية تم عزلها من ترب زراعية ملوثة بشكل كبير بمبيد Glyphosate العشبي حيث كانت قادرة على تحليل (1000 ppm) من المبيد وشخصت على انها *Pseudomonas putida* و *P . aeruginosa* و *Acetobacter faecalis* اختبرت السلالات بشكل مفرد في قدرتها على التحطيم

واعطت تاثيرات معنوية وكذلك عند مزج السلالات الثلاث معا , وقد تدرجت نسبة التثبيط للمبيد وصولا الى الصفر بعد فترة تحضين تراوحت من 12 – 96 ساعة باختلاف السلالات., وقد لوحظ زياده في عدد المستعمرات النامية للبكتريا بعد عملية التحلل دليلا" على اعتمادها المبيد الكلايفوسيت كمصدر غذائي (Olawale *et al*., 2011) .

بعض انواع الفطريات والبكتريا المعزولة من مناطق Rhizospher مثل البكتريا العصوية وفطريات *Aspergillus* spp. كان لها دور واضح في تحلل المبيد الحشري Chlorpyrifos وهذا ما اثبتته الدراسة التي اجريت بالهند , حيث بينت النتائج ان نسبة التحلل تراوحت بين (76 – 84.5) % للفطر والبكتريا على التوالي (Hindumathy & Gayathri , 2013) .

احدى الدراسات هدفت تحليل مبيدات organochlorine بواسطة البكتريا , اذ استخدمت خمسة عزلات بكتيرية عزلت من حبوب البن الاخضر وشخصت على انها *P. aeruginosa* و *P. putida* و *Stenotrophomonas maltophilia* و *Morganella morganii* و *Flavimonas oryzihabitans* اذ لوحظ من نتائج اختبار (GC) اختزال كمية كبيرة من مبيد DDT ومبيد DDE بفعل بكتريا *P . aeruginosa* و *F. oryzihabitans* . (Barragan *et al*., 2007).

.

2. 6. 4. الخصائص التصنيفية والفسلجية لبكتريا *Bacillus subtilis*

في عام 1872 اكتشف العالم Ferdinand cohn احد طلاب العالم Robert koch بكتريا *B. subtilis* واطلق عليه تلك التسمية وضمها الى العائلة البكتيرية Bacillaceae ضمن جنس *Bacillus* (Todar, 2003) . تصطبغ بسهولة بصبغة كرام وتعطي عند تصبيغها بتلك الصبغة تفاعلا موجبا أي أنها بكتريا موجبة لصبغة كرام و موجبة لفحص الكاتليز و غير ممرضة للانسان , ولكنها ملوثة للطعام ونادرا ما تسبب تسمم الاغذية حيث تستطيع تحمل درجة حرارة الطبخ (Bandow,*et al*., 2002) .

تتواجد بصورة طبيعية في التربة والدرجة الحرارية المثلى لنموها تتراوح بين (25 – 35)م° لكنها تستطيع تحمل الدرجات الحرارية العالية (Madigan & Martinko , 2005)

يكون بوغ بكتريا *B. subtilis* داخلي اهليلجي الشكل مركزي الموقع الى شبه مركزي اكتشف لأول مرة أيضا من قبل العالم Ferdinand Cohn , كما تكون محفظة Capsule مكونة من مادة Polyglutamic acid , وتتحرك بمجموعة من الاسواط المحيطية مسببة الانتشار الكثيف للمستعمرات على الأوساط الصلبة وشبة الصلبة (Nagroska *et al.*,2007) .

هذه البكتريا هوائية اختيارية يعني انها تحتاج الى الاوكسجين في نموها وفي غياب الاوكسجين تعتمد على صنع ATPخلال عملية التخمر (Schaechter *et al*., 2006).

تنمو جيدا في الوسط المغذي Nutrient agar وتكون مستعمراتها بيضاء اللون كريمية ذات قوام شبه لزج في بداية النمو وعند بداية تكوين المحفظة وذات حافة مستديرة في الساعات الأولى للحضن ما تلبث أن تنشأ لها بروزات شعاعية بسبب تحرك تلك البكتريا ومن ثم تفقد المستعمرات قوامها اللزج وتميل الى الجفاف بسبب فقدان المحفظة وتهشمها (Prescott, 2002).

يكون الجدار الخلوي الخارجي لهذه البكتريا صلب مما يعمل على المحافظة على الخلية البكتيرية من الظروف البيئية الخارجية فضلا عن الحفاظ على شكلها وعند نفاذ المتطلبات الغذائية الضرورية لنمو البكتريا والقيام بفعاليتها الايضية مثل الكاربون والفسفور والنتروجين تلجا الى تكوين ابواغ داخلية تسمح لها بالبقاء تحت هذه الظروف البيئية غير الملائمة حيث ان هذه الابواغ لها القدرة على مقاومة الدرجات الحرارية العالية والاشعة فوق البنفسجية والمواد الكيميائية ويتكون البوغ الداخلي من غلاف خارجي يعمل حاجزا من الانزيمات الحالة والمواد السامة والاشعة , وغشاء داخليا غير نفاذ للمواد السامة DNA يكون مقاوما للتضرر بالإشعاع والحرارة والسموم (Perez *et al*., 2000 ; Setlow , 2006) .

تملك هذه البكتريا القدرة على مقاومة ظروف اخرى مثل الحموضة و القاعدية و الازموزية و الاكسدة والحرارة وتكون هذه المقاومة منظمة بالعامل سگما الذي يتحفز عندما تتعرض البكتريا لمثل هذه الظروف (Bandow *et al*., 2002)

2. 6. 5. اليات التضاد الميكروبي في بكتريا *Bacillus subtilis*

2. 6. 5. 1. الانزيمات الحالة

تنتج بكتريا *B. subtilis* انواع مختلفة من الانزيمات التي تقوم بتحليل الكثير من المركبات البوليمرية اذ ان افراز مثل هذ الانزيمات يؤدي الى كبح فعالية المسببات المرضية للنبات واهم هذه الانزيمات Amylase الفعال في تحليل النشا و Protease المحلل للبروتين و Lipase المحلل للدهون اذ ان مثل هذه الانزيمات تدخل في حوالي 60% من المنتجات الصناعية التجارية (Morikawa, 2006) . كما وتنتج انزيم Chitinase المحلل لمادة Chitin وهو المكون الاساسي لجدران معظم الفطريات الراقية .(El hamshary & Khattab , 2008) .

ومن الانزيمات الاخرى التي تفرزها هذه البكتريا هو انزيم Lecthinase الفعال في تحليل الدهون الفوسفاتية وانزيم Catalase الفعال في تحطيم بيروكسيد الهايدروجين الى ماء واوكسجين وانزيم Superoxide dismutase الذي يسبب تحطم مادة Superoxide الى اوكسجين وبيروكسيد الهيدروجين (Bandoow , 2002) .

واوضح Kerovuo *et al.*,(2000) كفاءة البكتريا *B. subtilis* في انتاج انزيم Phytase الفعال في تحطيم مادة Phytic acid والمؤثر في تواجد او تجهيز الفوسفات في التربة .

2. 6. 5. 2. المضادات الحيوية

تنتج بكتريا *Bacillus subtilis* مضادات حيوية عديدة , ذات تخليق رايبوسومي (Ribosomially synthesis) اوغير رايبوسومي (non Ribosomially synthesis) حيث تتكون رايبوسومية البناء من الببتيدات (Peptides) بينما الغير رايبوسومية تتكون من متعدد الكيتايد (Polyketides) والدهون الفوسفاتية (Phospholipids) والسكريات الامينية Amino sugars وهذه المضادات لها فعالية عالية تجاه بعض الاحياء المجهرية (Ara , 2007)

حيث اشار Moyne *et al.*(2001) الى ان سلالة بكتريا *B. subtilis* Au195 تنتج المضاد الحيوي Bacillomycin D الذي له القدرة العالية في تثبيط نمو الفطر *A .flavus* المنتج لسموم الافلاتوكسين . واختبرت قدرة المضاد الحياتي Itarin A وهو بروتين دهني له القدرة على كبح نمو الفطر *A. parasiticus* وتثبيط انتاج الافلاتوكسينات عند استعمالة بتركيز 50 جزء بالمليون اذ ادت هذه

المعاملة الى تثبيط نمو الفطر , كما اختبرت كفاءة هذا المضاد في السيطرة على مرض سقوط البادرات في المحاصيل الحقلية في اثناء التجارب المختبرية الناتج عن تاثيرات المرضية للفطر *R. solani* وكذلك السيطرة على اصابات الحبوب والفواكه المخزنة من قبل الفطر *Botrytis cinerea* (Paulitz &Belanger, 2001 ; Kloepper *et al*., 2004) .

واشار Sood *et al.*,(2008) الى كفاءة البكتريا في انتاج المادة الشبيهة بالمضاد البكتيري Bacteriocin من خلال تنمية بكتريا *B. subtilis* في الاوساط السائلة والصلبة وكان لهذه المادة فعالية كبيرة في تحطيم مجموعة من الاحياء المجهرية المختبرة ومنها *B. mycoides* وكذلك كل من بكتريا *B.polymyxa* و *B. cereus* وكان الفعل التحطيمي لمادة Bacteriocin مؤثرا ومتزايدا بزيادة مدة التحضين وكذلك بزيادة مدة التضاد على الوسط الزرعي .

واظهر Chen *et al*.,(2007) كفاءة البكتريا *B. subtilis* 168 في انتاج المضادات الحيوية المتعددة البروتينات الدهنية مثل Surfactin و Bacillomycin D و Bacillysin و Difficidin و Macrolactin و Bacillibactin الفعالة في تثبيط الكثير من الفطريات الممرضة للجذور .

وبين Bhaskar *et al*.,(2008) كفاءة بكتريا *B. subtilis* في انتاج المضاد الحيوي Subtilisin المثبط للكثير من الفطريات .

2. 6. 6. الصفات والخصائص العامة لبكتريا *Pseudomonas fluorescens*

تمتاز الخلايا التابعة لهذا الجنس بكونها مفردة منحنية او مستقيمة , يترواح طولها بين 0.7- 0.8 مايكروميتر (Broad bent *et al*., 1971) .

سالبة لصبغة كرام , متحركة بأسواط محيطية , تتواجد في التـرب والميـاه وعلـى النباتـات والحيوانـات (Palleroni ,1984) .

موجبة لفحص Catalase و Oxidase اجبارية هوائية , غير مكونة للابواغ , المـدى الحـراري لنموهـا يترواح بين 4- 40 م° ودرجة الحرارة المثلى لنموها بين 25 -30 م° الرقم الهيدروجيني الملائـم لنموهـا يترواح بين 7- 9 ولكن يمكنها العيش بالاوساط الحامضـية عنـد مـدى 3-5 , تسـتطيع منافسـة الفطريـات على ايون الحديديك تنتج هذه البكتريا صبغة Pyoverdin وهي صبغة ذائبة خضراء اللـون براقـة , وقـد كان السبب بتسميتها بالفلورسنت هـو انتاجهـا لتلـك الصـبغة التـي كانـت سـابقا" تسـمى Fluorescein (Govan , 1997) . ان ما تنتجه هـذه البكتريـا يكـون ذات اهميـة اقتصـادية فـي الصـناعات والمنتجـات الزراعية حيث تتواجد حول جذور النباتات بحيث تحصل على بعض العناصر الغذائيـة وبالمقابـل تسـاعد النبات بعدة طرق منها تحطيم بعض السموم والملوثات بمـا فـي ذلـك الهيـدروكاربونات العطريـة متعـددة الحلقات , كما انها تحمي النباتات من الاصابة المرضية من خلال انتاج مركبـات ثانويـة مثـل المضـادات الحيوية وسيانيد الهيدروجين التي تقتل البكتريـا والفطريـات الاخـرى (Haas & Keel , 2003) . كـذلك تبقي المسببات المرضية الاخرى الى الخارج بسبب استبعادها لها تنافسيا لانها ذات قدرة على الاسـتعمار السريع , وقد افترض الباحثون انها يمكـن ان تكـون بـديلا جيـدا عـن المبيـدات الصـناعية بسـبب سـميتها ليرقات وعذارى البعوض الحامل لبعض الامراض (Jay , 2000) .

تفرز هذه البكتريا انزيمات Lipase المحلل للـدهون و Protease المحلـل للبروتينـات وتمتـاز هـذه الانزيمات بانها ثابته عند درجات الحرارة العالية , تستطيع البكتريا تحطيم بروتين Casein فـي الحليـب وبالتالي تسبب افساده او تلوثه وتجلط البروتين وبالتالي تكوين طبقة لزجـة (Ray, 1996 ; Jay, 2000) .

تنتج بكتريا *Pseudomonas fluorescens* مضاد Pyoluteorin ذو فعل كابح لتعفن الجـذور النـاتج عن الاصابة بالفطر *Pythium ultimatum* في نبات الخيار والحنطة (Maurhofer *et al*., 1994) .

لم تقتصر اهمية هذه البكتريا فقط علـى المجتمـع النبـاتي , بـل كانـت مفيـدة جـدا للجـنس البشـري فالمضادات الحيوية التي تساعد في حماية جذور النباتـات تسـتخدم ايضـا لعـلاج الالتهابـات عنـد البشـر , حيث انها تنتج المضاد Mupirocin الذي يستخدم لمعالجة اصـابات الجلـد والعـين والاذن ويسـتخدم فـي صناعة الكريمات والمراهم (Gibb *et al*., 1995) .

تستخدم مشتقات Mupirocin في علاج المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* الخطيرة المقاومة للميثيسيلين Methicillin التي يصعب علاجها بالمضادات الحيوية الاقل تخصصا , كذلك تستخدم في بعض المنتجات الغذائية كانتاج اللبن بشكل اساسي حيث تعمل على تحلل بعض البروتينات التي تعطي الطعم الحامض للمنتجات التجارية (Haas& Defago, 2005).

2. 6. 7. دور بكتريا *Pseudomonas fluorescens* في المكافحة الاحيائية

لبكتريا جنس *Pseudomonas* اهمية كبيرة في مكافحة الكثير من المسببات المرضية للنبات حيث اجريت العديد من الابحاث والدراسات حول هذا الجنس خلال السنين الماضية ولكن التركيز على الجوانب التجارية لم يكن الا في العقدين الماضيين وجاء نتيجة التطور العلمي في مجال المكافحة الحيوية فضلا" عن التأثيرات والمشاكل السلبية والبيئية من جراء استعمال المبيدات والاسمدة الكيمياوية , كما ان الاحياء المجهرية تستطيع مكافحة بعض الامراض التي يصعب السيطرة عليها باستعمال الاساليب التقليدية كالمبيدات الكيمياوية وطرق زراعية اخرى , وقد احتلت انواع البكتريا التابعة لجنس *Pseudomonas* وخاصة *P. fluorescens* مركز الصدارة في هذا المجال بسبب سهولة عزلها وسرعة تكاثرها مقارنة ببقية انواعها فضلا عن تخصصها الدقيق على المواد العضوية في المنطقة الجذرية وكذلك قدرتها على استغلال المواد الناضحة من الجذور ومن التغذية فضلا عن سرعة انشطارها خصوصا في منطقة الجذر (Haas & Defago , 2005)

وان هذه البكتريا ذات قابلية على انتاج انواع عديدة من المضادات الحيوية والتي تثبط نمو المسببات المرضية البكتيرية والفطرية في الطبيعة فضلا عن قدرتها على تحفيز النبات عن طريق انتاج منظمات النمو التي لها الدور الفعال في تسريع نمو النباتات المعاملة بها (Haas & Keel , 2003) .

اما عن دورها الفعال في المكافحة الحيوية للمسببات المرضية فقد نفذت العديد من البحوث حول هذا المجال فمثلا اكدت Amara *et al*. (1996) ان معاملة نباتات الطماطة باللقاح البكتيري لهذه البكتريا قد قلل من نسبة موت البادرات المتسببة بفعل الفطر *R. solani* عن طريق انتاج البكتريا للمركبات الخالبة للحديد (Siderophores) حيث تعمل على امتصاص الحديد من بيئة الفطر والذي يعتبر المادة الاولية الضرورية لنموه لذلك تتسبب تلك البكتريا بفقدانه القدرة على النمو بسبب نقص الحديد .

اوضح (Hagedorn *et al*.(1993 ان استعمال عدة عزلات من هذه البكتريا سبب تثبيطا عاليا لنمو الفطر *Rhizoctonia solani* المسبب لموت بادرات القطن اذ لاحظ زيادة معنوية في النسبة المئوية لبزوغ البادرات سواء عن طريق معاملة التربة باللقاح او رشه على النبات . وفي دراسة اجراها Robert & Deborah (1998) وجد ان بكتريا *P. fluorescens* خفضت من شدة الاصابة بمرض الذبول الفيوزارمي على الطماطة المتسبب عن فعل الفطر *F. oxysporum* بمعدل 30 – 65 % .

بين جاسم (1999) ان لقاح البكتريا *P. fluorescens* اظهر كفاءة تثبيطية عالية لنمو الفطر

F.graminearum في الوسط الزرعي كما اوضحت التجربة الحقلية كفاءة معاملات البكتريا في خفض معدلات نسب الاصابة بالفطر ، اذ انخفضت معدلات نسبة الاصابة الى 4.8 % في حين ارتفعت تلك النسبة في معاملة المقارنة الى 20.67 % وكان للمعاملات تاثير معنوي في زيادة الانتاج .

4. النتائج والمناقشة

4 . 1. المعالجة الاحيائية لسم الأفلاتوكسين B_1

4 . 1. 1. اختبار قابلية عزلة الفطر *Aspergillus flavus* على انتاج الأفلاتوكسين B_1

أ – طريقة المعاملة بالأمونيا .

اظهرت نتائج هذا الاختبار قدرة عزلة الفطر *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين من خلال تغير لون قاعدة وسط PDA المنمى عليها الفطر *A. flavus* , حيث تغيرت لون قواعد المستعمرات من اللون الاخضر المصفر الى اللون الاحمر الغامق , وهذا يشير الى القدرة العالية للفطر على انتاج سم الافلاتوكسين , وهذا ما ذكره Satio & Machida (1999) اذ اوضحا ان درجة الاحمرار تعود الى الكميات المنتجة من الافلاتوكسين واللون الاحمر الغامق يدل على قدرتها على انتاج كميات اكبر من الافلاتوكسين مقارنة مع العزلات التي تكون لون قواعد مستعمراتها حمراء فاتحة او وردية (صورة 1) .

ونتيجة هذه الدراسة مقاربة لدراسة اخرى وجدت ان نسبة انتاج الافلاتوكسين من قبل عزلات الفطر *A. flavus* المعزولة من مكونات المكسرات كانت 59.1% (الخلف , 2011) .

واشار العبيدي (2011) الى ان نسبة انتاج عزلات الفطر *A. flavus* لسموم الأفلاتوكسينات كانت 93.33 % . بينما اشار الوائلي (2002) الى ان نسبة انتاج الافلاتوكسين من قبل الفطر *A. flavus* بلغت 52.63 %.

في حين بين الجنابي (2009) , ان عزلات الفطر *A.flavus* المنتجة للأفلاتوكسينات والمعزولة من بذور فستق الحقل بلغت نسبتها 30.8 % , ومن جانب اخر اوضح AL-Adil *et al.*,(1977) ان 59 % من عزلات الفطر *A. flavus* المعزولة من بعض الاغذية من مدينة بغداد قادرة على انتاج الافلاتوكسينات . وقد يرجع سبب قدرة العزلة على الانتاج الكبير لسموم الافلاتوكسينات الى القابلية الوراثية لهذه السلالة على انتاج تلك السموم , وذلك واضحا من خلال التغير في اللون الى الاحمر الغامق .

A – العزله بدون المعاملة بالامونيا B– العزلة المعاملة بالامونيا

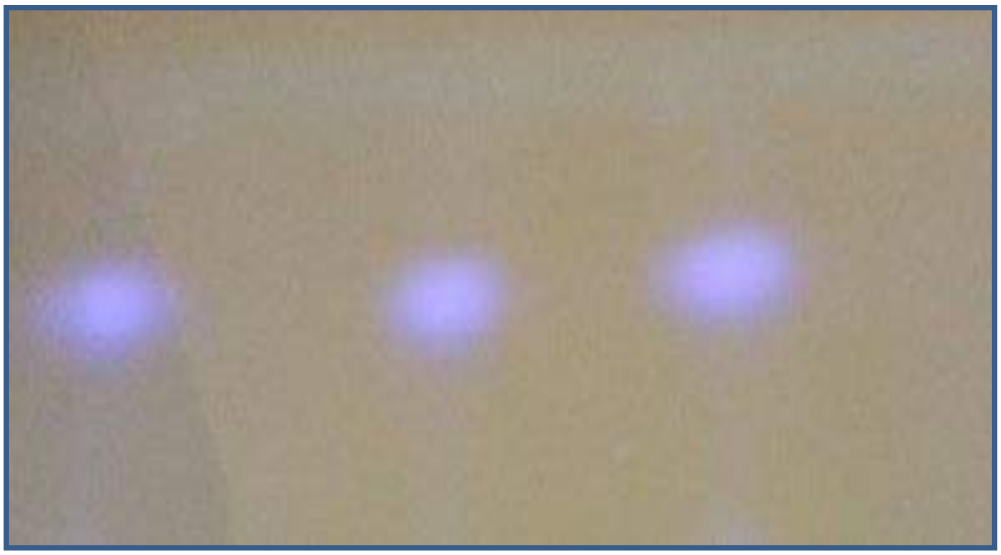
ب – استخدام تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة TLC

على ضوء نتائج الاختبار الاول (اختبار الامونيا) ولتاكيد قدرة العزلة على انتاج الافلاتوكسين B_1 والتي سبق وان اعطت نتيجة موجبة لاختبار الامونيا خضعت العزلة لاختبار اخر هو استخدام تقنية TLC للكشف عن السم واظهرت نتائج هذا الاختبار قابلية العزلة *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين وذلك من خلال مطابقة معامل الترحيل البالغ 0.56 ولون التالق لمستخلص عزلة الفطر مع السم القياسي للافلاتوكسين B_1 . (صورة 2) .

وهذه النتائج كانت مقاربة الى حد ما مع نتائج دراسات اخرى , حيث اشارت الساعدي (2012) الى ان اعلى نسبة من عزلات الفطريات المنتجة للافلاتوكسين باستخدام تقنية TLC كانت لفطر *A. flavus* حيث بلغت النسبة 100 % .

وبين العبيدي (2011) ان اربعة عزلات من فطر *A. flavus* كانت منتجة للافلاتوكسين B_1 . كما تتماشى هذه النتيجة ايضا" مع ما توصلت اليه الجبوري (2012) حيث بينت ان 40 عزلة من مجموع 48 عزلة لفطر *A. flavus* قادرة على انتاج الافلاتوكسين وبنسبة 83.3 % .

وهذه النتائج تقارب ما اشارت اليه احدى الدراسات من قدرة 75% من عزلات فطر *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين B_1 . (Yu *et al.*,2004)



صورة (2) استخدام تقنية TLC في الكشف عن قدرة الفطر *A. flavus* على انتاج سم AFB1

a - السم القياسي الافلاتوكسين

4. 1 . 2 . التشخيص الاولي لعزلات البكتريا المعزولة من الحليب واللبن .

تم الحصول على خمسة عزلات بكتيرية من الحليب واللبن وتم تشخيصها على انها عائدة الى جنسين , ثلاث عزلات تعود لجنس *Lactococcus* , وعلمت بـ Lt_1 , Lt_2 , Lt_3 وعزلتين عائدة لجنس *Streptococcus* وعلمت St_1 , St_2 .

4. 1. 2. 1. الصفات المظهرية والمجهرية للعزلات البكتيرية على الاوساط الزرعية .

امتازت مستعمرات بكتريا *Lactococcus* على وسط MRS الصلب بكونها دائرية الشكل صغيرة الحجم ناعمة ولماعة , اما لونها فكانت بعض المستعمرات بيضاء فيما كانت المستعمرات الاخرى كريمية اللون . اما مستعمرات بكتريا *Streptococcus* فكانت مسطحة . اما ما يخص الفحص المجهري فقد بينت نتائج الفحص لخلايا العزلات البكتيرية العائدة لجنس *Lactococcus* والمثبتة على شرائح زجاجية والمصبغة بصبغة كرام , ان الخلايا كروية الشكل مرتبة بشكل ازواج وبعضها تظهر ثلاثية , موجبة لصبغ كرام غير مكونه للسبورات وغير متحركة . اما جنس *Streptococcus* كانت كروية الشكل وبعضها بيضوي تظهر بشكل سلاسل طويلة وقصيرة موجبة لصبغة كرام غير مكونه للسبورات (Krig & Holt , 1984) .

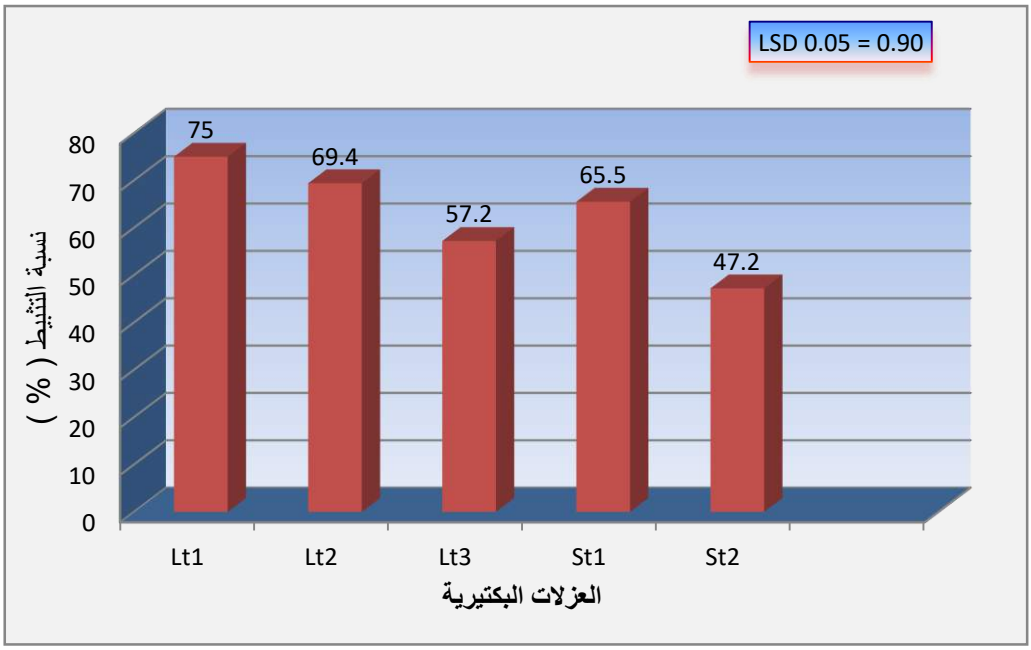
4. 1. 2. 2. اختبار الفعالية التضادية لعزلات البكتريا المعزولة ضد فطر *A. flavus*

اظهر الشكل (1) تفوق العزلة Lt_1 بفارق معنوي في الكفاءة التثبيطية للفطر ***A. flavus*** حيث بلغت نسبة التثبيط 75% تلاها العزلة Lt_2 و Lt_3 التي تراوحت نسبة التثبيط فيها بين (69.4 – 57.2) % , بينما بلغت نسب التثبيط لعزلتين St_1, St_2 هو 65.5% و 47.2 % .

وهذه النتائج مقاربة لما توصلت اليه عدد من دراسات اذ بينت فيها اهمية بكتريا حامض اللاكتيك ودورها في تثبيط بعض انواع الفطريات المنتجة للسموم , ففي احدى الدراسات تم اختبار قدرة ستة عزلات من بكتريا حامض اللاكتيك على تثبيط نمو الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* وتوصلت الدراسة الى ان بكتريا *Lactococcus* spp.RS3 كانت لها القدرة على اختزال اقطار نمو الفطر *A. parasiticus* AF7 الى 14 ملم في حين كان معدل اقطار مستعمرات نفس القطر في معاملة السيطرة 90 ملم , بينما كانت غير قادرة على تثبيط الفطر *A. flavus* اما بكتريا *Lactobacillus fermentum RS2* و *Lb. plantarum* و *Lb.fermentumOYB* و *Lb. plantarumOY* و *Lb. previsWS3* فكان لكلا" منها القدرة في تثبيط نمو سلالات مختلفة من الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* . (Onilude *et al*., 2005) .

وقد اثبت El-Sanhoty (2008) اثناء دراسته حول قابلية 14 سلالة من بكتريا حامض اللاكتيك في منع نمو الفطريات الاكثر شيوعا المسببة لتلف الاغذية وخاصة المنتجة للافلاتوكسينات ان 12 سلالة منها كان لها تاثير كابح لنمو الفطريات في حين اثنين فقط لم يكن لديها اي نشاط تثبيطي ضد نموالفطريات ومنها الفطر *A. parasiticus* المنتج لسم B و G وكانت اعلى نسبة تثبيط للفطر بفعل بكتريا *Lb. plantarum* و *L. acidophiliusATCC* .

ونتائج هذه الدراسة جاءت مطابقة لما توصل اليه (1996) Roy *et al*. اذ اثبتت دراسته امتلاك بكتريا *Lactococcus lactis* فعالية تثبيطية لفطر *A.flavus*IARI والفطر *A. parasiticus*NCIM898 .



شكل (1) الفعالية التضادية لبعض العزلات البكتيرية المعزولة من الحليب واللبن ضد الفطر *A. flavus*

4. 1. 2. 3. اختبار قدرة العزلة الاكفأ في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 (خارجيا") باستعمال تقنية TLC

اثبتت نتائج اختبار كفاءة العزلة Lt_1 العائدة لجنس *Lactococcus* في اختزال فعالية سم B_1 بطريقة الاختبار الخارجي باستعمال تقنية TLC وذلك من خلال الاعتماد على درجة التالق اللوني للمادة السامة حيث بينت النتائج انخفاض نسبة التالق اللوني للمادة السامة المعاملة بالبكتريا Lt_1 مقارنة مع درجة التالق

اللوني للمادة السامة القياسية , ولم تظهر بقية العزلات البكتيرية القدرة في اختزال السمية , وعلى اساس ذلك تم اختيار عزلة Lt_1 على انها العزلة الاكفأ في تحطيم سم B_1 .

وجاءت هذه النتيجة مقاربة لما توصل الية Sezer *et al.*(2013) حيث اثبت كفاءة بكتريا *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus plantarum* في اختزال او ازالة سمية الافلاتوكسين B_1 في الاوساط السائلة وبنسبة 27 – 46 % على التوالي وقد تم الكشف عنها باستخدام تقنية ELISA test .ونتائج هذا الاختبار مقاربة لما توصل اليه Fuchs *et al.*(2008) من امتلاك سلالات مختلفة من بكتريا Lactic acid الفعالية على اختزال سمية السموم الفطرية Ochratoxin A و Patuin بواسطة استخدام تقنية HPLC الى جانب الكشف بالاشعة فوق البنفسجية حيث لوحظ الاختزال بنسبة 95% من سم OTA ونسبة 80% من سم PTA بواسطة هذا النوع من البكتريا . وكانت نتيجة هذه الدراسة مقاربة ايضا لدراسة اخرى حول قدرة بكتريا Lactic acid في ازالة سمية الافلاتوكسين B_1 حيث اثبتت الدراسة قدرة بكتريا

L. rhamnosus سلالة LC-705 على اختزال سمية B_1 بشكل سريع جدا بنسبة 80% خلال ساعة واحدة وتم الكشف عن ذلك بتقنية HPLC (AL-Nezami *et al.*, 1998) .

وتقاربت هذه النتيجة ايضا مع احدى الدراسات التي بحثت في قدرة ثمانية سلالات من بكتريا *Lactobacillus casei* على تحلل سم الافلاتوكسين B_1 في الاوساط السائلة حيث اعطت تلك السلالات درجات متفاوتة من التحلل لسم B_1 وكان اعلى نسبة تحلل للسم بفعل عزلة *Lactobacillus casei L30* وبنسبة 49.2 % .(Hernandez-Mendeeza *et al.*, 2009)

كذلك جاءت النتائج مقاربة لما توصلت اليه احدى الدراسات حول قدرة بعض عزلات بكتريا Lactic acid على ازالة سمية الافلاتوكسين المنتجة من قبل الفطر *A. flavus* و *A. parasiticius* و *A. nomius* بتراكيز مختلفة للسم تراواحت بين 50 - 500 نانوغرام لوثت بها حبوب الذرة , حيث اثبتت خمسة عزلات بكتيرية قدرتها على اختزال تركيز المادة السامة 50 نانوغرام بنسبة 44.5 % بينما الحبوب الملوثة بتراكيز 500 نانوغرام كانت نسبة الاختزال اقل اذ بلغت 29.9 % . (Zinedine *et al.*, 2005) .

وقد لاحظت الساعدي (2012) ان بكتريا *Bacillus subtilis* كانت فعالة في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 اذ بلغت نسبة التحطيم 90% .

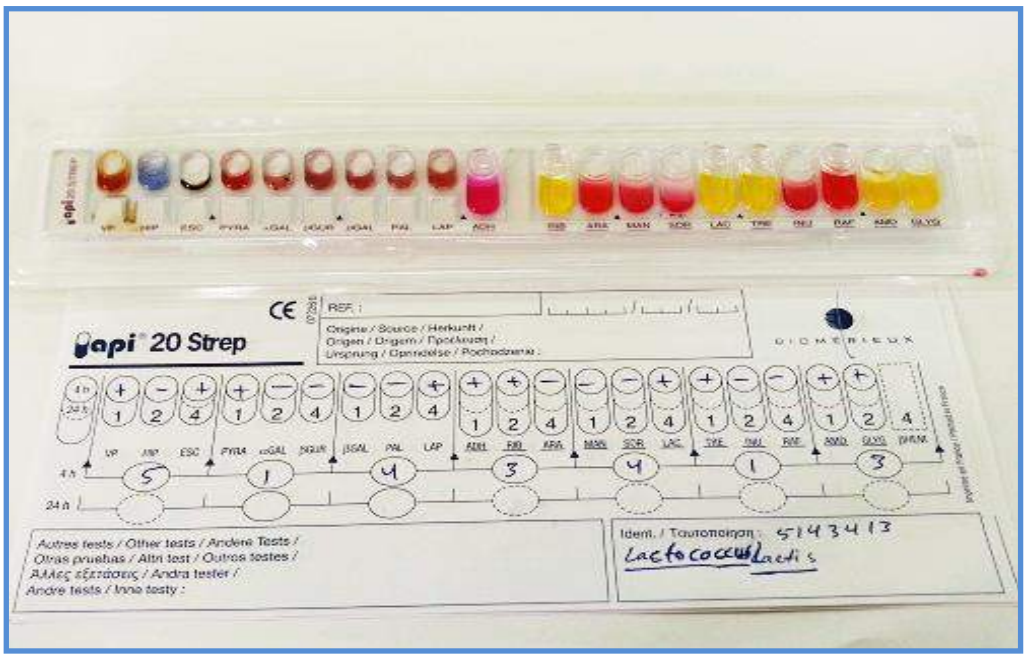
ان اليات التحطيم للسموم الفطرية بفعل الاحياء الدقيقة منها التقيد (الربط) اذ تمتلك عدة سلالات من البكتريا القدرة على ربط المادة السامة في الجدار الخلوي او تحطيمها بفعل الانزيمات المحللة والتي تفرزها بعض السلالات البكتيرية والفطرية , وبالتالي ازالة اثارها السامة (الجميلي , 2014) .

4. 1. 2. 4. الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا الاكفأ في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1

بعد اجراء عملية الفحص المجهري لعزلة البكتريا Lt1 العائدة لجنس *Lactococcus* . تم اجراء فحص الكاتليز و الاوكسيديز لتلك العزلة البكتيرية وكانت النتيجة سالبة لكلا الاختبارين .

4. 1. 2. 5. التشخيص التأكيدي لعزلة البكتريا *Lactococcus lactis*

اجراء تشخيص تأكيدي للعزلة باستخدام اختبار Epi20 وكذلك اختبار Vitic وكلا الاختبارين اكدت على ان العزلة هي *Lactococcus lactis* . (صورة 3) .



صورة (3) نتيجة اختبار Epi20 لبكتريا *Lactococcus lactis*

4. 1. 2. 6. اختبار الفعالية السمية لسم AFB_1 والمعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* الاكفأ في تحطيمه في حيوانات الجرذ الابيض

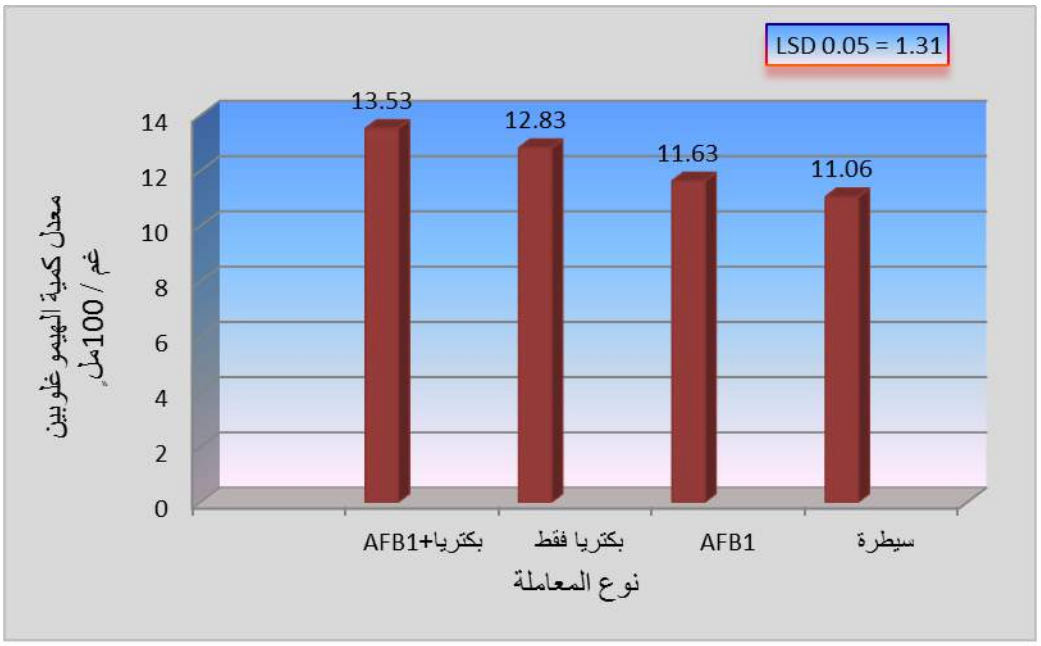
4. 1. 2. 6. 1. الفحوصات الفسلجية لبعض معايير الدم

1- كمية الهيموغلوبين

تشير نتائج التحليل الاحصائي في الشكل (2) عدم وجود تاثير معنوي ($p \leq 0.05$) في معيار كمية الهيموغلوبين بالنسبة لحيوانات المعاملة بالافلاتوكسين فقط فقد بلغت الكمية 11.63 غم/100مل مقارنة بالسيطرة والبالغة 11.06 غم / 100مل , بينما كانت النتائج في المعاملة المتمثلة بالبكتريا *Lactococcus* مع الافلاتوكسين B_1 ذات تاثير معنويا" , حيث بلغت 13.53غم /100مل مقارنة بالمعاملة المتمثلة بالافلاتوكسين فقط كذلك مع معاملة السيطرة , بالاضافة الى الفروق المعنوية التي تمثلت بارتفاع كمية الهيموغلوبين الى 12.83غم /100مل لمعاملة البكتريا فقط مقارنة بالسيطرة .

قد يعود سبب قدرة البكتريا *Lactococcus* على رفع كمية الهيموغلوبين عن معدلها في معاملة الافلاتوكسين B_1 الى قدرة البكتريا على تحطيم الافلاتوكسين وهذا ما اشارت اليه نتائج الاختبار المبين في الفقرة (4. 1. 2. 3.) ونواتج التحطيم ربما استغلت كمصدر غذائي من قبل الحيوان وبالتالي زادت الفعاليات الحيوية الخاصة بتصنيع كريات الدم الحمر وهذا ما اكده اختبار حساب اعداد خلايا الدم الحمر

والموضح في الفقرة (2) وهذا بدوره انعكس ايجابيا" على زيادة معدلات كمية الهيموغلوبين , علما" ان الافلاتوكسين B_1 هو عبارة عن Polyketides يخلق خلال المسار الايضي Polyketide pathway وسموم الافلاتوكسينات غنية بعنصر الكاربون وبالتالي قد تكون مصدر للكاربون للحيوانات المعاملة به . (Bennett & Christensen, 1983) .

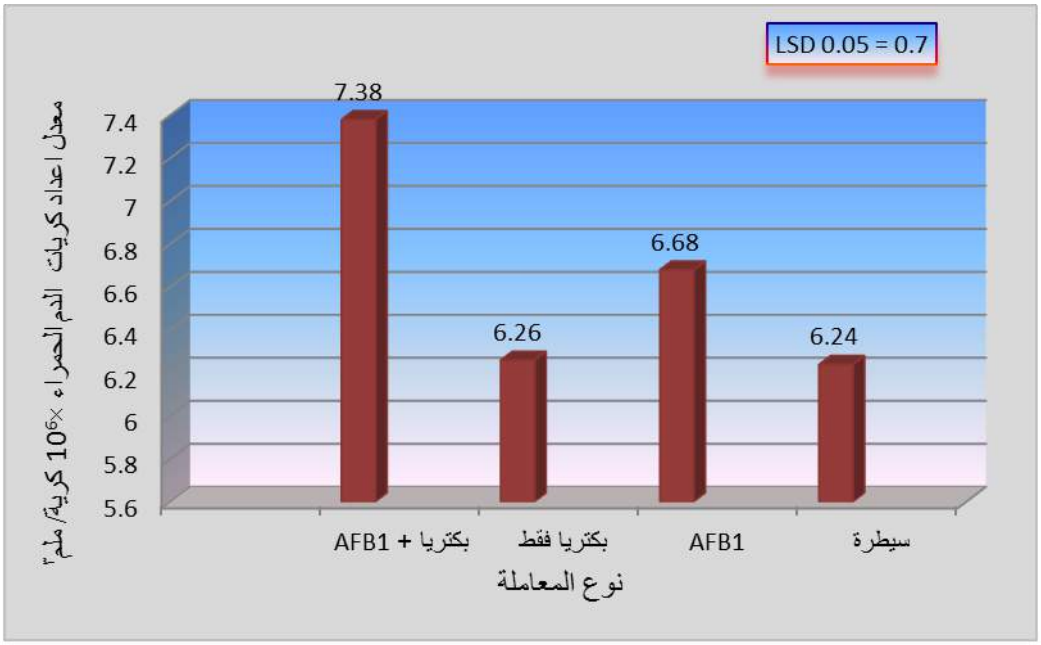


شكل (2) تاثير سم الافلاتوكسين B1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل كمية الهيموغلوبين لذكور الجرذ الابيض .

2- اعداد كريات الدم الحمراء .

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة بالشكل (3) ان المعاملة المتمثلة بالبكتريا مع سم الافلاتوكسين B_1 سببت ارتفاع في معدل اعداد خلايا الدم الحمراء حيث بلغت 7.38×10^6كرية / ملم^3

مقارنة مع معاملة الأفلاتوكسين فقط والبالغة 6.68 × 10^6 كرية / ملم^3 وكان الارتفاع بفارق معنوي .
اما تعليل اسباب الزيادة في معاملة البكتريا مع سم AFB1 فقد تم الاشارة اليها في الفقرة السابقة .



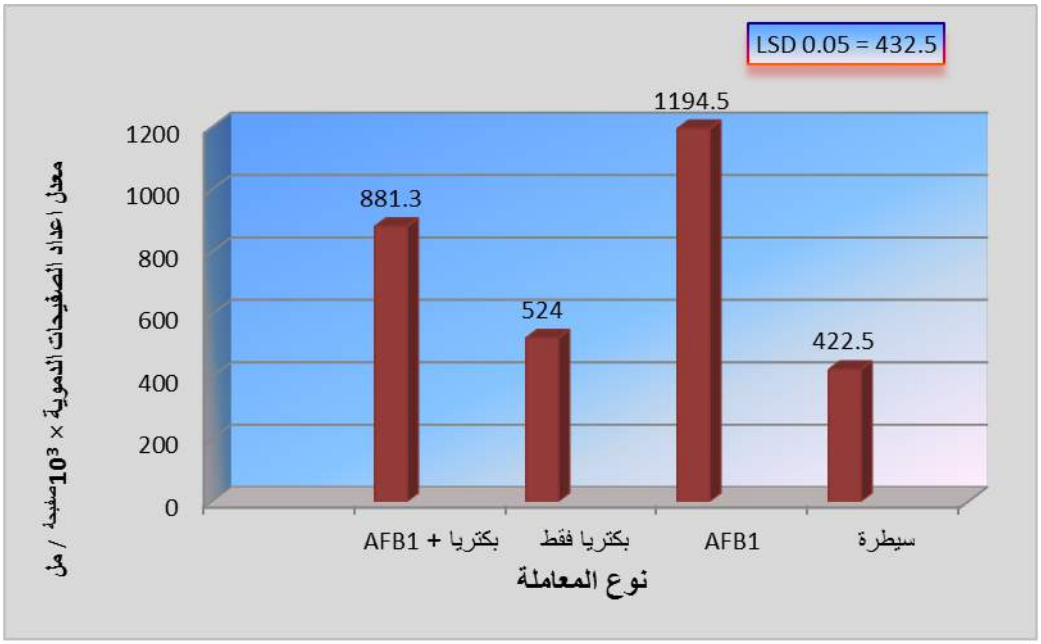
شكل (3) تأثير سم الأفلاتوكسين B_1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الابيض .

3- اعداد الصفيحات الدموية .

بينت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة في الشكل (4) التاثير المعنوي ($P \leq 0.05$) لسم الافلاتوكسين B_1 في زيادة اعداد الصفيحات الدموية لحيوانات الجرذ الابيض اذ بلغت 1194.5 × 10^3 صفيحة/ مل مقارنة بمعاملة السيطرة (المجرعة بمادة DMSO- Dimethyl sulfoxid فقط) والتي بلغت 422.5 × 10^3 صفيحة/مل بينما كان لعالق البكتريا فعالية في اختزال تاثير سم الافلاتوكسين B_1 اذ خفض معدل اعداد الصفيحات الدموية ولكن بفارق غير معنوي .

وكانت النتيجة مقاربة لما توصل اليه Samuel *et al.*(2009) اذ بينت نتائج دراسته زيادة معنوية في معدل اعداد الصفيحات الدموية في دم الدجاج المعامل بسم الأفلاتوكسين B_1 بتركيز 50 – 100 ppm اذ بلغ اعدادها 135000 – 138000 صفيحة/ملم^3 على التوالي بينما في معاملة السيطرة كانت 22.5 × 10^3 صفيحة / مل .

قد يعود سبب زيادة اعداد الصفيحات الدموية عن حدودها الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 الى الفعالية السمية لهذا المركب والذي قد يؤثر بصورة مباشرة او غير مباشرة على مصادر تخليق الصفيحات الدموية . اذ ان الأفلاتوكسينات تؤثر سلبا" على معظم معايير الدم الفسلجية والكيموحيوية (Halliwell , 2007) . وقد يعود سبب الزيادة ايضا" الى حالات النزف التي تحدث في الانسجة بسبب تأثير السم وذلك يعتبر احد المحفزات على زيادة اعداد الصفيحات الدموية .



شكل (4) تأثير سم الأفلاتوكسين B_1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الابيض .

4- معدل اعداد الخلايا اللمفية .

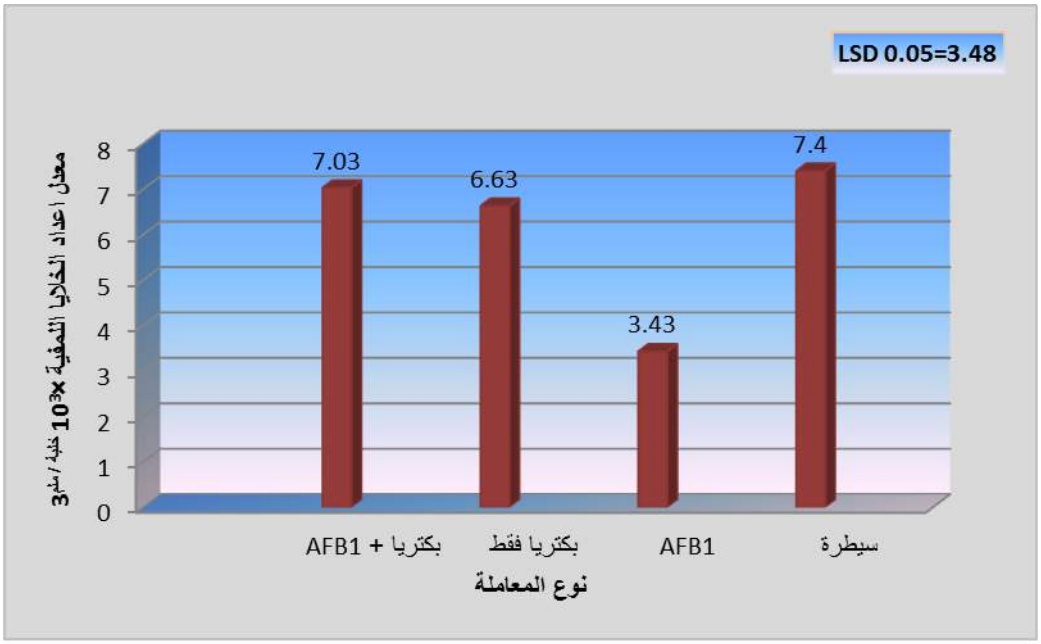
احدث سم الافلاتوكسين B_1 انخفاضا" معنويا" في معدل اعداد الخلايا اللمفية دون الحد الطبيعي اذ بلغت 3.43×10^3 خلية/ملم^3 مقارنة مع السيطرة والبالغة 7.4×10^3 خلية /ملم^3 بالاضافة الى الفرق المعنوي بين اعدادخلايا هذه المعاملة وبين اعدادها في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1والمعالجة احيائيا" ببكتريا *Lactococcus* والبالغة 7.03×10^3 خلية /ملم^3 . (شكل 5) .

وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه Mehmet *et al*.(2010) حول النقص المعنوي في معدل النسبة المئوية للخلايا اللمفية عند الجرعة العالية للسم AFB_1 المعاملة بها حيوانات الجرذ الابيض حيث بلغت في معاملة السيطرة 71.71 % بينما في معاملة الافلاتوكسين 57.42 % عند جرعة ppb1600 .

كذلك جاءت النتائج مقاربة مع دراسة اخرى اوضحت النقص الحاصل في معدل خلايا الدم البيضاء والخلايا اللمفية وبفارق معنوي ($p \leq 0.05$) مع معاملة السيطرة عند معاملة الدجاج بسم الأفلاتوكسين بجرعة 50 – 100 ppb اذ بلغ اعداد الخلايا اللمفية 10.327 خلية/ملم^3 عند الجرعة ppb50 و 10.09خلية/ملم^3 عند جرعة ppb100 بينما كانت في معاملة السيطرة 11778×10^3 خلية / ملم^3 (Samuel *et al*., 2009) .

ويعود سبب الانخفاض في الخلايا اللمفية الى الضرر التأكسدي لسم الافلاتوكسين الذي يحدث للخلايا اللمفية والذي يسبب الانخفاض الكبير في نسب الخلايا اللمفية في الدم المحيطي (Tuzcu , 2010) .

وتسبب عملية التسمم بالافلاتوكسينات بما يعرف Lymphocytopenia و Monocytopenia و والزيادة في معدل اعداد خلايا neutrophil (Donmez *et al*., 2012) .



شكل (5) تأثير سم الأفلاتوكسين B_1 المعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* في معدل اعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الابيض .

4. 1. 2. 6. 2. الفحوصات النسجية .

اظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذه من كلى واكباد والامعاء الدقيقة والطحال لذكور الجرذان التي تم معاملتها بسم الافلاتوكسين B_1 وجود تغيرات واضحة في انسجة تلك الاعضاء وتاثيرات مرضية شديدة في كلا" منها , فقد ظهر في الكلى حالة الضمور (atrophy) للكبيبة مع تضخم في جدارها واحتقان وعائي Vasculer congestion بالاضافة الى النزف الدموي (Hemorrhage) وحالة موت الخلايا (التنخر Nicrosis) للكبيبة والانابيب الكلوية . (صورة 4- B_1, B_2) , فضلا" عن التغيرات في نسيج الكبد التي تمثلت بتوسع الاوعية الدموية وحالة النزف الدموي بالاضافة الى التنخر في بعض الخلايا والاحتقان الوعائي مع التجمع البؤري للخلايا الالتهابية Focal aggregate inflammatory cells), (صورة 5 – B_1, B_2) . اما المقاطع الماخوذة من الامعاء الدقيقة فتمثلت التغيرات المرضية بحالة التحلل والتغيرات التنخرية الجزيئية للزغابات (Partial necrotic changes of villi). (صورة 6 – B1, B2) اضافة الى حالة التنخر في الفص الابيض

والفص الاحمر للطحال مع الاحتقان الوعائي والتحلل في الخلايا . (صورة 7- B_1,B_2) مع مقارنة هذه الحالات بمعاملة السيطرة . اما الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين والمعامل مسبقا" ببكتريا *Lactococcus* , والحيوانات المعاملة بالعالق البكتيري فقط فلم تظهر اي اعراض مرضية في المقاطع النسيجية لكل من الكلى والكبد والامعاء الدقيقة والطحال . (صورة 4- 5- 6- 7, C) .

وهذا يقارب ما توصلت إليه الخلف (2011) حيث أوضحت نتائج الفحص المجهري لمعاملة سم الافلاتوكسين B_1 وجود تغيرات مرضية في أنسجة أعضاء الكبد والكلى والأمعاء والطحال لذكور الجرذ الأبيض ففي الكبد ظهر توسع في الوريد المركزي فضلا عن احتقان ونزيف في كل من الشرايين والأوردة الكبدية وفي الكلية فقد ظهر التهاب الكبيبات واحتقان الضفيرة الشعرية للكبيبة مع تنخر(Necrosis) فضلا عن حدوث نزيف دموي في الأوعية الدموية الكلوية ,واما التغيرات النسيجية للامعاء الدقيقة فقد ظهر فيها سقوط الزغابات وتحللها مع تجمع بؤري لخلايا التهابية , كذلك وجدت الحدراوي (2011) في نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من أكباد وكلى وأمعاء الجرذان التي تم معاملتها بالراشح الفطري للفطر*Bipolaris holmii* حدوث تغييرات مرضية واضحة في انسجة الكبد تمثلت بتجمع بؤري لخلايا التهابية وكذلك ظهور تنخر في الكبد, وأما التغييرات النسيجية في الأمعاء فقد أظهرت النتائج وجود تأثيرات واضحة فيها تمثلت بانسلاخ الغشاء المعوي وتقزم الزغابات واحتقان الأوعية الدموية في الغشاء المخاطي للامعاء , فضلا عن حصول تجمع بؤري لخلايا التهابية داخل الزغابات ,أما في الكلى فأظهرت نتائج نفس الدراسة وجود تضخم جدار الكبيبة رافقه نزف دموي في نسيج الكلية.

وجدت الجنابي (2009)أن أكباد وأمعاء الحيوانات (ذكور الجرذ الأبيض)المعاملة بعزلة الفطر *A.flavus* المنتجة للأفلاتوكسينات وجود تغييرات مرضية فيها تمثلت بظهور احتقان وعائي مع وجود تجمع بؤري لخلايا التهابية في أكباد الحيوانات وفي الأمعاء حصل انتفاخ واضح في الزغابات مع انسلاخ وسقوط بعض الزغابات إضافة إلى وجود خلايا التهابية وحيدة النواة وتقرح في بطانة الأمعاء الدقيقة . أما الخالدي (2010) فذكرت أن أكباد وكلى الحيوانات المعاملة بعصير ثمار الطماطة المصابة بالفطرين *Geotrichum candidum* و*G.penicillatum* تسبب في إحداث تأثيرات على الأمعاء الدقيقة تمثلت بانكماش الزغابات وانتفاخ خلاياها وتحللها وزيادة الخلايا الالتهابية وظهور الخلايا المتحللة وتقزم الزغابات ,أما الكبد فقد ظهر فيه احتقان الخلايا حول الأوردة الكبدية وتكوين جسور تنخرية في نسيج الكبد وارتشاح الخلايا الالتهابية إلى داخل الوريد المركزي مع احتقان وعائي واضح ونزف دموي ,أما الكلى فقد ظهر ضمور الكبيبات واحتقان الأوعية الدموية وحصول نزف دموي وتضخم جدار الكبيبة

.وقد تعزى تلك التغيرات المرضية في هذه الدراسة إلى سموم الافلاتوكسينات كونها تؤثر على الغشاء البلازمي إذ تؤدي إلى فقدان الأغشية خاصية النفاذية الاختيارية للغشاء وهذا يعلل سبب نضوح الماء من داخل خلايا الكبد وانحلالها وهذا ما ذكره كلٌّ من Eaton and Gallagher (1994) ، وأشار Richardson *et al.*(1987) إلى حدوث انحلال في النسيج البرنكيمي للكبد نتيجة التعرض لسموم الافلاتوكسينات ، وذكرت بعض الدراسات إلى أن السموم الفطرية تعمل على تخريب الطبقة المخاطية (Mucosal layer) في المعدة والقناة الهضمية مما يؤدي إلى حدوث تغيرات في محتويات الدهون بفعل الانزيم المحلل للدهون (Lipase) (Chiou *et al.,*2001) .

كذلك اثبتت دراسة قام بها حمودي والدوري (2001) إن إعطاء علائق ملوثة بالافلاتوكسينات للدجاج وبنسب متزايدة أدى إلى حصول زيادة في معدلات أوزان الاعضاء الداخلية (الطحال ، القلب ، المعدة والقانصة) ، لكن هذه الزيادة كانت واضحة في وزن الكبد كونه اسرع الأجزاء تاثراً بالسموم الفطرية وأن الافلاتوكسينات قد تحدث تغيرات شديدة في المادة الكروماتينية وتسبب زيادة غير طبيعية في حجم النوية يصحبها احتقان وعائي للنسيج البرنكيمي للكبد ، وكذلك تأثيرات على نسيج الكلية لدى الفئران البيض (الجميلي و أبو شبع ، 2005) ، فضلاً عن تأثيراتها السمية على الجينات والاستنساخ وبناء الأحماض الأمينية وبالتالي تثبيط عملية تصنيع البروتين (Martello ,2006) .

و ربما تعود هذه التأثيرات إلى ان تلك المركبات السامة للفطريات لها تأثير على لبيدات الغشاء البلازمي إذ تؤدي إلى فقدان الغشاء وبالتالي إلى تحلل الخلية (Cell lysis) وحدوث التنخر ,وأشار (2005) Papiya إلى أن النواتج الايضية للفطر *A.flavus* أدت إلى حدوث احتقان وعائي في الكبد.

وقد يعزى الضرر النسيجي الحاصل في الأمعاء إلى قدرة المركبات الايضية الثانوية على تحطيم النسيج المعوي ، أو تكون هذه المركبات لها القدرة على التفاعل مع الحوامض الموجودة في الأمعاء لتكوين مركبات حامضية أخرى مثل حامض الفينوليك (Phenolic acid) الذي يملك القدرة على الاختراق السريع للقناة الهضمية مسبباً لها التلف أو ان هذه المنتجات تتسبب في تثبيط عمل نظام الانزيمات مما يؤدي إلى حدوث تحطم في بطانة الأمعاء (Susheela *etal.*, 1992) .

أما التأثيرات التي تحدثها المنتجات الايضية للفطريات في الكلى فيعود إلى دور هذه المركبات في احداث الالتهاب فيها وأكسدة الدهون في الأغشية الخلوية ولهذا تزداد نضوحية العناصر المكونة لبلازما الدم مما يؤدي إلى حدوث انكماش الكبيبات وموت الخلايا . (Luty *et al.*,2001) .

وهذه النتـائج تماثـل مـا توصـلت إليـه الربيعـي (2007) عنـد معاملـة حيوانـات الجـرذ الأبـيض برواشـح الفطرين *P. digitatum* و *P. italicum* .

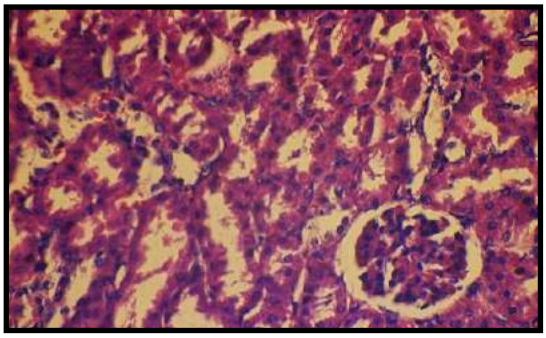
اشار Verma,(2004) إلى ان النواتج الايضية للفطر *A.flavus* أدت إلى حدوث تضخم واضح في النبيبات الكلوية كذلك حصول نزف واضح فيها.

لاحظ (2003) Mello *et al.* وجود مناطق انحلالية في كبد الجرذان المعاملة بـ 0.3 جزء بالمليون من الأفلاتوكسين وحصول انفصال في ا لخلايا الكبدية عن بعضها وفقدان وظائفها .

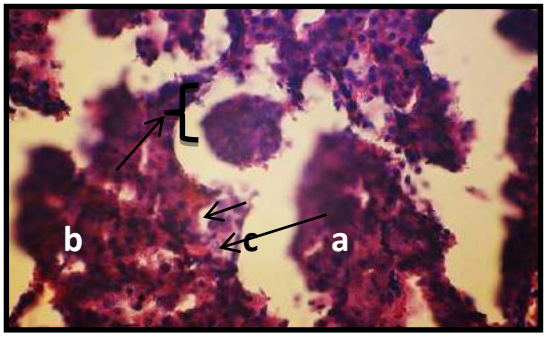
وقد يعود سبب ذلك الى تأثير تلك السموم في ايض الكربوهيدرات في الكبد اذ يعمل على زيادة الكلايكوجين في الكبد وهو بدوره يعطل وظيفة الكبد عند تجمعه وقلة استعماله .(Chinoy *et al.*, 1991) .

اما تعليل النزف الدموي في الانسجة فيعود لنزف الاوعية الدموية , وخروج الخلايا المكونة للدم الى الانسجة بعملية النضح وبعد خروج هذه الخلايا تعطي الصفة السائدة للالتهاب (MacSween & Whaley , 1992) .

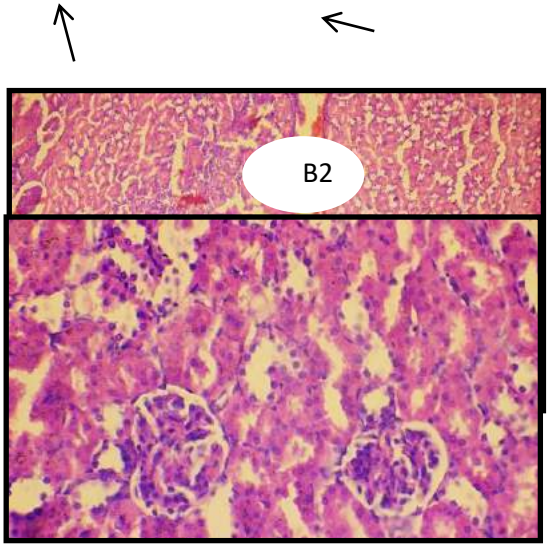
وفيما يخص التنخر فيكون سببه تأثير هذه المركبات في الغشاء الخلوي لخلايا الانسجة مما يؤدي الى تلفها وزيادة نضوحية الغشاء (Coles , 1990) . واظهرت البكتريا *Lactococcus* الاكفأ في تحطيم الأفلاتوكسين B_1 فعالية عالية في حماية انسجة اعضاء كل من الكبد والكلى والامعاء الدقيقة والطحال من التأثيرات السامة للأفلاتوكسين B_1 حيث ظهرت المقاطع النسيجية لاعضاء الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 والمعالج احيائيا" بالبكتريا *Lactococcus* خالية من اي اعراض مرضية مشابهة في ذلك معاملة السيطرة , وهذا يعود ربما الى قدرة البكتريا على اختزال سمية المادة السامة بدرجة كبيرة وهذا ما يؤكد سلامة الاعضاء المدروسة واضرار هذا السم .



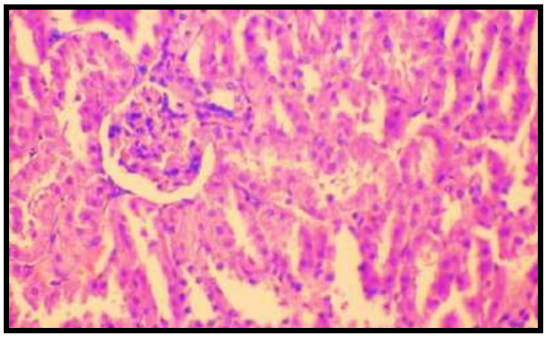
A



B1



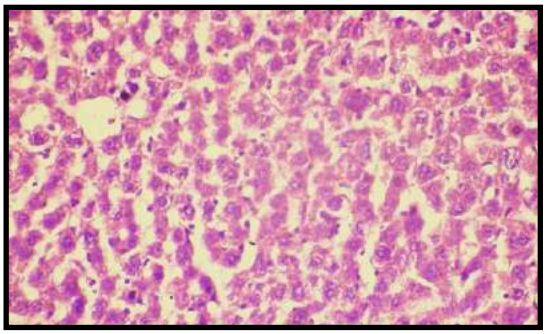
D



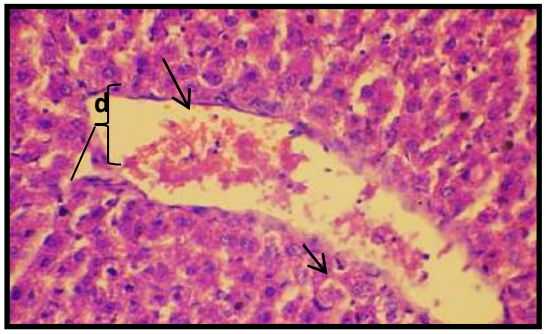
C

صورة (4) مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A)
معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين B_1فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L.*
***lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط**

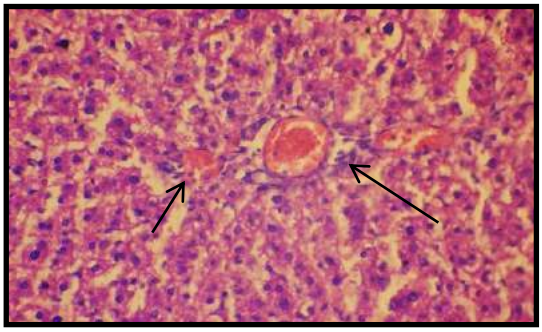
(قوة تكبير 10 و 40 X)



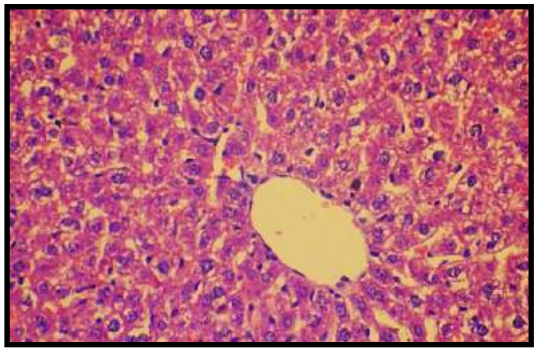
A



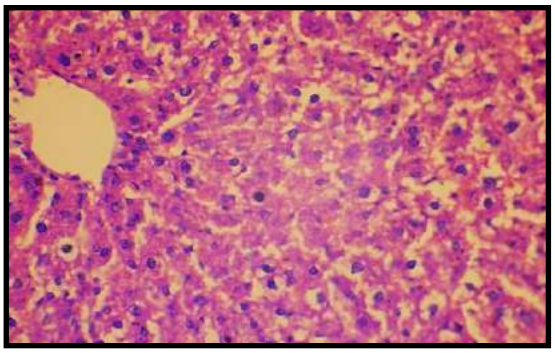
B2



B1



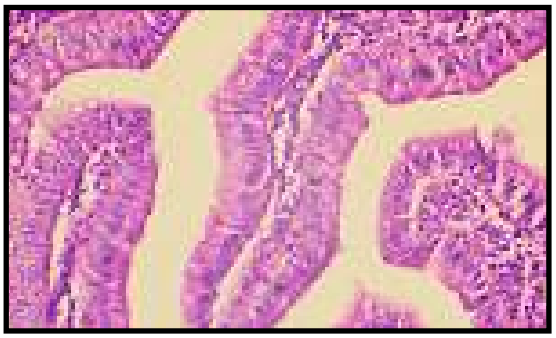
D



C

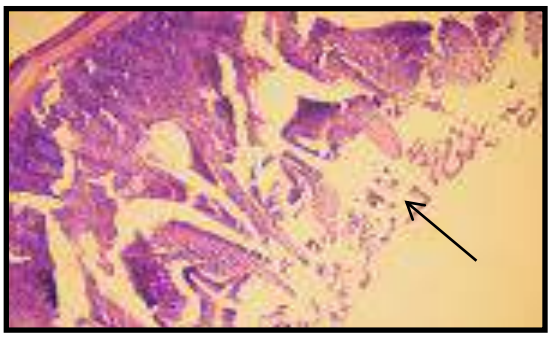
صورة (5) مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط

(قوة تكبير 40 X)

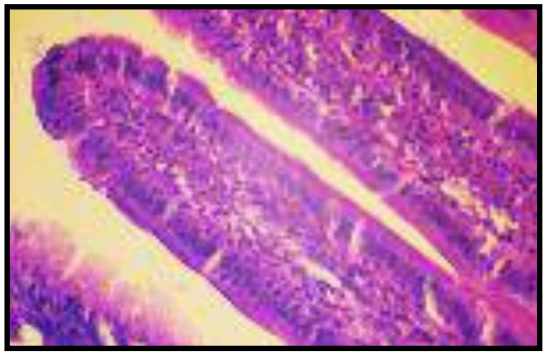


A

B1



B2

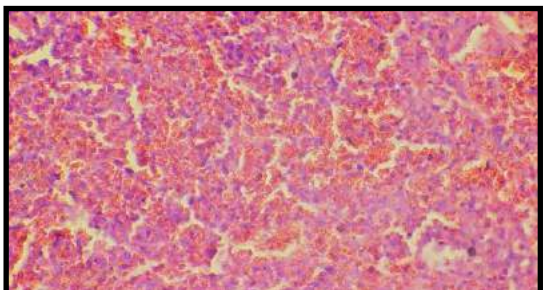


C

D

صورة (6) مقطع نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة معاملة السم بالبكتريا مسبقا" خارجيا *invitro* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا *L. lactis* فقط .

(قوة تكبير 10 و 40 X) .



4. 1. 2. 7. تأثير الملوحة ودرجة الحموضة في نمو بكتريا *Lactococcus lactis*

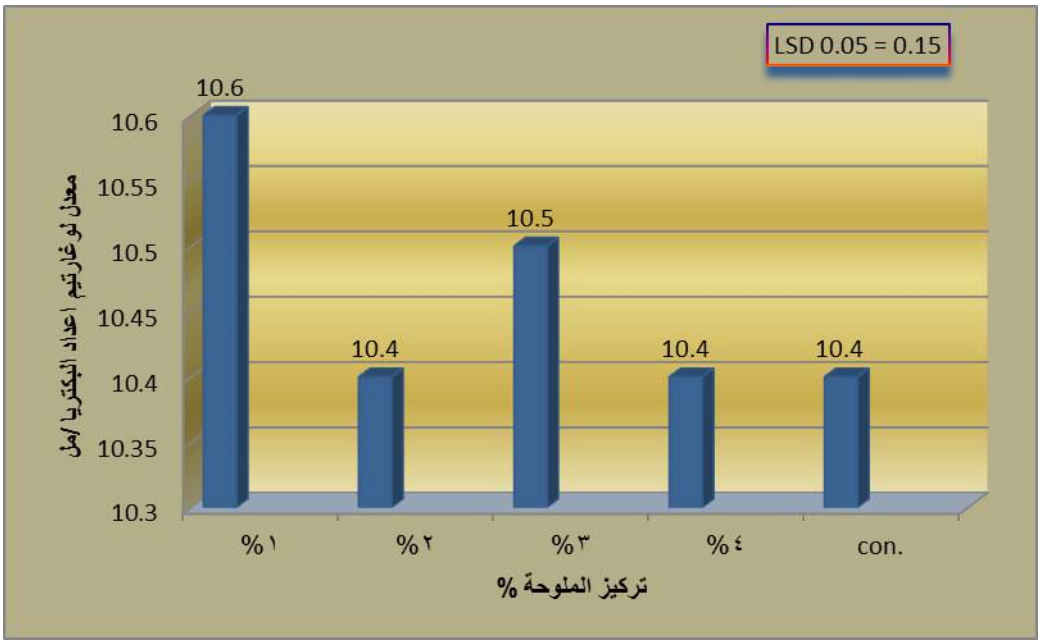
أ – الملوحة .

بينت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة في الشكل (6) قابلية بكتريا *Lactococcus lactis* المنماة على وسط MRS والمحضنة بدرجة حرارة 37م° على النمو في جميع تراكيز NaCL المحضرة والمستخدمة في هذا الاختبار وبفارق معنوي ($P \leq 0.05$) مع معاملة السيطرة اذ بلغ معدل لوغاريتم

اعداد الخلايا البكتيرية في تركيز (1%) 10.6 خلية /مل , بينما في اعلى تركيز (4%) بلغ المعدل 10.4 خلية/مل وهذا مطابق لمعاملة السيطرة والبالغ فيها معدل لوغارتيم الخلايا 10.4 خلية/ مل .(شكل 5) .

وهذا مطابق لما توصل اليه Spicher & Schroeder(2000) , اذ بين ان بكتريا حامض اللبنيك تنمو في وسط نسبة الملوحة فيه تتراوح بين 4 – 6 % NaCl .

كذلك كانت النتيجة مقاربة لدراسة اخرى اثبت فيها ان تركيز ملح NaCl 4 – 6.5 % هو المدى الملائم لنمو بكتريا *Lactococcus lactis* . (Thomas & Pritchard , 1997) .

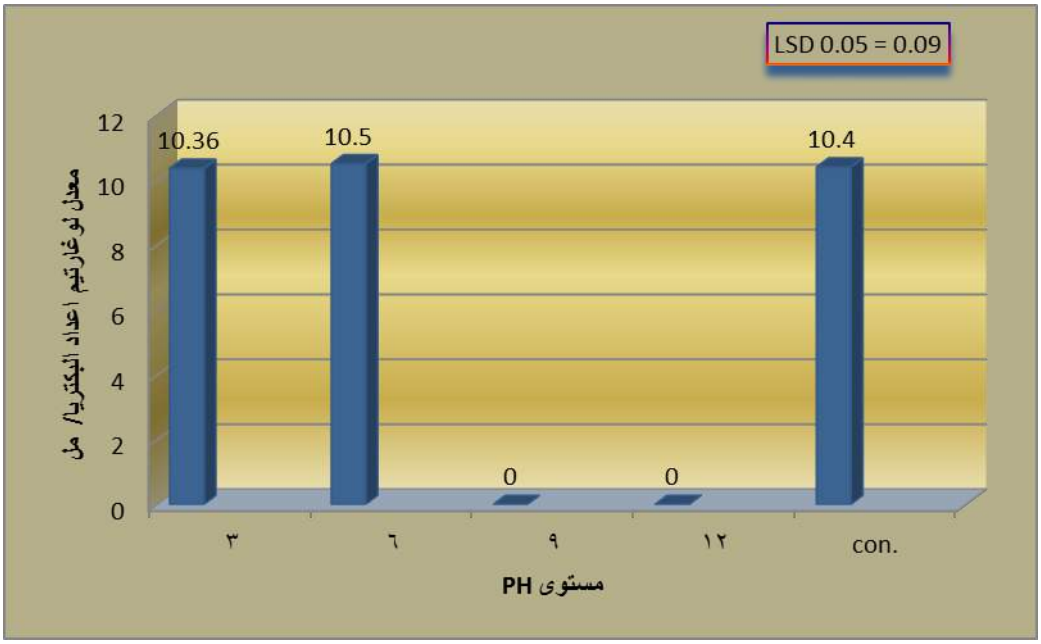


شكل (6) تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة (NaCl) في معدل نمو بكتريا *L. lactis* المنماة على وسط MRS الصلب , والمحضنة بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة

ب – درجة الحموضة .

اظهرت نتائج هذه التجربة وجود تباين في معدل لوغارتيم اعداد بكتريا *Lactococcus lactis* المنماة في وسط MRS السائل والمحضونة بدرجة حرارة 37م° في مستويات PH المختلفة حيث بلغ معدل لوغارتيم اعداد الخلايا عند الاس الهيدروجيني (3 pH) 10.36 خلية /مل بينما في مستوى (6 pH) بلغ المعدل 10.5 خلية /مل وبفارق معنوي , ولكن في المستويين 9 و 12 لم يحدث اي نمو للبكتريا (شكل 7) .

جاءت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Spicher & Schroeder (2000) حيث اثبتت نتائج بحثهما ان بكتريا حامض اللاكتيك تنمو ضمن مستوى pH بين (4.9 – 5.3) .



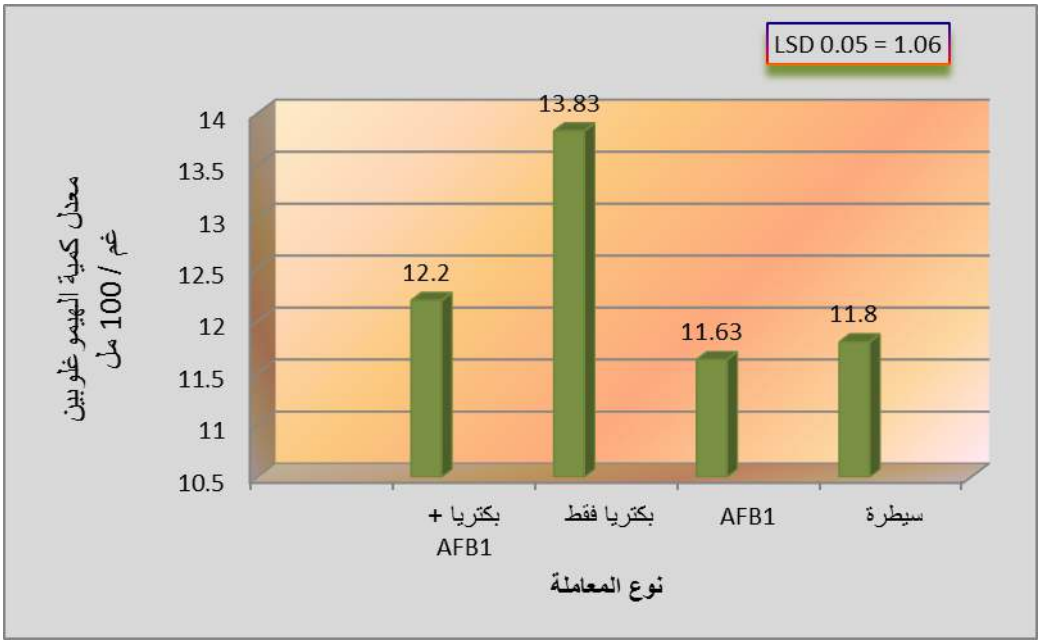
شكل (7) تأثير مستويات الحموضة (PH) في معدل نمو بكتريا *L. lactis* المنماة على وسط MRS السائل , والمحضنة بدرجة حرارة 37م°ولمدة 24 ساعة

4. 1. 2. 8. تقييم فعالية بكتريا *L . lactis* في تحطيم سم AFB1 (داخل الجسم الحي *invivo*) وبشكل وقائي .

4. 1. 2. 8. 1. الفحوصات الفسلجية لبعض معايير الدم

1- كمية الهيموغلوبين

تشير نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الشكل (8) عدم وجود تأثير معنوي ($p \leq 0.05$) في معيار كمية الهيموغلوبين بالنسبة لحيوانات المعاملة بالأفلاتوكسين فقط فقد بلغت الكمية 11.63 غم/100مل مقارنة بالسيطرة والبالغة 11.8 غم / 100مل , بينما كانت النتائج في المعاملة المتمثلة بالبكتريا فقط ذات تأثيرفي زيادة كمية الهيموغلوبين اذ بلغت 13.83غم /100مل مقارنة بمعاملة الأفلاتوكسين فقط كذلك مع معاملة السيطرة , فضلا" عن ارتفاع في كمية الهيموغلوبين في معاملة البكتريا مع الأفلاتوكسين والبالغة 12.2غم /100مل وبفارق غير معنوي عن معاملة السيطرة ومعاملة الأفلاتوكسين . وفسرت النتائج مسبقا" في الفقرة (4. 1. 2. 5. 1. 1.) .



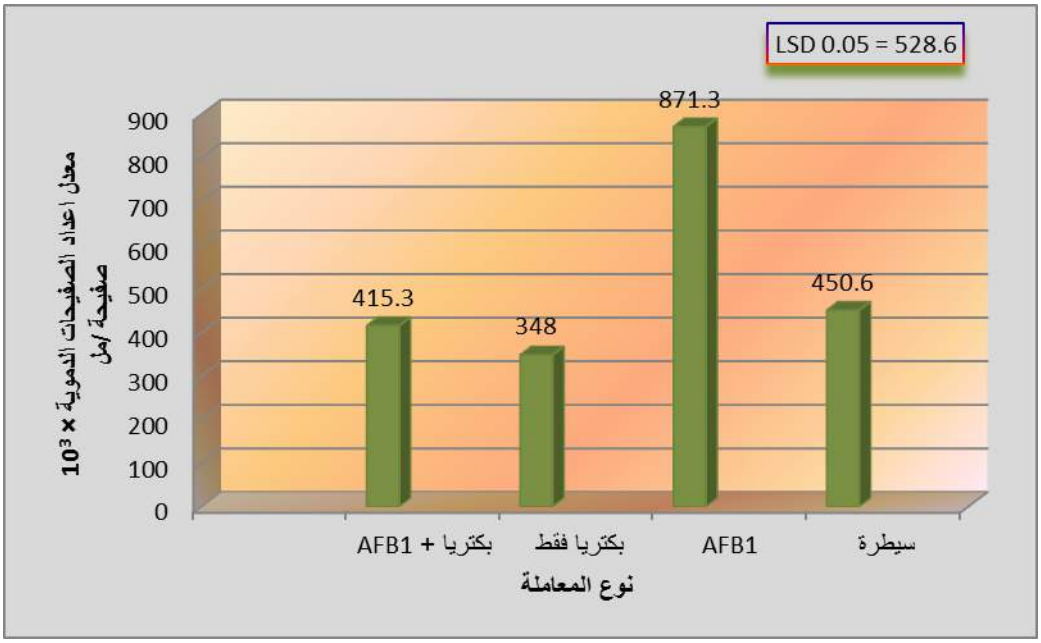
شكل (8) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض

2 – اعداد الصفيحات الدموية .

اظهرت نتائج هذا الاختبار حدوث ارتفاع في معدل اعداد الصفيحات الدموية وبفارق غير معنوي لمعاملة الافلاتوكسين فقط والبالغة 871.3 صفيحة/مل مقارنة ببقية المعاملات التي تقع عندها معدلات اعداد الصفيحات ضمن المستويات الطبيعية والبالغة 415.3.صفيحة/ملم^3 للمعاملة المتمثلة بالبكتريا مع السم B_1 حيث يلاحظ من النتيجة فعالية البكتريا في حماية الحيوانات من التاثيرات السمية للسم B1 , اضافة الى معاملة البكتريا فقط والتي بلغت 348 صفيحة / مل .(شكل 9)

وتم تفسير النتائج في الفقرة (4. 1. 2. 5. 1. 3.) .

.



شكل (9) تأثير المعاملة الداخلية *invivo* لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض

1- اعداد الخلايا اللمفية .

بينت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة بالشكل (10) التأثير المعنوي لمعاملة الافلاتوكسين فقط في خفض معدل اعداد الخلايا اللمفية دون الحد الطبيعية والتي بلغت 3.5×10^3خلية/ملم^3 مقارنة مع السيطرة البالغة 6.4×10^3 خلية /ملم^3 بينما اوضحت النتائج قابلية البكتريا *L. lactis* في حماية الحيوانات من التأثير السام لسم AFB_1 من خلال الحفاظ على معدل اعداد الخلايا اللمفية ضمن الحدود الطبيعية , وتجلى ذلك في معاملة الافلاتوكسين المعامل مسبقا" بالبكتريا *L. lactis* حيث بلغ المعدل 9.4×10^3 خلية /ملم^3 .

واتفقت النتائج مع ما توصل اليه Mehmet *etal*.(2010) حول النقص المعنوي في معدل النسبة المئوية للخلايا اللمفية عند الجرعة العالية للسم AFB_1 المعاملة بها حيوانات الجرذ الابيض حيث بلغت في معاملة السيطرة 71.71 % بينما في معاملة الافلاتوكسين 57.42 % عند جرعة ppb1600 .

كذلك جاءت النتائج مقاربة مع دراسة اخرى اوضحت النقص الحاصل في معدل خلايا الدم البيضاء والخلايا اللمفية وبفارق معنوي ($p \leq 0.05$) مع معاملة السيطرة عند معاملة الدجاج بسم الأفلاتوكسين B_1 بجرعة 50 – 100 ppb اذ بلغت اعداد الخلايا اللمفية في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين 10.327 خلية/ملم^3 عند 50 ppb و 10.09خلية/ملم^3 عند جرعة السم ppb100 بينما كانت في معاملة السيطرة 11778 خلية / ملم^3 (Samuel *et al.*, 2009) . وتم تفسير الانخفاض في اعداد الخلايا اللمفية كما مشار اليه في الفقرة (4. 1. 2. 5. 1. 4.) .

شكل (10) تأثير المعاملة الداخلية *invivo* لبكتريا *L. lactis* في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض

4. 1. 4. 8. 2. الفحوصات النسجية .

اظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من كلى واكباد والامعاء الدقيقة وطحال ذكور الجرذان التي تم معاملتها بسم الافلاتوكسين B_1 المستخلص من فطر *A. flavus* وجود تغيرات

نسجيه واضحة مقارنة بمعاملة السيطرة ومعاملة البكتريا مع الافلاتوكسين , حيث سبب تركيز السم B_1 تضخم في جدار الكبيبة (Hypertrophy wall glomerulus) وضمور واضح في الكبيبة نتيجة التطور غير الطبيعي بالاضافة الى التحلل الواضح في النبيبات الكلوية و التنخر necrosis . (صورة B – 8)

اما في نسيج الكبد فقد احدث سم B_1 تاثيرات في النسيج تمثلت بالاحتقان الوعائي وتجمع الخلايا الالتهابية . (صورة 9- B) .

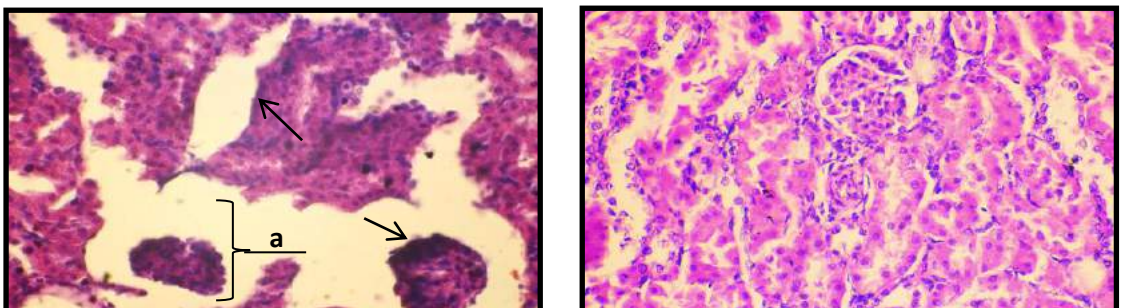
وفي الامعاء الدقيقة لوحظ تحلل بشكل كامل للزغابات وبعض التغيرات التنخرية الجزئية في الخلايا المعوية . (صورة 10- B) .

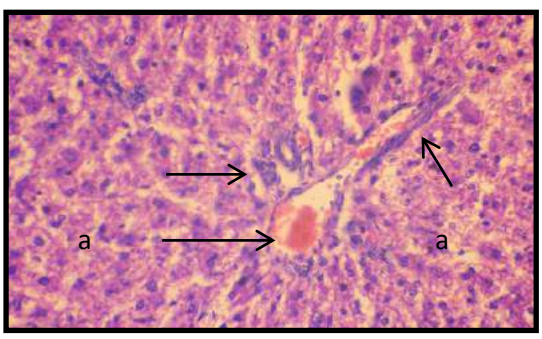
وفي الطحال ظهرت تغيرات انحلالية للخلايا بشكل واضح مع حالات التنخر في النسيج في الفص الاحمر والابيض . (صورة 11- B1, B2) .

اضافة الى ما تم تفسيره في الفقرة (4. 1. 2. 5. 2.) فقد يرجع ايضا سبب هذة النتائج الى ان المواد الناتجة من التحول الحيوي لهذه السموم داخل الجسم يؤدي الى ارتباطها بالجزيئات الكبيرة في الخلية وبالتالي ايذاؤها , او ترتبط مع الحامض النووي DNA والبروتينات مسببة عرقلة لكافة فعاليات الخلية وبالتالي موتها (Meerdink, 2004) .

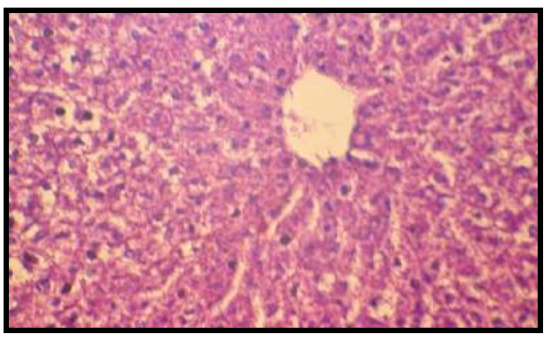
وقد يعود سبب هذه التاثيرات الى قابلية هذه السموم على الارتباط مع الغشاء الخلوي للخلايا مسببة انحلاله , او انها تمتلك تاثيرا" على المستوى الوراثي مسببة تلف او عدم تصنيع بروتينات الغشاء الخلوي وبالتالي عدم تكوينه ثم موت وانحلال الخلايا , فقد اشار (Jouany *et al.*, 2005) الى ان بعض السموم الفطرية لها القابلية على الارتباط بمواقع خاصة في الغشاء الخلوي للكائن الحي ومواقع الارتباط هذه هي β-D-glucans التي تعد المكون الاساس للغشاء الخلوي . اذ تعمل السموم على تخريب هذه الطبقة وتجعله فاقدا" لقوامه الاصلي مخترقة اياه وصولا" الى النواة مسببة تاثيرات على المستوى الجيني . اما اعضاء الحيوانات المعاملة بالبكتريا *L. lactis* اولا" ثم المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 فكانت سليمة ولم تظهر فيها اي تغيرات نسيجية مرضية (صورة 8 -9-10-11- C) وهذا يعود الى عمل البكتريا كمرشحات حيوية اذ ترتبط (Binding) جزيئات السم بالجدار الخلوي للبكتريا وتمنع وصوله الى الاعضاء الحساسة لهذا السم كالكبد والطحال والكلية فضلا"عن الامعاء الدقيقة اويحدث ادمصاص (Adsorption) لجزيئات السم مع الجدار الخلوي للبكتريا او احد مكوناتها مما يؤدي الى

تقييد جزيئات السم وابطال مفعوله. (Blanco *et al.*,1993) . وهذا دليل واضح على سلامة التعامل مع هذا النوع من البكتريا .



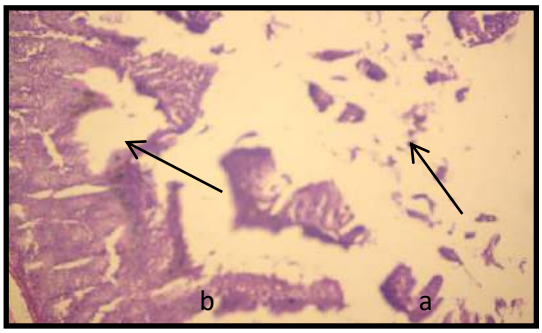


B

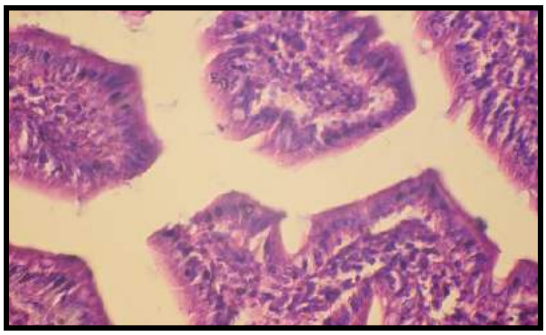


A

B

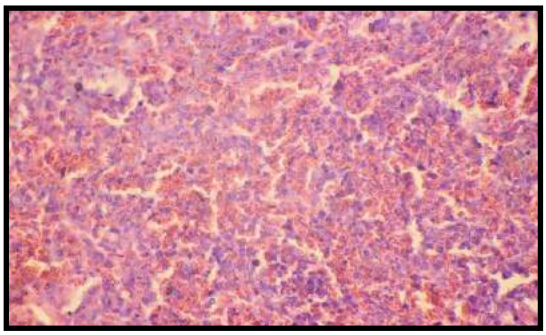


B

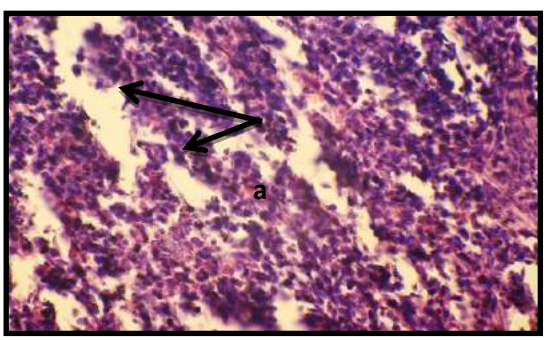


A

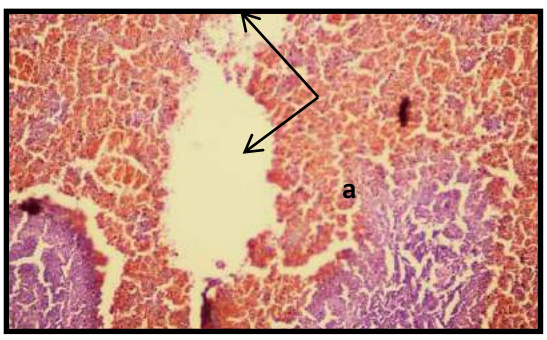
D



A



B1



B2

4. 1. 2. 9. تقييم فعالية بكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 (داخل الجسم الحي) .

4. 1. 2. 9. 1. فحوصات الدم الفسلجية

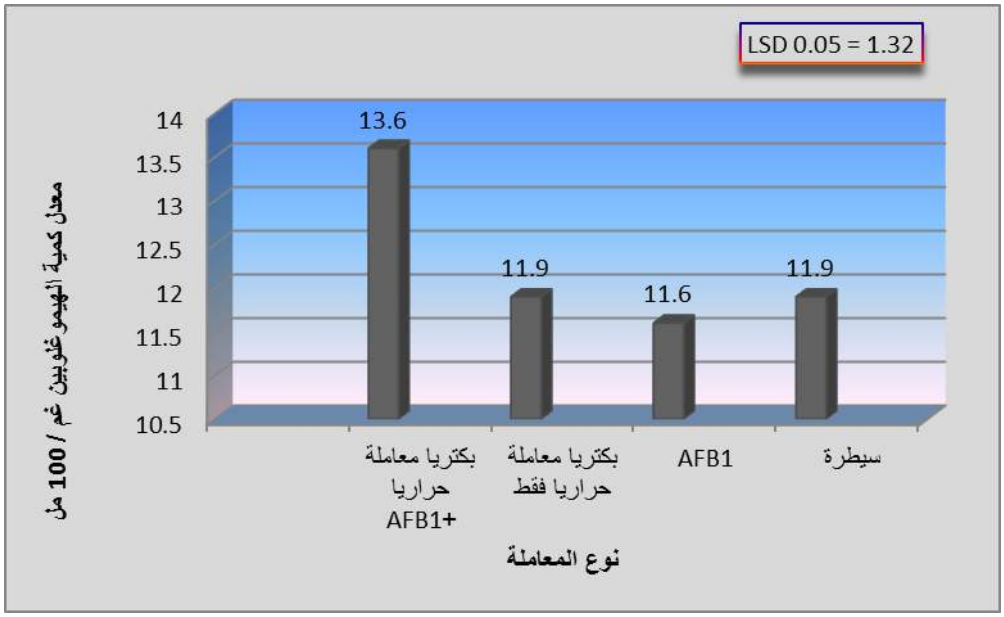
1- كمية الهيموغلوبين

اوضحت نتائج التحليل الاحصائي المبينة بالشكل (11) ارتفاعا" معنويا" ملحوظ في معيار كمية الهيموغلوبين بالنسبة لحيوانات المعاملة بالبكتريا المقتولة مع الأفلاتوكسين فقد ارتفعت الكمية الى 13.6 غم/100مل بالمقارنة مع السيطرة والبالغة 11.9 غم / 100مل كذلك مع معاملة الافلاتوكسين فقط والتي بلغت فيها 11.6 غم/100مل , بينما كانت النتائج في المعاملة المتمثلة بالبكتريا المقتولة حراريا" فقط ضمن الحدود الطبيعية , حيث بلغت 11.9 غم /100مل . وتفسير زيادة كمية الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 مع البكتريا تم التطرق اليها في الفقرة (4. 1. 2. 6. 1. 1.) .

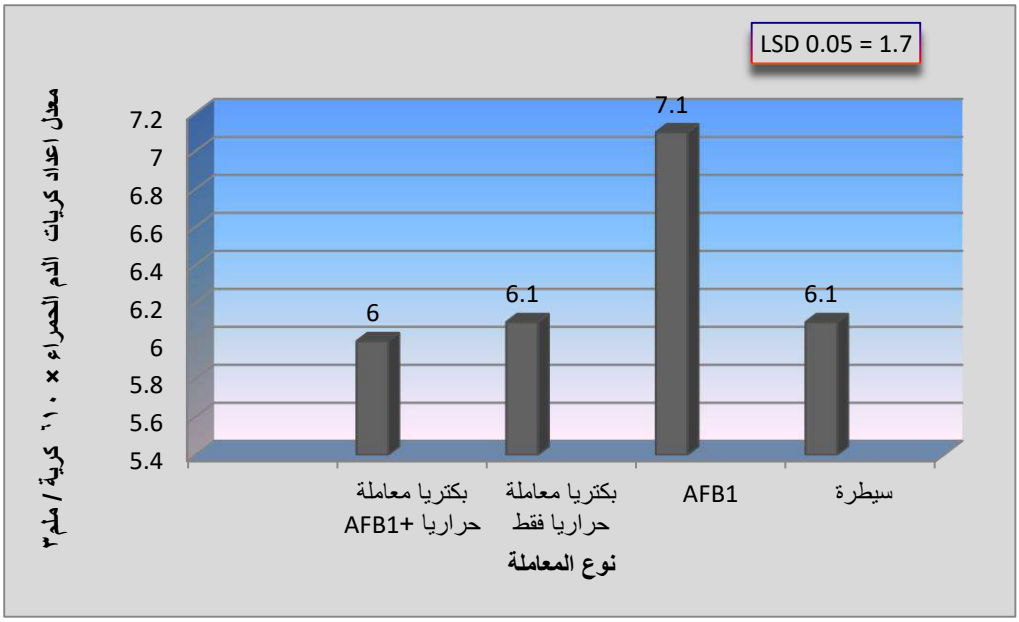
2- اعداد كريات الدم الحمراء

اظهرت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة بالشكل (12) ان المعاملة المتمثلة بالافلاتوكسين B_1 فقط سببت حدوث ارتفاع في معدل اعداد كريات الدم الحمراء حيث بلغت 7.1×10^6 كرية / ملم^3 مقارنة مع

معاملة السيطرة والبالغة 6.1×10^6 كرية / ملم^3 وكان الارتفاع بفارق غير معنوي ,كذلك كان هناك تاثير غير معنوي بين معاملة الافلاتوكسين فقط ومعاملة البكتريا المقتولة مع الافلاتوكسين والبالغة 6.1×10^6 كرية / ملم^3 .



شكل (11) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض

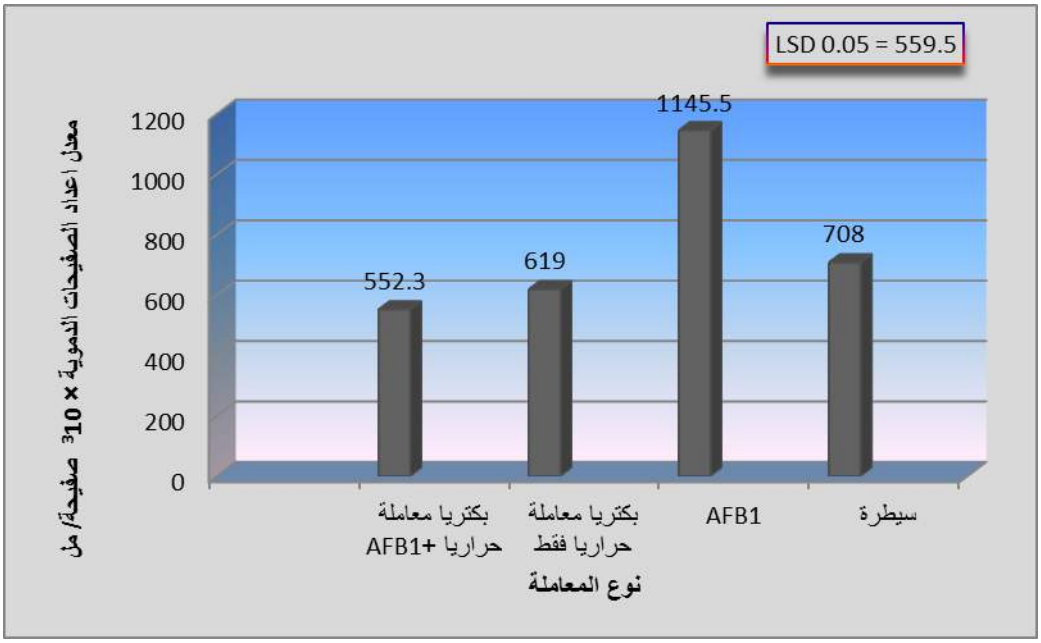


شكل (12) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد كريات الدم الحمراء لدى ذكور الجرذ الابيض

3- اعداد الصفيحات الدموية

سبب الافلاتوكسين B_1 زيادة معنوية ($P \leq 0.05$) في اعداد الصفيحات الدموية في دم حيوانات الجرذ الابيض المعاملة بالسم B_1 اذ بلغت 1145.5×10^3صفيحة/ مل مقارنة بالمعاملة المتمثلة بالبكتريا *L. lactis*المقتولة حراريا" مع الافلاتوكسين التي بلغت 552.3×10^3صفيحة/مل , (شكل 13) . فقد بينت النتائج فعالية البكتريا العالية في اختزال التأثير السمي للأفلاتوكسين B_1 المعامل بالبكتريا .

وكانت النتيجة مقاربة الى ما توصل اليه (Samuel *et al.*(2009 حيث بينت نتائجه الزيادة المعنوية في معدل اعداد الصفيحات الدموية للدجاج المعامل بسم الأفلاتوكسين B_1 بتركيز 50 – 100 ppm حيث بلغت الزيادة في المعدل 135000 – 138000 صفيحة/ملم^3 عند 50 – 100 ppm على التوالي . وقد فسرت نتائج الزيادة مسبقا" .



شكل (13) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض

4- النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية

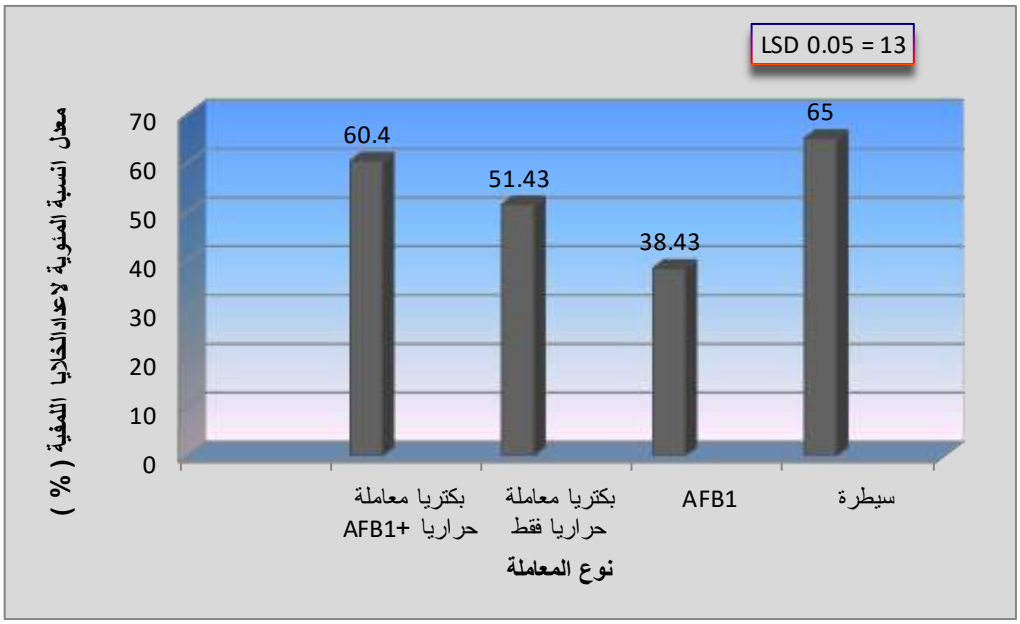
انخفضت نسبة الخلايا اللمفية في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 الى 38.43 % وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة والبالغة 65% , من جانب اخر اظهرت بكتريا *L. lactis* فعالية عالية في خفض الاثار السمية لسم الافلاتوكسين B_1اذ ارتفع معدل نسبة الخلايا اللمفية في دم حيوانات الجرذ الابيض المعاملة بالبكتريا المقتولة متبوعا" بمعاملتها بسم الافلاتوكسين B_1 الى 60.4 % (شكل 14) .

يعد سم الافلاتوكسين B_1 من السموم ذات التاثير المثبط لخلايا الجهاز المناعي اذ بينت عدد من البحوث العلمية وجود اثار سلبية لسموم الافلاتوكسينات على الجهاز المناعي تم الاستدلال عليها من ارتفاع نسب الاصابة بالامراض الفايروسية والبكتيرية نتيجة تحطم او اضعاف الجهاز المناعي (Sakhare *et al*., 2007 ; Marin *et al*., 2002) .

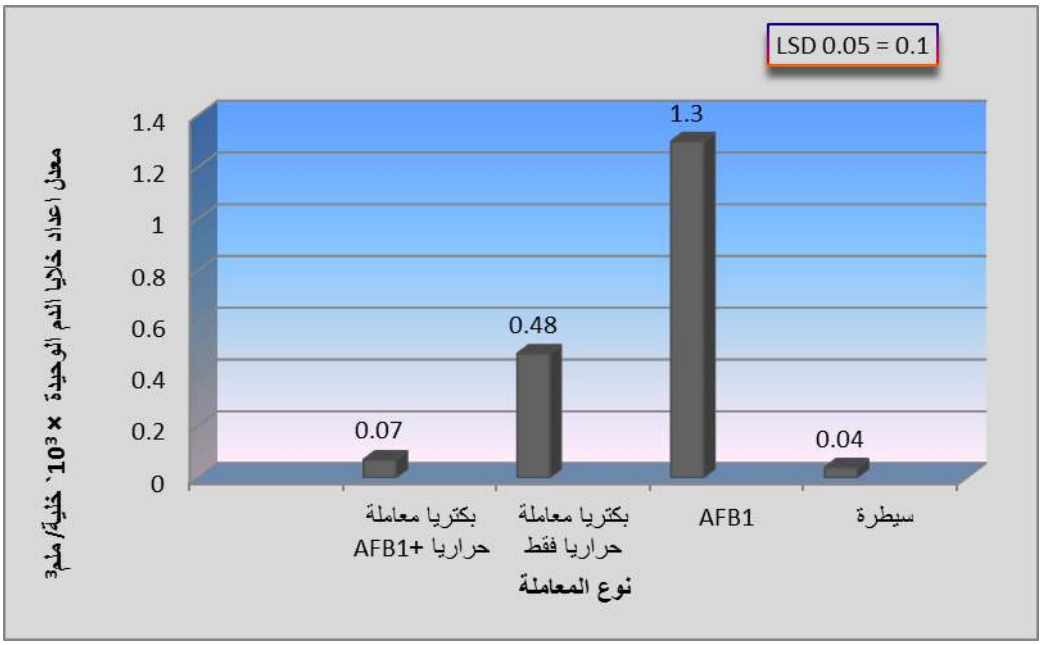
5- اعداد خلايا الدم الوحيدة

حدث ارتفاع غير طبيعي في اعداد خلايا الدم الوحيدة في دم ذكور حيوانات الجرذ الابيض المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 اذ بلغت 1.3×10^3خلية / ملم^3 وبفارق معنوي عن اعدادها في دم حيوانات معاملة السيطرة والبالغة 0.04×10^3 خلية / ملم^3 في الوقت الذي كانت اعداد هذه الخلايا ضمن المستوى الطبيعي في دم الحيوانات المعاملة بالبكتريا *L. lacis* متبوع بمعاملتها بالسم افلاتوكسين B_1 اذ بلغت 0.07×10^3 خلية / ملم^3 . (شكل 15) وهذا يشير بوضوح الى قدرة البكتريا على اختزال الفعالية السمية لسم الافلاتوكسين B_1 ولعدم توفر دراسة حول هذا الموضوع لايمكن مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسة اخرى . وبصورة عامة يمكن القول ان تاثير سم الافلاتوكسين B_1 في اعداد خلايا الدم الوحيدة يدخل ضمن التاثيرات السلبية لهذا السم في الجهاز المناعي للحيوانات المعاملة به حيث اشارت النتائج الى تجمع الخلايا الوحيدة (الملتهمة) نتيجة الاثر السلبي للسم .اذ اشارت عدد من الدراسات الى فعالية سم الافلاتوكسين B_1 على رفع اعداد خلايا الدم البيض في دم الحيوانات المعاملة بالسم (العبيدي , 2011 ; الجنابي , 2009) . وقد يعزى السبب في زيادة اعداد خلايا الدم البيض الى فعالية السموم الفطرية على استحثاث افراز مفرط لعوامل الاستجابة المناعية ومنها (Interleukin-6 (1L-6) factor T.N.F.) و Cytokinase والمسؤولة عن حدوث الالتهاب الاولي وتنظيم المناعة (Kemacki *et al*., 1998) .

ويمكن تعليل قدرة البكتريا *L. lacis* على المحافظة على اعداد خلايا الدم الوحيدة ضمن الحدود الطبيعية الى قدرتها على تغير الصفة الانتجينية للسم الافلاتوكسين B_1 فضلا" عن اختزال فعاليته السمية وهذا بدوره ادى الى تحجيم دور هذا السم في استحثاث الجهاز المناعي .



شكل (14) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض



شكل (15) تأثير المعاملة الداخلية (*invivo*) لبكتريا *L. lactis* المعاملة حراريا" في الفعالية السمية لسم AFB_1 بدلالة تأثيره في معدل اعداد خلايا الدم الوحيدة لدى ذكور الجرذ الابيض

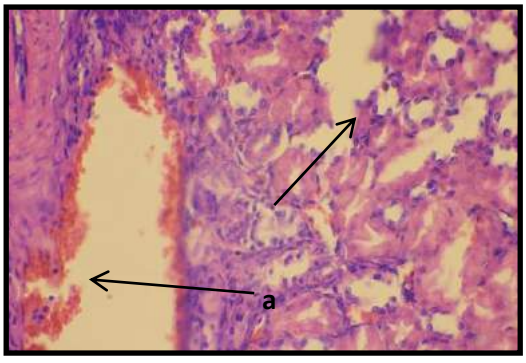
4. 1. 2. 9. 2. الفحوصات النسجية .

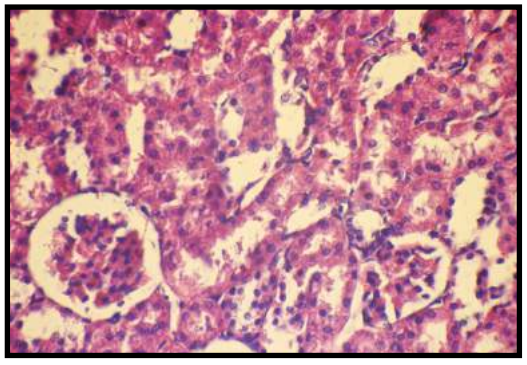
اوضحت نتائج فحص المقاطع النسجية للحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 بتركيز 100 مايكروغرام/ كغم وزن حيوان وجود تأثيرات نسيجية في الاعضاء المدروسة وتباينت هذه التأثيرات حسب العضو المدروس فبالنسبة لنسيج الكلى اظهرت النتائج حدوث التنخر وموت الخلايا للنبيبات الكلوية مع التوسع والاحتقان في الاوعية الدموية , وكما موضح في (صورة 12 – B) .

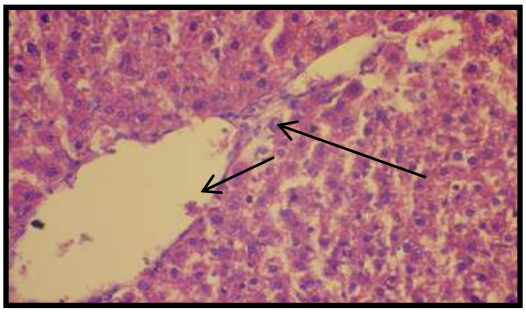
اما في الكبد فقد تمثلت التغيرات النسيجية بحالة الاحتقان والتوسع الوعائي وارتشاح الخلايا الالتهابية (Infamentry cells inflteration) اضافة الى تعدد الفجوات التنخرية في النسيج ,(صورة 13 – B) .

اما التأثيرات في الامعاء الدقيقة فتمثلت بالتحلل التام للزغابات والتنخر الخلوي , (صورة 14- B) . ولم يسلم الطحال من تاثيرات سم الافلاتوكسين اذ ظهر فيه احتقان وعائي مع تنخر خلوي (Necrotic cells) , (صورة 15 – B) .

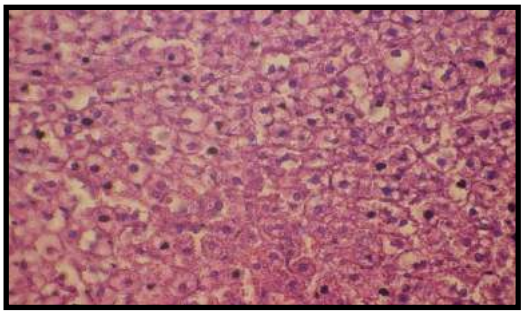
بينما لم تظهر اي تغيرات مرضية في الانسجة المعاملة بالبكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" فقط وكذلك الحال مع معاملة البكتريا المقتولة مع الافلاتوكسين في الاعضاء المدروسة . (صورة 12- 13- 14- 15- C) . وتم تفسير هذه النتائج في فقرات سابقة .


a

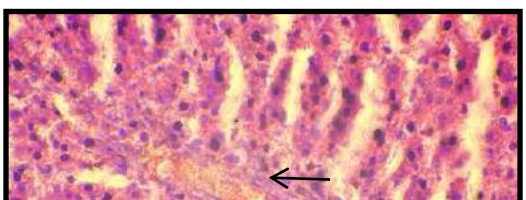


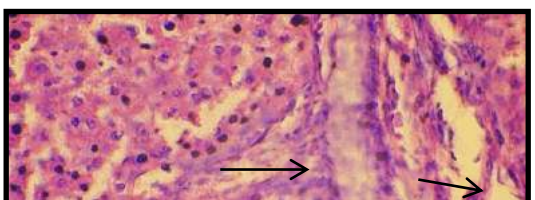


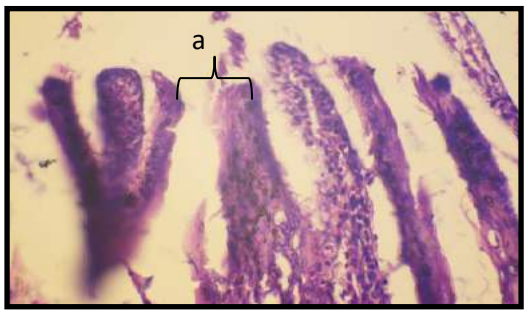
B1



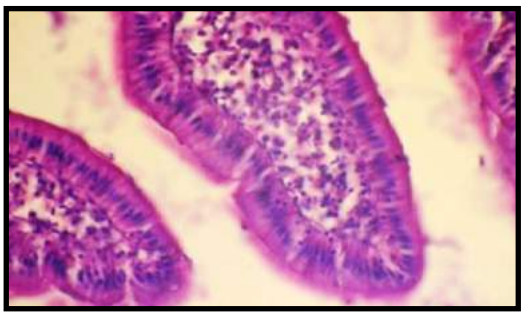
A



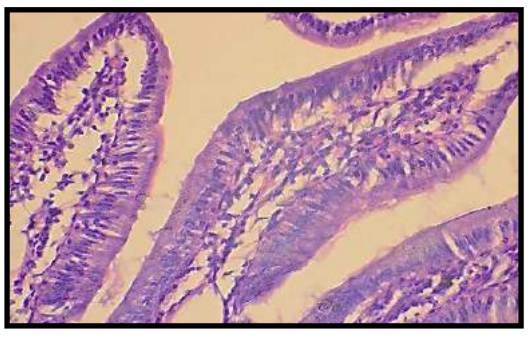




B

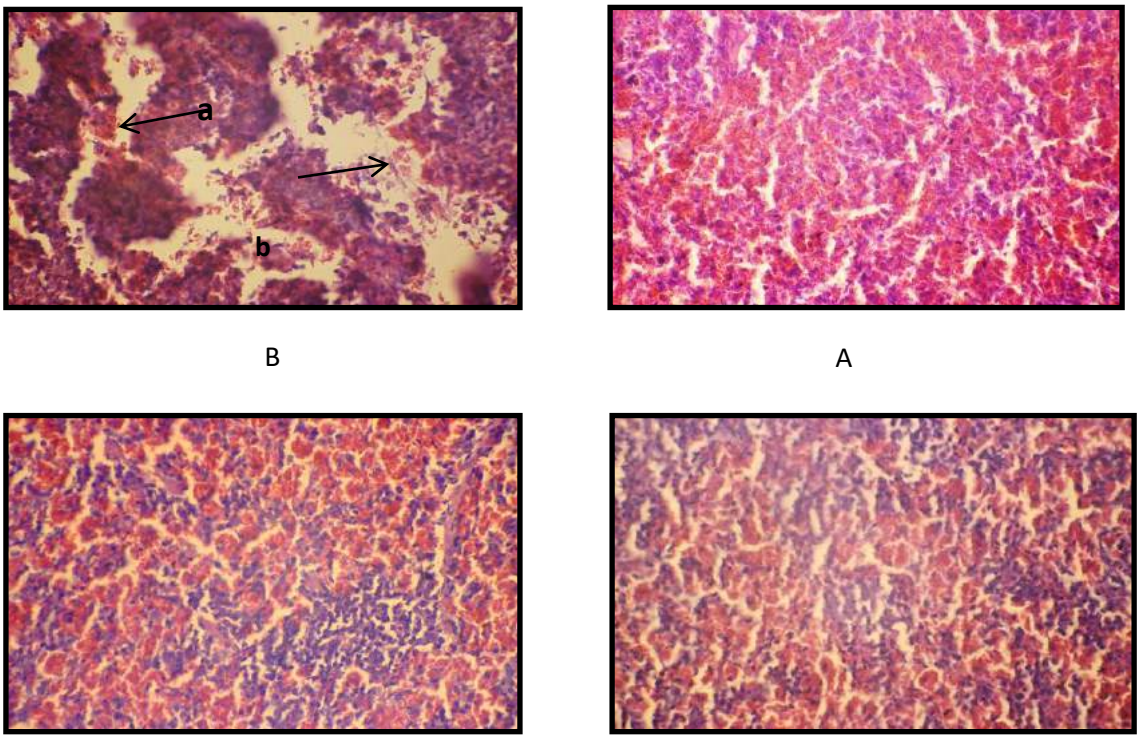


A



D

C



صورة (15) مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة *invivo* (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* + AFB1 (D) معاملة البكتريا المعاملة حراريا *L. lactis* فقط (قوة التكبير 40 X) .

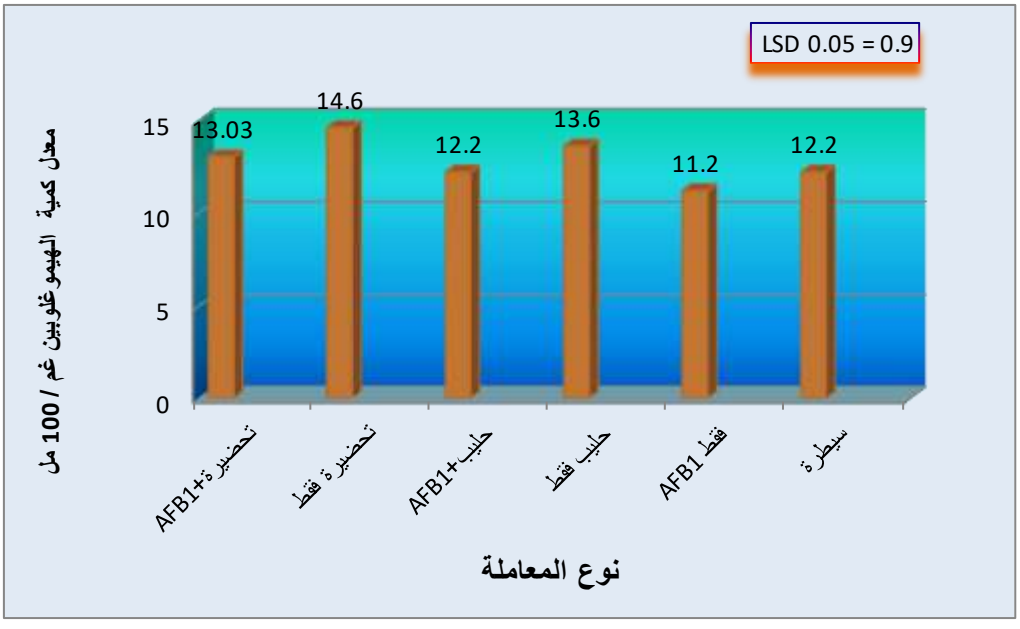
4. 1. 2. 10. اختبار فعالية التحضيرة من البكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" في حماية النظم الحيوية للجرذ الابيض من التأثيرات السمية لسم AFB1 .

4. 1. 2. 10. 1. الفحوصات الفسلجية لدم .

1- كمية الهيموغلوبين .

تشير النتائج المبينة في الشكل (16) ارتفاع مستويات الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بالبكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا" والمتبوعة بسم الافلاتوكسين B_1 اذ بلغت 14.6 غم /100مل تلتها معاملة الحليب اذ بلغ معدل كمية الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بالحليب 13.6 غم / 100مل في حين كان اقل كمية من الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 والبالغة 11.2 غم /100مل و لايمكن مقارنة نتائج هذه الدراسة لعدم توفر دراسات مماثلة بحسب المصادر المتوفرة .

اما ارتفاع معدل كمية الهيموغلوبين في دم حيوانات الجرذ الابيض المعاملة بالتحضيرة فقط فقد يعود الى استغلال الحيوان لمادة الحليب كمصدر غذائي



غني بالعناصر الغذائية كالسكريات والدهون والفيتامينات والعناصر المعدنية وغيرها (Ellen, *et al* ., 2013) . فضلا" عن امكانية استغلال مكونات الخلايا البكتيرية كعامل مساعد على ازالة بعض السموم الاخرى الداخلة لجسم الحيوان او كمصدر غذائي .

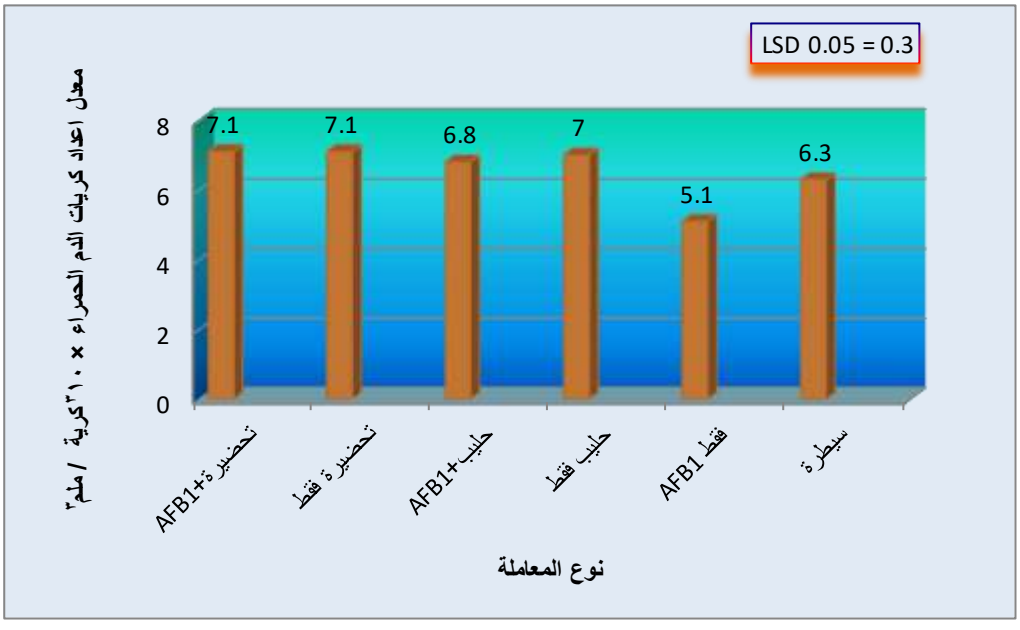
شكل (16) تاثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB_1 (داخليا") , بدلالة معدل كمية الهيموغلوبين لذكور الجرذ الابيض

2- اعداد كريات الدم الحمراء

تشير النتائج المبينة في الشكل (17) الى ان جميع المعاملات في هذه التجربة اعطت نتائج ضمن الحدود الطبيعية لمعدل اعداد كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الابيض ماعدا معاملة سم الافلاتوكسين B_1 التي انخفض فيها معدل الخلايا دون الحد الطبيعي حيث بلغ المعدل 5.1×10^6 كرية / ملم^3 بينما كانت في معاملة التحضيرة مع السم 7.1×10^6 كرية / ملم^3 وفي معاملة التحضيرة فقط 7.1×10^6 كرية / ملم^3 ايضا" وبفارق معنوي لكلا المعاملتين , بالإضافة الى الفروق المعنوية بين معاملة سم الافلاتوكسين B_1 ومعاملة الحليب مع الافلاتوكسين والحليب فقط حيث كان المعدل $6.8 - 7 \times 10^6$ كرية / ملم^3 على التوالي . ويعزى سبب انخفاض اعداد كريات الدم الحمراء في دم الحيوانات المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 يعود الى كون ان هذا السم يحدث زيادة عملية الاكسدة من خلال تحطيم الانزيمات والتي تعمل على تحويل الجذور الحرة الى مركبات تهاجم كريات الدم الحمر مما يؤدي الى تحطمها وبالتالي اختزال اعدادها في الدم او ان سم الافلاتوكسين له القابلية على الارتباط الشديد ببروتينات الدم (α- , β-globin globin) . المسؤول عن التخليق الحيوي لخلايا الدم الحمر مما ينتج عنه قلة اعدادها كما انها تؤثر على التوازن الدموي Hemostatsis (Laura, *et al.* , 2013)

ذكر Groopman *et al.*, (2003) ان السموم الفطرية احيانا" تعمل كمثبطات تنافسية للانزيمات المسؤولة عن التخليق الحيوي لكريات الدم الحمراء .

واظهرت البكتريا *L. lactis* فعالية عالية في خفض سمية الافلاتوكسين B1 وبالتالي استطاعت هذه البكتريا المحافظة على معدل الاعداد الطبيعية لكريات الدم الحمر ضمن الحدود الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة بالتحضيرة المقتولة من هذه البكتريا والمتبوعة بسم الافلاتوكسين B1 .



شكل (17) تأثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB_1 (داخليا") , بدلالة معدل اعداد كريات الدم الحمراء لذكور الجرذ الابيض

3-اعداد الصفيحات الدموية

تشير نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الشكل (18) الى الارتفاع المعنوي في معدل اعداد الصفيحات الدموية الذي سببه معاملة الحيوانات بسم الافلاتوكسين B_1 حيث بلغ معدل الصفيحات 1045 × 10^3صفيحة/مل مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 390 × 10^3صفيحة /مل بالاضافة الى المقارنة مع معاملة التحضيرة مع الافلاتوكسين والتي كانت 548.3 × 10^3صفيحة/مل كذلك مع المعاملة المتمثلة بالتحضيرة فقط والبالغة 659 × 10^3 صفيحة/مل . وهذه اشارة واضحة ايضا الى قدرة البكتريا المقتولة

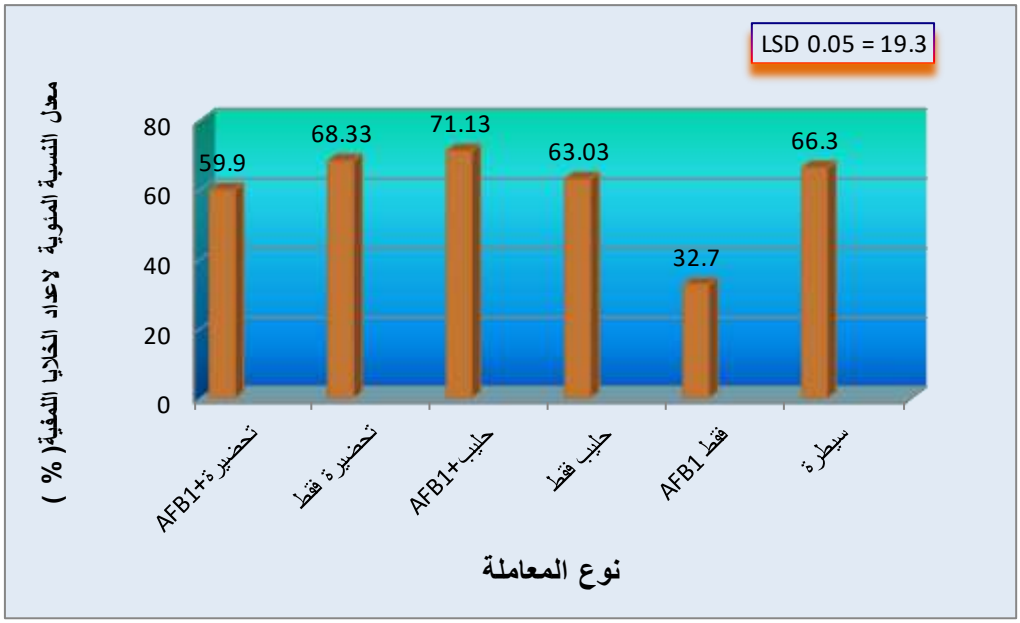
حراريا" على اختزال سمية الافلاتوكسين B_1 والمحافظة على النسب الطبيعية للمعيار اعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الابيض .

4- النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية

الفعالية السمية للسم AFB_1 (

ج هذا الاختبار انخفاض النسبة المئوية للخلايا اللمفية في دم الحيوانات المعاملة بالأفلاتوكسين _ وصلت النسبة الى 32.7 % مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 66.3 % في حين بلغت هذه النسبة في دم الحيوانات المعاملة بالتحضيرة المعاملة حراريا" من بكتريا *L. lactis* متبوعة بالمعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 59.9 % وهي ضمن المدى الطبيعي في الوقت الذي بلغت نسبة الخلايا اللمفية في دم الحيوانات المعاملة بالتحضيرة فقط والحليب + AFB1 كلا" على حده 68.33 % و 71.13 %

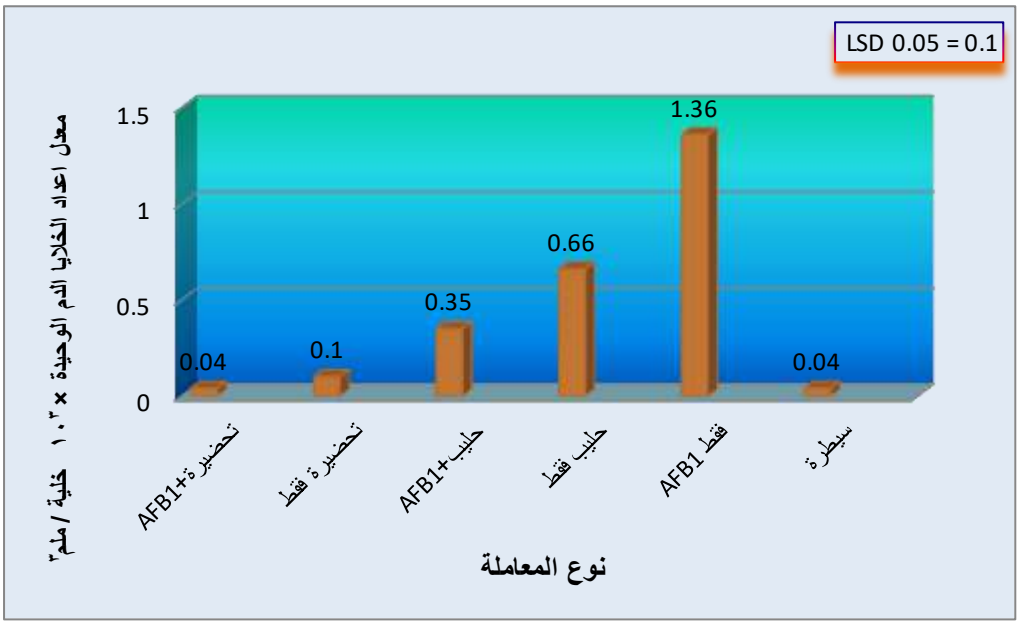
على التوالي (شكل 19) . يلاحظ ان التحضيرة الحيوية المصنعة من البكتريا *L. lactis* المقتولة حراريا والمحملة عل مسوق الحليب ابدت فعالية جيده في اختزال سمية سم الافلاتوكسين B_1 وابقاء النسبة المئوية للخلايا اللمفية ضمن الحدود الطبيعية وقد تم مناقشة اسباب ذلك في فقرات سابقة .



شكل (19) تأثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB_1 (داخليا") , بدلالة معدل النسبة المئوية لاعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الابيض

5- اعداد خلايا الدم الوحيدة

تشير النتائج الموضحة في الشكل (20) الى ارتفاع معنوي في اعداد خلايا الدم الوحيدة في دم حيوانات الجرذ المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 فقط اذ بلغت 1.36×10^3خلية/ ملم^3 بالمقارنة مع اعدادها في دم حيوانات الجرذ الغير معاملة بالسم (معاملة السيطرة) والبالغة 0.04×10^3خلية / ملم^3 , وكان للتحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* دور ايجابي في ابقاء معدل اعداد خلايا الدم الوحيدة ضمن الحدود الطبيعية اذ بلغت 0.04×10^3خلية/ملم^3 اما اعداد الخلايا في دم الحيوانات المعاملة بالحليب مع AFB_1 والحليب فقط و التحضيرة فقط فكانت 0.35×10^3 خلية /ملم^3 و 0.66×10^3 خلية/ ملم^3 و 0.1×10^3 خلية/ملم^3 على التوالي . وبالنظر لعدم توفر دراسات مماثلة لهذه الدراسة عليه لا يمكن مقارنة هذه النتائج ولكن اعطيت بعض التفاسير حول زيادة اعاد خلايا الدم الوحيدة بفعل الافلاتوكسين B_1 في الفقرة (4. 1. 2. 9. 1. 5.) .



شكل (20) تاثير التحضيرة المصنعة من لقاح البكتريا *L. lactis* والمعاملة حراريا على الفعالية السمية للسم AFB_1 (داخليا") , بدلالة معدل اعداد خلايا الدم الوحيدة لذكور الجرذ الابيض

4. 1. 2. 10. 2. الفحوصات النسجية

اظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من الكلى واكباد والامعاء الدقيقة والطحال للذكور الجرذ الابيض المعاملة بسم الافلاتوكسين B_1 بتركيز 100 مايكروغرام/ كغم وزن حيوان وجود تأثيرات نسيجية في الاعضاء المدروسة وتباينت هذه التأثيرات حسب العضو المدروس فبالنسبة لنسيج الكلى اظهرت النتائج حدوث التنخر وموت الخلايا للنبيبات الكلوية مع التوسع والاحتقان في الاوعية الدموية , وكما موضح في (صورة 16 – B) .

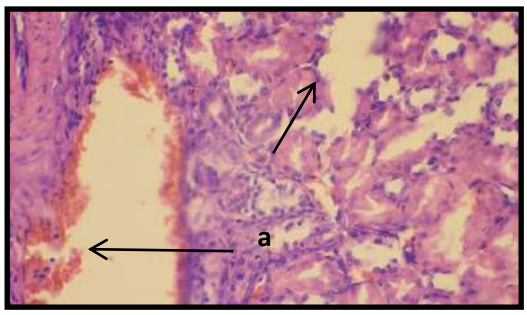
اما في نسيج الكبد فقد تمثلت التغيرات النسيجية بالاحتقان والتوسع الوعائي وارتشاح الخلايا الالتهابية اضافة الى تعدد الفجوات التنخرية في النسيج (Multifocal hepatocytes necrosis) (صورة B – 17) .

و في الامعاء الدقيقة ظهر تحلل تام للزغابات وتنخر خلوي , (صورة 18- B) . في حين احدثت المادة السامة توسع في الممرات الدموية اضافة الى التغيرات الانحلالية المتمثلة بالتنخر الخلوي ,(صورة 19 – B) . كما ظهرت تغيرات نسيجية مرضية في الاعضاء المدروسة لدى الحيوانات المعاملة بالحليب + AFB_1 . ففي الكلية حدث ضمور الكبيبة (تطور غير طبيعي) مع تضخم في جدار الكبيبة فضلا" عن حدوث تنخر في الخلايا الكلوية .(صورة 16 – E) اما في نسيج الكبد

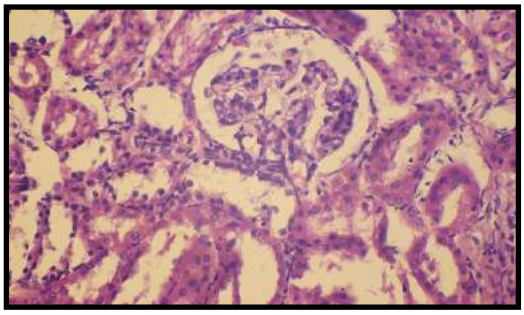
فلم تظهر اية تغيرات او تأثيرات مرضية في النسيج . (صورة 17- E) . بينما في نسيج الامعاء الدقيقة ظهر التأثير المرضي واضح وتمثل بتحلل تام للزغابات وتنخر خلوي . (صورة 18- E)

و الطحال هو الاخر ظهرت فيه تغيرات مرضية تمثلت بالاحتقان الوعائي و التنخر الخلوي . (صورة 19– E) . وكان للتحضيرة الحيوية المقتولة من البكتريا *L. lactis* دور فعال في حماية الاعضاء المدروسة من التاثيرات السمية لسم الافلاتوكسين B_1 وظهر ذلك جليا" من خلال عدم حدوث اية تغيرات نسيجية مرضية في اعضاء الحيوانات المعاملة بالتحضيرة الحيوية متبوعا" بسم الافلاتوكسين B_1 (

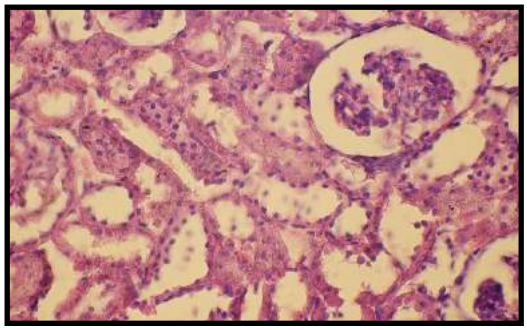
صورة 16- C , C– 17 , C-18 , 19- C) . من جانب اخر لم يكن للتحضيرة الحيوية والتي تم معاملة الحيوانات بها اية تاثيرات سلبية على الاعضاء المدروسة وكما مبين في الصور D-16 و 17- D و 18- D و 19- D . وتم مناقشة مثل هذه النتائج في فقرات سابقة .



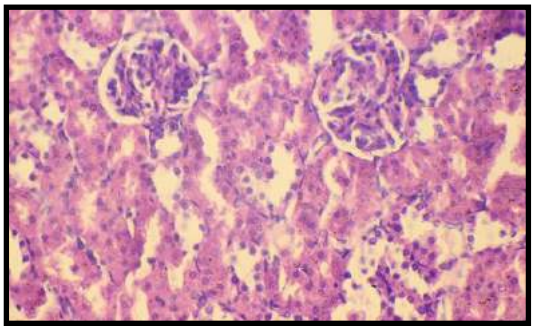
B



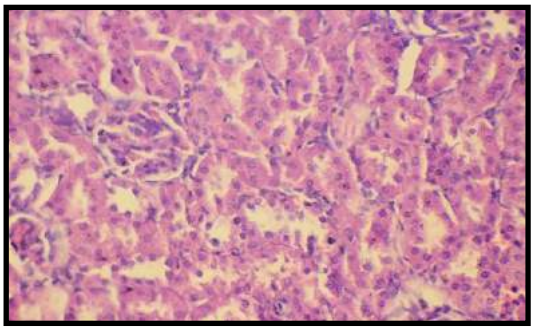
A



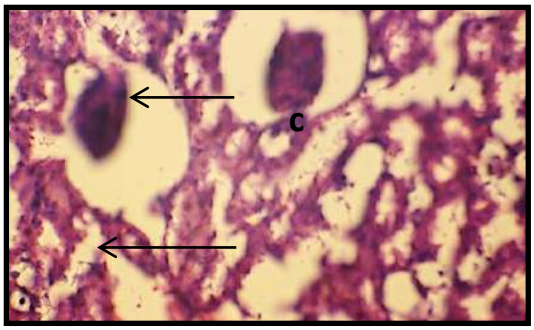
D



C

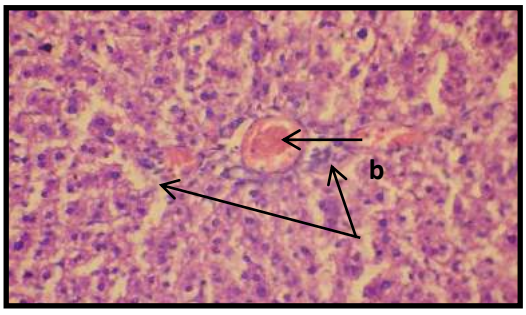


F

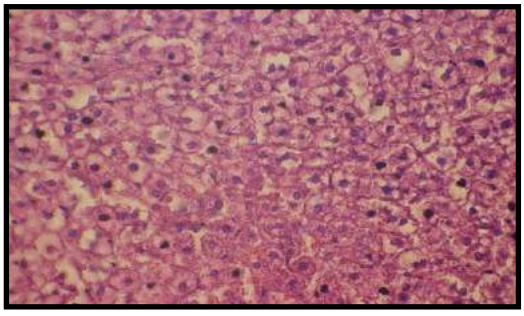


E

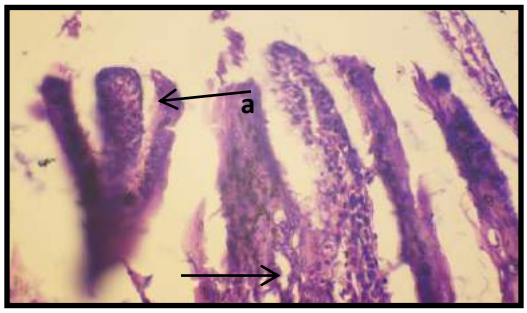
صورة (16) مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة الفورملة (A) معاملة السيطرة (B) معاملة الافلاتوكسين فقط بجرعة 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان (C) معاملة الفورملة المعاملة حراريا + AFB1 (D) معاملة الفورملة المعاملة حراريا فقط (E) معاملة الحليب + AFB1 (F) معاملة الحليب فقط (قوة التكبير X 40) .



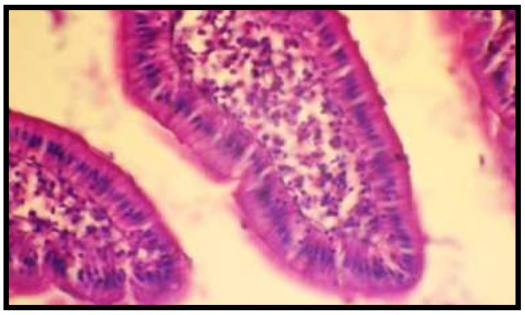
B



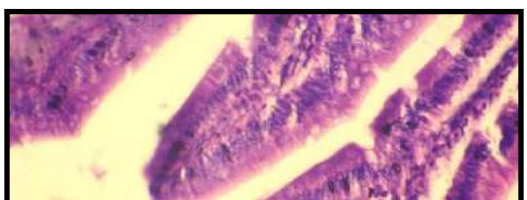
A

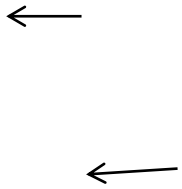


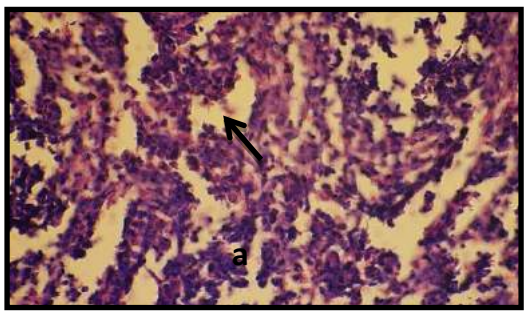
B



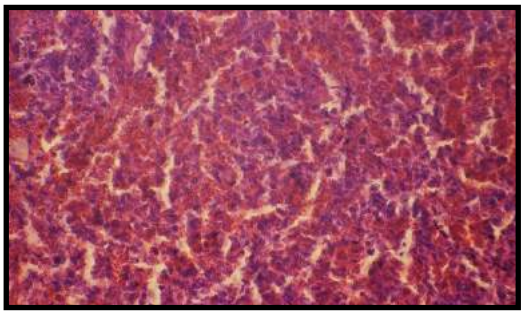
A



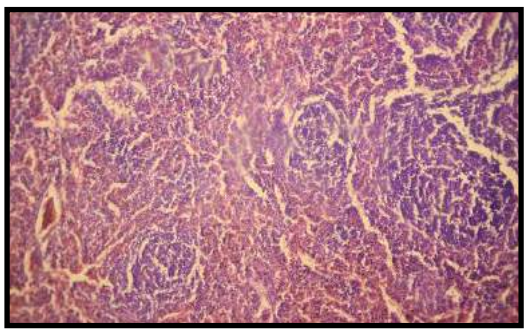




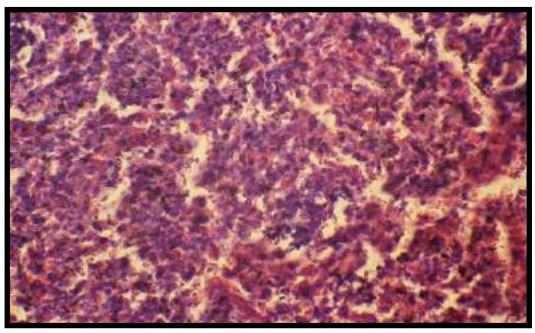
B



A



D



C

4. 2. تقييم فعالية نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* في معالجة مبيد Bifenthrin بدلالة الاختبارات الحيوية

4. 2. 1. التشخيص التأكيدي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens*

اثبتت نتائج اختبارات Epi20 والفايتك Vitic ان هاتين العزلتين تعودان للنوعين *B. subtilis* و *P. fluorescens*. (صورة 20) .

ونتائج هذين الاختبارين تتطابق مع نتائج الاختبارات القياسية و خصوصا" ما اشار اليه كل من Lee *et al*.(2005) و Park (2001) .

صورة (20) التشخيص التأكيدي لعزلة البكتريا *P. fluorescens* باستعمال اختبار Epi20

4. 2. 2. تاثير تراكيز مختلفة من ملح Nacl ودرجة الحموضة pH في نمو عزلتي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens*

4. 2. 2. 1. اختبار تاثير ملح كلوريد الصوديوم في نمو العزلتين .

اظهرت نتائج هذا الاختبار قدرة نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* على النمو في جميع التراكيز المختبرة وكان افضل نمو لبكتريا *B. subtilis* عند التركيز 2% اذ بلغ معدل لوغارتيم اعداد خلايا البكتريا 10.7(6.1 ×10^{10} وحدة تكوين مستعمرة و. ت . م. /مل) في حين كان 11.8 (7.7 × 10^{11} و. ت. م. /مل) لبكتريا *P. fluorescens* عند التركيز 1% . في حين كان معدل لوغارتيم اعداد خلايا البكتريا الاولى في معاملة السيطرة 10.8 (7 × 10^{10} و.ت .م./مل) في حين كان المعدل 11.7 (6.3 ×10^{11} و.ت.م. / مل) في معاملة السيطرة لبكتريا *P. fluorescens* اما بقية التراكيز التصاعدية فحدث انخفاض تدريجي في معدل لوغارتيم اعداد خلايا البكتريا ولكلا النوعين (جدول 3).

نتائج هذا الاختبار وبخاصة مايتعلق منها بنوع البكتريا *B. subtilis* تتفق مع ما توصلت اليه اكثر من دراسة اذ وجد العاشور (2005) ان البكتريا تنمو بمدى من التراكيز يتروح بين 1-8 % وكان نمو البكتريا افضل من معاملة السيطرة عند التركيز الملحي 1% في حين توقف النمو عند التركيز 9% .

كما اشارت دراسة اخرى ان هذه البكتريا تنمو في مدى من التراكيز يتراوح بين 3-7 % في حين توقف النمو عند التركيز 10% (العبيدي , 2011) .

اما بكتريا *P. fluorescens* فقد اظهرت احدى الدراسات انها تنمو بمدى واسع من التراكيز الملحية تتراوح بين 0-12 % وكان افضل نمو لها عند التراكيز الملحية 2% و 4% (الجميلي والوائلي و 2000) .

ان قدرة البكتريا على تحمل التراكيز الملحية يعود اساسا" الى قدرة البكتريا على احداث توازن بين الضغط الازموزي خارج الخلية وداخلها وبالتالي تحافظ الخلية على حالة الانتفاخ , اذ ان حالة التوازن تضمن للخلية عدم خروج الماء من داخلها الى الخارج وبالتالي تفادي حدوث حالة البلزمة لها وهذا التوازن في الضغط الازموزي يتأتى من قدرتها على ادخال جزيئات الملح الى داخل الخلية بما يوفر ضغط ازموزي مساوي لما موجود في خارج الخلية (Rao, 1997)

جدول (3) تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة (NaCl) في معدل نمو نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده المنماة على وسط N. agar والمحضنة بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة

البكتريا / تركيز الملوحة (%)	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
	معدل اعداد البكتريا (و.ت.م. / مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل	معدل اعداد البكتريا(و.ت.م. /مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل
1	7.7×10^{11}	11.8	3.1×10^{10}	10.4
2	4.6×10^{11}	11.6	6.1×10^{10}	10.7
3	4.1×10^{11}	11.6	4.1×10^{10}	10.6

10.2	$^{10}10 \times 1.8$	11.2	$^{11}10 \times 2.1$	**4**
10.8	$^{10}10 \times 7$	11.7	$^{11}10 \times 6.3$	**Con.**
0.14		**0.08**		**L.S.D.(0.05)**

4. 2. 2. 2. تأثير درجة الحموضة في نمو العزلتين

اوضحت نتائج هذا الاختبار قدرة بكتريا *P. fluorescens* على النمو في جميع مستويات الحموضة المختبرة وكان افضل نمو عند الاس الهيدروجيني 6 اذ بلغ معدل لوغارتيم اعداد الخلايا البكتيرية 11.8 (6.7× 10^{11}و.ت.م./مل) في حين كان ادنى نمو للبكتريا عند الاس الهيدروجيني 12 اذ بلغ 11 (1×10^{11} و. ت. م. / مل) اما بكتريا *B. subtilis* فكان افضل نمو لها عند الاس الهيدروجيني 6 اذ بلغ 10.5 (3.5 × 10^{10}و. ت. م. / مل) في حين توقف نمو البكتريا عند الاس الهيدروجيني 12 (جدول 4) .

وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (1997) Govan والذي اشار الى ان بكتريا *P. fluorescens* تستطيع النمو بمدى من الاس الهيدروجيني يتروح بين 3-9 ولكن الاس الهيدروجيني الامثل للنمو يتروح بين 7-9. من جانب اخر ذكر Bandow *et al*. (2002) الى قدرة البكتريا *B. subtilis* على النمو في مدى واسع من الاس الهيدروجيني يتروح بين 3- 9 .

جدول (4) تأثير مستويات (PH) في معدل نمو نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده المنماة على وسط N. agar والمحضنة بدرجة حرارة 37م° ولمدة 24 ساعة

4. 2. 3. تقييم فعالية نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* في اختزال سمية المبيد bifenthrin

4. 2. 3. 1. فحوصات الدم الفسلجية .

البكتريا / مستوى PH	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
	معدل اعداد البكتريا (و.ت.م./مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل	معدل اعداد البكتريا (و.ت.م. /مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل
3	3.5×10^{11}	11.5	1.9×10^{8}	8.2
6	6.7×10^{11}	11.8	3.5×10^{10}	10.5
9	6.1×10^{11}	11.7	3.1×10^{10}	10.4
12	1×10^{11}	11	0	0
Con.	6.3×10^{11}	11.7	7.6×10^{10}	10.8
L.S.D.(0.05)	**0.04**		**0.12**	

1- كمية الهيموغلوبين

اشارت نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الشكل (21) انخفاضا" معنويا في كمية الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بمبيد bifenthrin بتركيز 100مايكروليتر / كغم وزن حيوان حيث بلغ معدل كمية الهيموغلوبين 10.93غم /100مل بالمقارنة مع معاملة عزلتي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* مع المبيد كلا" على حده اذ بلغت الكمية 12.23 غم /100مل و 12.43 غم /100مل على التوالي , كما ويلاحظ من النتائج قابلية عزلتي البكتريا في رفع معدل كمية الهيموغلوبين مقارنة بمعاملة المبيد فقط ومعاملة السيطرة (المتمثلة بتجريع الحيوانات بالوسط الغذائي N. broth فقط) ,حيث بلغت الكمية 13.33 – 12.5 غم /100مل للعزلتين على التوالي , وهذا يشير الى فعالية عزلتي البكتريا في اختزال سمية مبيد bifenthrin وحماية النظم الحيوية لذكور الجرذ الابيض من الاثار السمية لهذا المبيد .

ولكن لا توجد دراسة عالمية او محلية لحد الان بحسب المصادر المتوفرة حول تاثير تلك العزلتين في تحطيم مبيد bifenthrin داخل جسم الكائن الحي بدلالة المعايير الدموية للحيوانات المختبرية ليتسنى لنا مقارنتها مع نتائج هذه الدراسة .

ولكن ما يخص تاثير المبيد في النظم الحيوية لحيوانات جاءت النتائج مطابقة لما توصل اليه المسعودي (2013) حيث توصل الى ان تجريع اناث الجرذ الابيض بتركيز 0.02 – 0.03 ملغم / كغم وزن حيوان من مبيد bifenthrin ادى الى خفض كمية الهيموغلوبين وبشكل معنوي مقارنة بمعاملة السيطرة .

و يعزى سبب هذا الانخفاض الى ان هذا المبيد يعمل على اعاقة عملية امتصاص الحديد من القناة الهضمية نتيجة اصابتها بالتهاب المعدة والأمعاء بعد التجريع بالمبيد , وان الحديد يدخل في عملية تركيب الهيموكلوبين بشكل اساسي . (Coles & Embert, 1986)

وقد يرجع هذا الانخفاض في مستوى الهيموكلوبين الى تأثير المبيد في تثبيط تحرر الحديد من بروتين الفرتين (Ferritin) الذي يعد المصدر الرئيسي للحديد المهم في بناء تكوين جزيئة الهيموكلوبين . (Thomas and Aust ,1986) .

اما تعليل عدم انخفاض مستويات الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بالبكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* كلا" على حده متبوعا" بمعاملتها بالمبيد Bifenthrin قد يعود اساسا" الى فعالية هاتين العزلتين من البكتريا على تحطيم المبيد الكيمياوي وبالتالي فقدان فعاليته السمية مما انعكس ايجابيا" على

كمية الهيموغلوبين في دم تلك الحيوانات واليات تحطيم المبيد بفعل هاتين العزلتين قد يعود الى الانزيمات التي تفرزها هذه البكتريا والقادرة على تفكيك البناء الكيميائي للمبيد فضلا" عن امكانية تقييد (ربط) المبيد الكيميائي بالجدار الخلوي للبكتريا بحيث تعمل هذه الجدران كمرشحات احيائية داخل جسم الحيوان (Laura *et al*.,2013) .

هنالك العديد من الدراسات العلمية والتي اشارت الى فعالية العديد من انواع البكتريا في تحطيم كلي او جزئي لانواع مختلفة من المبيدات الكيمياوية فقد ذكر Selvam and Thatheyns (2013) ان بكتريا *Bacillus cereus* فعالة في تحطيم المبيد البايروثرويدي Fenvalerate (مبيد حشري) في انبوبة الاختبار (خارجيا") وخلال مدة حضن تراوحت بين 4- 8 ايام .

كما بين Omolo *et al*.,(2012) فعالية العديد من عزلات البكتريا منها *P. fluorescens* *P. putida* على تحليل مبيد Carbofuran خلال 100 يوم خارجيا" (*Invitro*) .

شكل (21) تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل كمية الهيموغلوبين لدى ذكور الجرذ الابيض

2- اعداد كريات الدم الحمراء

اثر مبيد bifenthrin سلبا" في اعداد كريات الدم الحمر اذ سبب انخفاضا" معنويا" في اعداد تلك الكريات في دم الحيوانات المعاملة بالمبيد فقط اذ بلغت اعدادها 4.6 × 10^6 كرية/ ملم^3 في حين كانت اعدادها في دم حيوانات معاملة السيطرة (لم تعامل بالمبيد) 6.4 × 10^6 كرية / ملم^3 اما الحيوانات التي عوملت بالمبيد والذي سبق وان تم معاملتها بالبكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* فبلغت اعداد كريات الدم الحمر في دمائها 7.1 × 10^6 كرية / ملم^3 و 6.4 × 10^6 كرية / ملم^3 على التوالي وهذه الاعداد مساوية او اعلى من اعدادها في معاملة السيطرة اما الحيوانات المعاملة بالبكتريا فقط سواء *P. fluorescens* او *B. subtilis* كلا" على حده فكانت اعداد كريات الدم في دمائها 6.5 ×10^6 كرية/ملم^3 و 7.1 × 10^6 كرية / ملم^3 على التوالي . (شكل 22) .

اتفقت نتائج هذه الدراسة جزئيا" مع دراسة المسعودي (2013) ,في تاكيد سمية المبيد Bifnethrin ويعزى سبب انخفاض اعداد كريات الدم الحمر في دم الحيوانات المعاملة بالمبيد فقط الى تاثير المبيد على العمليات المتسلسة الخاصة بانتاج كريات الدم الحمراء وتاثيره على الخلايا المولدة (الام) والمتواجدة في نخاع العظم او كون المبيد يمتلك فعالية في تثبيط مادة Glutathione المتواجدة داخل كرية الدم الحمراء والمسؤولة عن حماية كريات الدم الحمراء وبالتالي تكون هذه الكرية عرضة للتاثيرات السمية للمادة السامة مما يؤدي الى قصر عمر تلك الكريات (Eklow *et al*., 1986) .

كما ان المبيد يؤثر في عملية تصنيع كرية الدم الحمراء Erythropoiesis من خلال التاثير في انقسام امهات كريات الدم الحمراء heamocytoblast المتواجدة في نخاع العظم (yousef *et al*. 2003)

اما بخصوص المعالجة الاحيائية للمبيد Bifenthrin بواسطة نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* فلم تتوفر مصادر علمية يمكن مقارنة نتائج هذه الدراسة معها . وعليه يمكن القول ان نوعي البكتريا المستخدمة في معالجة المبيد الكيمياوي كانت فعالة في اختزال سمية المبيد الكيمياوي .

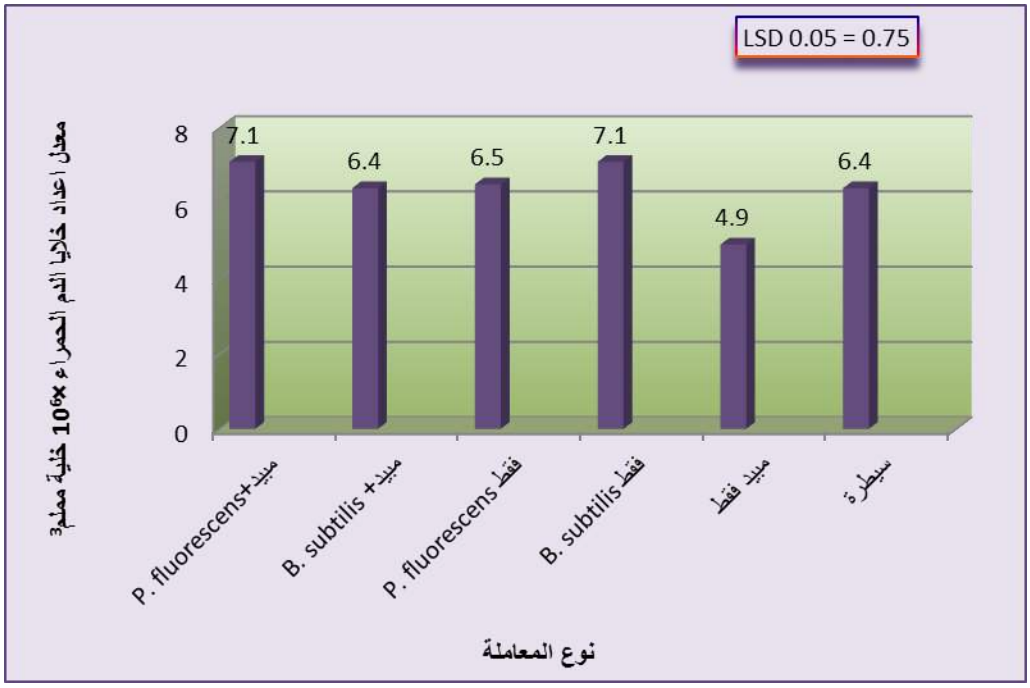
وما يعضد هذا الاستنتاج هو نتائج اختبار انبات حبوب الحنطة والتي سيتم التطرق اليها لاحقا" , والتي اشارت بوضوح الى الحبوب المزروعة في تربة ملوثة بالمبيد ومعاملة بأحد نوعي البكتريا ادى الى انبات حبوب الحنطة بنسبة 79.1 % بعد مرور عشرة ايام من الزراعة في حين كانت نسبة الانبات صفرا" في التربة المعاملة بالمبيد فقط بعد مرور عشرة ايام وهذا يعني اختزال سمية المبيد او تحطيمه

بنسبة عالية . وبالتالي فان تاثير المبيد المعامل مسبقا" باحد نوعي البكتريا *B. subtilis* او *P. fluorescens* قد فقد فعاليته السمية في النظم الحيوية للحيوانات المعاملة بهذا المبيد وبالتالي كانت مستويات اعداد كريات الدم الحمراء وكمية الهيوغلوبين واعداد الصفائح الدموية كلها ضمن الحدود الطبيعية .

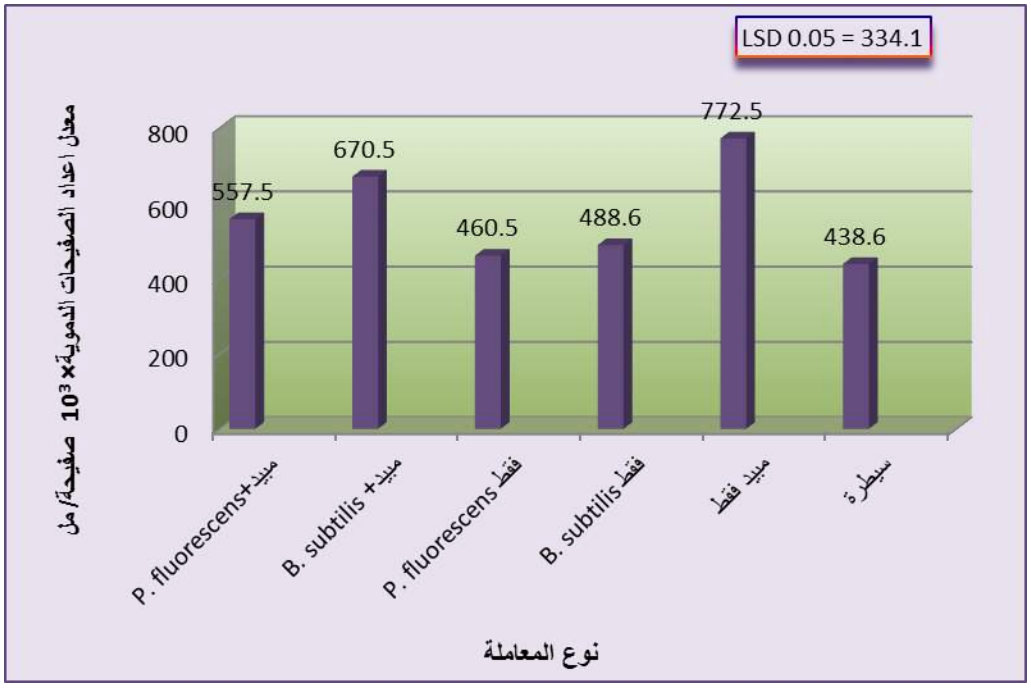
3- اعداد الصفيحات الدموية

اظهرت نتائج هذا الاختبار ارتفاعا" معنويا" في اعداد الصفيحات الدموية في دم الحيوانات المعاملة بمبيد bifenthrin فقط اذ بلغت 772.5 × 10^3صفيحة/مل بالمقارنة مع معاملة السيطرة و البالغة 438.6 × 10^3صفيحة /مل في حين كانت لبكتريا *P. fluorescens* دورا ايجابيا" في ابقاء اعداد الصفيحات الدموية في دم الحيوانات المعاملة بالمبيد المعامل مسبقا" بهذه البكتريا ضمن المستويات الطبيعية اذ بلغت 557.5 × 10^3صفيحة/مل , اما البكتريا *B. subtilis* اقل فعالية في اختزال سمية هذا المبيد مقارنة بالبكتريا الاولى اذ بلغت اعداد الصفيحات الدموية 670.5 ×10^3صفيحة/مل من جانب اخر لم يكن لنوعي البكتريا المستخدمة في معالجة هذا المبيد اية تأثيرات سلبية على اعداد الصفائح الدموية في دم الحيوانات المعاملة بهاتين النوعين من البكتريا كلا" على حده اذ كانت ضمن المستويات الطبيعية (460.5 ×10^3صفيحة/مل و 488.6 × 10^3صفيحة/مل على التوالي . (شكل 23) .

ولا توجد دراسة متوفرة يمكن مقارنة نتائج هذه الدراسة معها باستثناء دراسة اشارة الى سمية هذا المبيد لحيوانات اناث الجرذ الابيض بتركيز 0.02 – 0.04 ملغم / كغم . (المسعودي , 2013) .



شكل (22) تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل اعداد خلايا الدم الحمراء لدى ذكور الجرذ الابيض



شكل (23) تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل اعداد الصفيحات الدموية لدى ذكور الجرذ الابيض

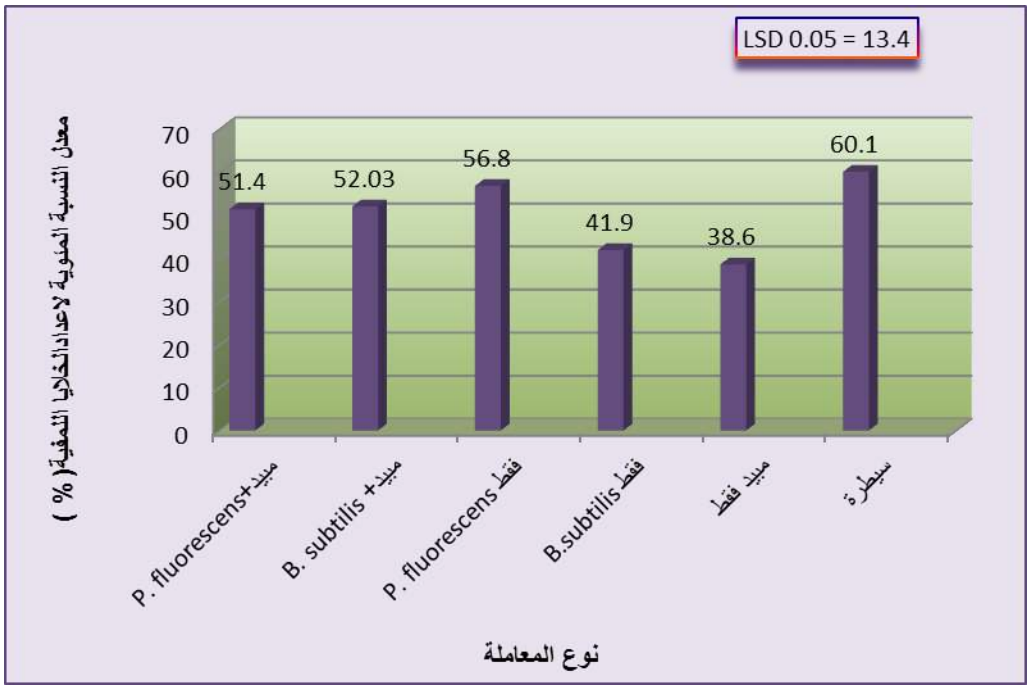
4- النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية

بينت نتائج التحليل الاحصائي المبينة في الشكل (24) الانخفاض المعنوي في النسبة المئوية لاعداد الخلايا اللمفية في دم حيوانات ذكور الجرذ المعاملة بمبيد bifenthrin فقط حيث بلغت النسبة 38.6 % بالمقارنة مع معاملة السيطرة والبالغة 60.1 % , بينما ارتفعت النسبة عند معاملة الحيوانات بالمبيد المعامل مسبقا" بالبكتريا *P. fluorescens* وكانت النسبة ضمن الحدود الطبيعية اذ بلغت 51.4 % و وفي معاملة المبيد مع بكتريا*B . subtilis* كان الارتفاع معنوي مقارنة بمعاملة المبيد فقط حيث بلغت النسبة 52.03 %

ولم يكن لنوعي البكتريا المختبره في معالجة هذا المبيد تاثيرات سلبية على النسبة المئوية لاعداد الخلايا اللمفية واتضح ذلك جليا" في بقاء نسب الخلايا اللمفية ضمن الحدود الطبيعية .

وجاءت النتائج مقاربة لما اشار اليه الشامي (2004) حول تأثير مبيد الديازينون في احداث خفض معنوي في العدد الكلي لخلايا الدم البيض في ذكور الفئران البيض المعاملة بالمبيد وتناسب الانخفاض

مع زيادة تركيز الجرعة وزيادة مدة التعرض . وان التأثير السمي للمبيد في الجرذان المعرضة له ادى الى تثبيط عملية تمايز خلايا نقي العظم Hematopoetic stem cells والخلايا اللمفية البائية .(Tucker, et al., 1986). و قد يكون سبب الانخفاض هو الاثر التثبيطي لانتاج الوسيط الخلوي IL–5 الذي يلعب دوراً هاماً في تمايز خلايا نقي العظم (Hooghe *et al* ., 2000) . وان إعطاء المبيد لحيوانات الجرذ يؤدي الى تحطيم الجهاز المناعي بصورة كاملة لان سميته مؤثرة على الجهاز المناعي وانه يعمل على تحطيم نخاع العظم ويقلل من عملية انتاج WBC (yousef *et al* , 2003) .



شكل (24) تأثير نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدل النسبة المئوية لأعداد الخلايا اللمفية لدى ذكور الجرذ الابيض

4. 2. 3. 2. الفحوصات النسجية

اظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من اعضاء الكلى واكباد والامعاء الدقيقة و الطحال لذكور الجرذ الابيض المعاملة بالمبيد الحشري bifenthrin ولخمسة جرع مقدار الجرعة الواحدة 100مايكروليتر / كغم وزن حيوان عدة تغيرات مرضية نسجية , ففي نسيج الكلى تمثلت التغيرات باحتقان وعائي مع ضمور واختفاء الكبيبة وتضخم جدارها اضافة الى التنخر الخلوي للكبيبة والنبيبات الكلوية . (صورة 21- 25- B1 , B2, B3) .

اما في نسيج الكبد فاحدث المبيد عدة تغيرات نسيجية تمثلت موت الخلايا الكبدية مع احتقان وعائي ونزف دموي اضافة الى التوسع في الاوعية الدموية مع التنخر الخلوي (صورة22 - 26- B1, B2, B3,B4.B5) .

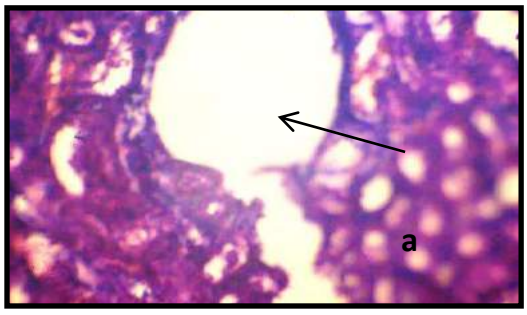
وفي الامعاء الدقيقة كان التأثير واضحا" من خلال التحلل للزغابات وظهور التقرح البؤري (Focal ulceration) والتنخر الخلوي . (صورة 23- 27- B1, B2) . وما يخص الطحال فكانت التغيرات متمثلة بالاحتقان الوعائي مع التوسع في الاوعية الدموية اضافة الى التنخر الخلوي والنزف الدموي . (صورة 24- 28- B1,B2, B3) .

بينما لم تظهر المعاملات المتمثلة بتجريع الحيوانات بالمبيد المعامل مسبقا" بعزلتي البكتريا *P.flurescens* و *B.subtilis* وكلا" على حده اي تغيرات او تأثيرات مرضية على الاعضاء المدروسة . وهذه يؤكد سلامة التعامل مع نوعي البكتريا وقدرتها على اختزال سمية المبيد الحشري وظهر ذلك واضحا" بدلالة سلامة المقاطع النسجية المدروسة (صورة 21- 22- 23- 24-25-26-27-28- D) .

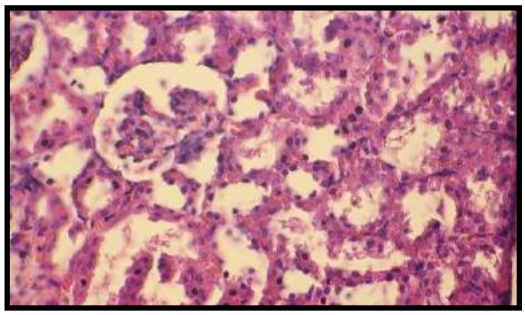
تطابقت النتائج جزئيا" مع العديد من الدراسات ومنها ما توصل اليه المسعودي(2013) , حيث اظهرت نتائج دراسته حول تأثيرات جرعات مختلفة من مبيد Bifenthrin حدوث تغيرات شكلية في اعضاء الجسم لاناث الجرذ الابيض قياسا مع مجموعة السيطرة وتمثلت تلك التغيرات الشكلية في الكبد و الكلى والرئتين وحدوث أورام في منطقة الصدر , هذا من ناحية التغيرات العيانيه , اضافة الى التغيرات النسجية المتمثله بتغير نسيج الكبد للمجموعة المعرضة للجرعة المسموح بها (0.02 – 0.04)ملغم / كغم وزن اذ ظهر احتقان الأوعية الدموية في الوريد المركزي الكبدي Central vein وتنخر الخلايا الكبدية Necrosis hepatic cell مقارنة مع مجموعة السيطرة .اضافة الى التأثيرات في نسيج الكلى والتي تمثلت بظهور الاحتقان دموي Congestion وضمور الكبيبات .

واكد Alina *et al*. (2012) ان مبيد bifenthrin احدث تغيرات نسجية في حيوان الضفدع تمثلت تلك التغيرات بحدوث أورام في الغشاء المحيط بالرئة مع تبقعها واحمرارها وتزداد حجم هذه الأورام مع ازدياد جرع المبيد وكذلك يودي الى ظهور أورام سرطانية في الكبد مع تغيرات نسيجية مرضية في الكبد والكلية . ويعود سبب ظهور الأورام الى ان ألمبيدات الحشرية وضمنها المبيد قيد الدراسة تعمل على بدء تكوين السرطان بواسطة تداخلها مع جزيئية DNA أو عن طريق تحفيزها للنمو غير الطبيعي للخلايا وفي هذه الحالة تسمى مواد محفزة للسرطان وربما يتكون السرطان بالمبيدات الحشرية نتيجة لحدوث طفرات وراثية في الحامض النووي DNA . واتفقت النتائج مع ما شار اليه ( ) Klassen *et al* 1996 من ان استعمال مبيد bifenthrin بتركيز شبه قاتلة 0.5 ملغم /كغم من وزن الجسم للضفادع اثبت حدوث اضرار سامة لهذا المبيد في تلك الحيوانات تمثلت الأضرار الكبدية بظهور فجوات في الخلايا الكبدية وكبر حجم الانوية وتنخر الخلايا الكبدية وتوسع في الشرايين الدموية , و يمكن أن يفسر ذلك الضرر على اعتبار ان تلك المبيدات هي مركبات ذات سمية عالية اذ تتميز بكونها ذات تاثير سمي للكبد وقد تبين ذلك من خلال تثبيطه أنزيمات متعددة مثل انزيمات Glutathion peroxidase و Catalase وهذان الأنزيمان مهمان في طرد الجذور الحرة السامة داخل الجسم وان تثبيطهما قد يؤدي إلى زيادة تراكم الجذور الحرة وعدم قدرة الكبد على ازالتها(Tsokos ,1989). وصف Alina *et al* (2012) في دراسته لمبيد bifenthrin المجرع للضفادع بتركيز شبه قاتلة (0.5) ملغم /كغم من وزن الجسم , اثبت حدوث اضرار سامة لهذا المبيد في تلك الحيوانات تمثلت الأضرار الكلوية انكماش او تصلب الكبيبة وتنخر نبيبي وحدوث تنخر في الخلايا الظهارية وظهور نوى الخلايا الكلوية Pycnotic واحتقان دموي و وذمة Odem . وجاءت النتيجة مشابه مع دراسة قام بها Szepietowski & Adamiec (1987) في دراستهم لتأثير مبيد الدايكوات في ذكور واناث الأرانب البيض اذ أن إعطاء جرع مختلفة من (1- 100)ملغم\كغم تعمل على إحداث تغيرات مرضية واضحة في الكلية تتمثل بزيادة الفجوات في الأنابيب الملتوية القاصية مع وجود تنخر في الخلايا الكلوية .ان التغيرات في نسيج الكلية للمجموعة المعرضة لجرع المبيد تمثلت باحتقان دموي Congestion blood و انكماش في الكبيبة atrophy glomerulo و يمكن ان يفسر على ان الكلى لها الدور الاساسي في عملية حفظ التوازن المائي داخل الجسم وذلك من خلال التحكم في كمية الماء المطروح عن طريق النبيبات الكلوية من خلال عمليات التشريح التي تجري فيها وان مجموعة مبيدات Pyrethroid وضمنها المبيد قيد الدراسة تودي الى التعطيل هذه الوظيفة التي تقوم بها النبيبات الكلوية من خلال تأثيرها على تلك العمليات الترشيحية من خلال فقدان الكبيبة لوظيفتها وحدوث لها الانكماش وبالتالي فقدان الكلية للوظيفة الاساسية لها (Osman.,*et al* ., 2009) . من جانب اخر ا ظهرت نتائج الفحوصات النسيجية

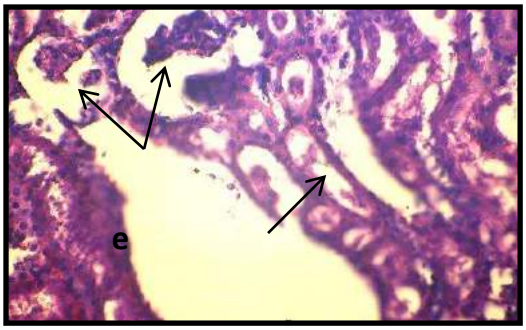
لاعضاء الحيوانات المعاملة بالمبيد Bifenthrin والمعالج مسبقا" بنوعي البكتريا *P.flurescens* و *B subtilis* . سلامة تلك الانسجة من اية تغيرات مرضية وهذا يعني ان المبيد\ او نواتج تحلله قد فقدت الفعالية السمية للانظمة الحيوية لحيوانات ذكور الجرذ الابيض بفعل المعاملة بالبكتريا بنوعيها ولعدم توفر مصادر علمية لمقارنة نتائج هذه الدراسة معها فانه يمكن ان تقارن النتائج مع دراسات اخرى تناولت موضوع التحلل الحيوي لمبيدات اخرى وبفعل احياء دقيقة اخرى مختلفة تم التطرق اليها في الفقرة (4. 2. 3. 1. 1.) .



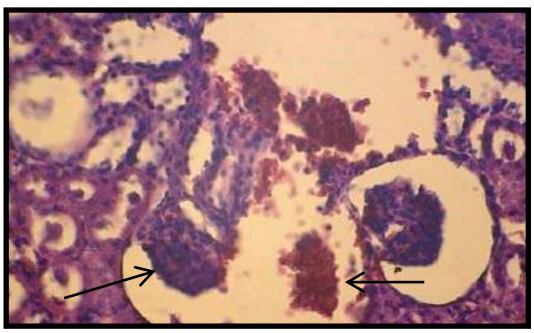
B1



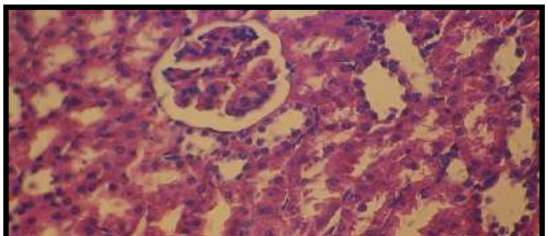
A

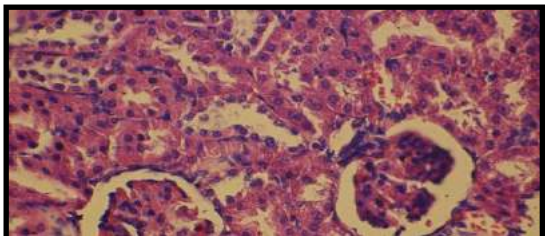


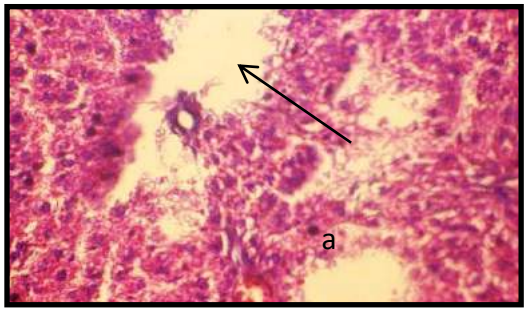
B2



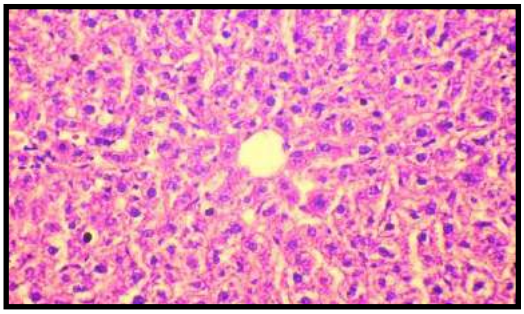
B3



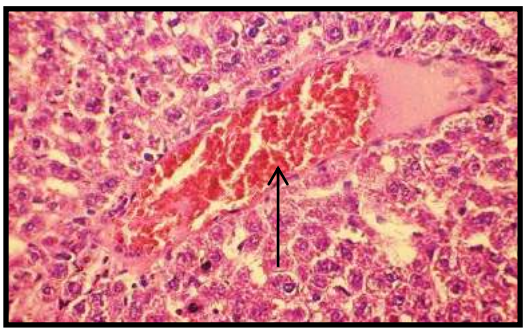




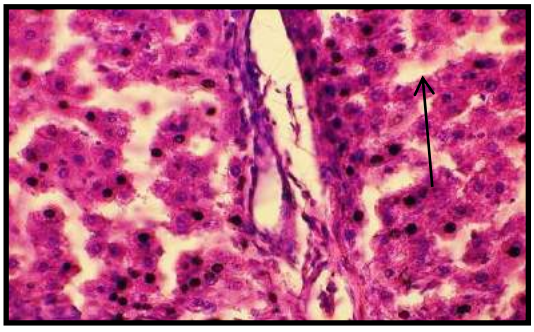
B1



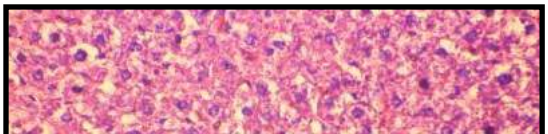
A

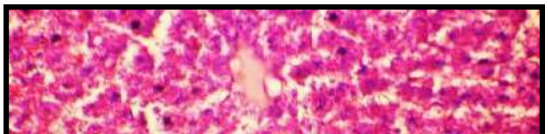


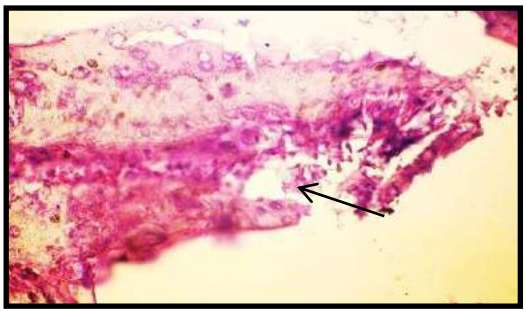
B2



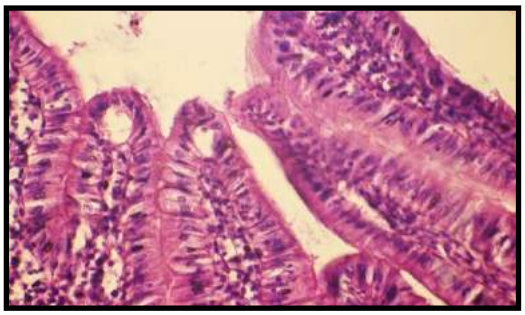
B3



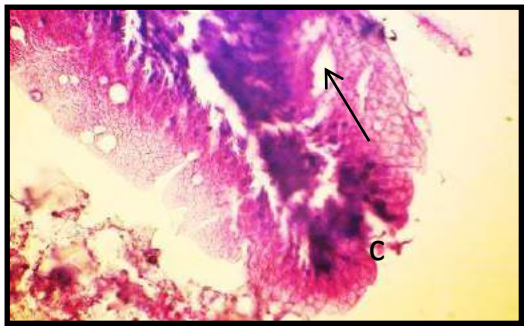




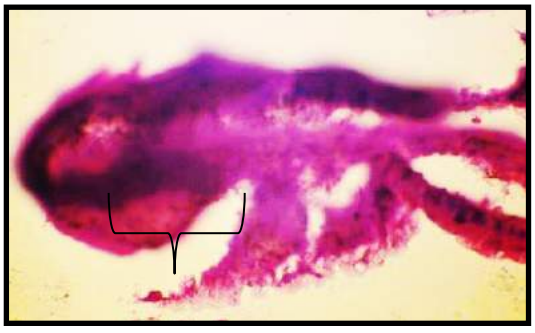
B1



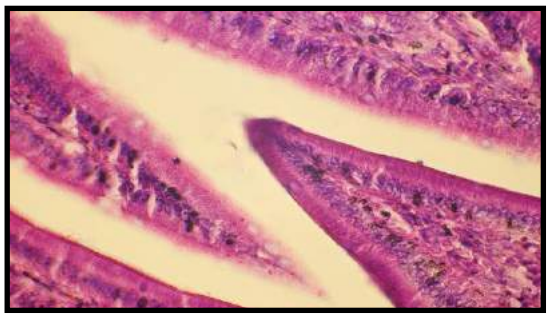
A



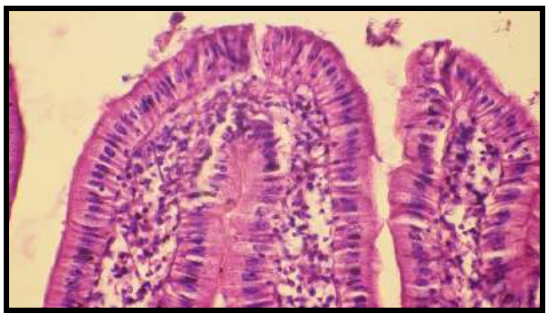
B2



B3

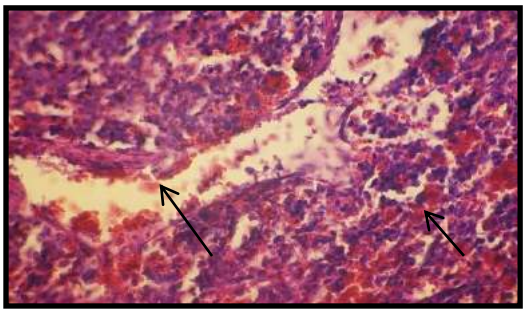


D

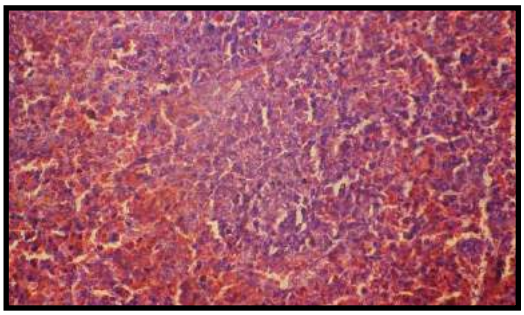


C

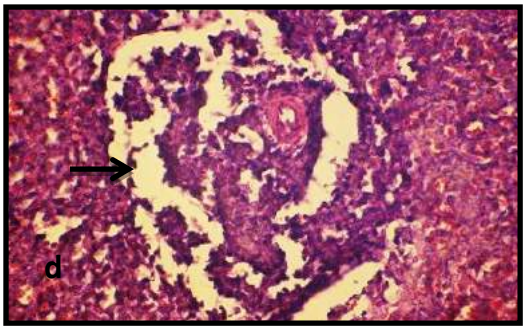
صورة (23) مقطع في نسيج الامعاء الدقيقة لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة



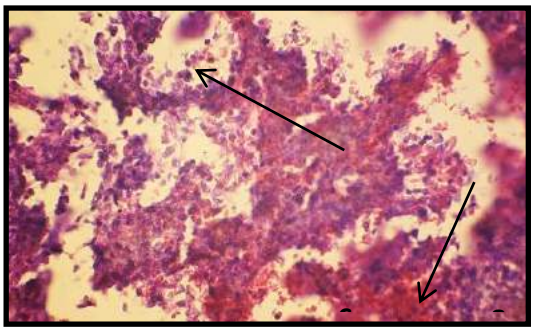
B1



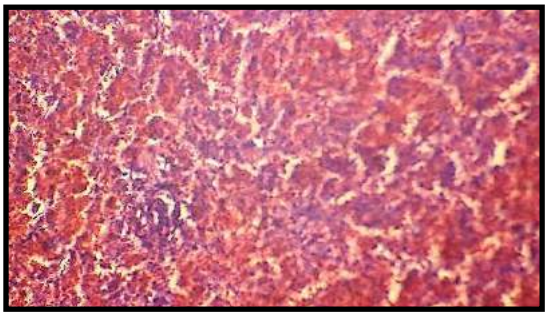
A



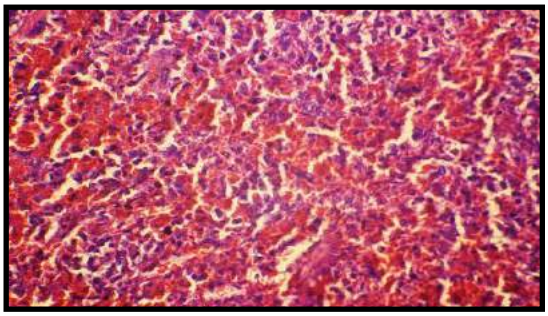
B2



B3



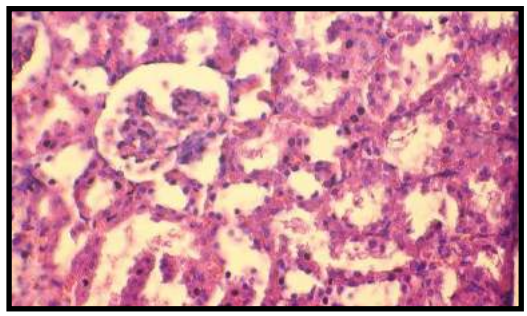
D



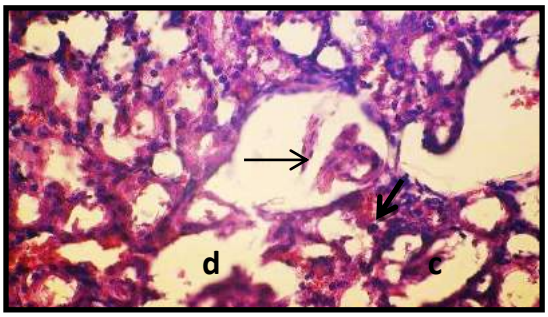
C

صورة (24) مقطع في نسيج الطحال لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا .*Pseudo*+ المبيد(D) معاملة بكتريا .*Pseudo* فقط (قوة تكبير X 40) .

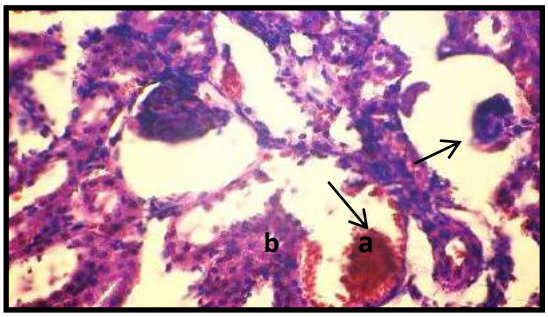
a- نزف دموي , b- احتقان وتوسع وعائي , c- موت الخلايا , d – تنخر الفص الابيض



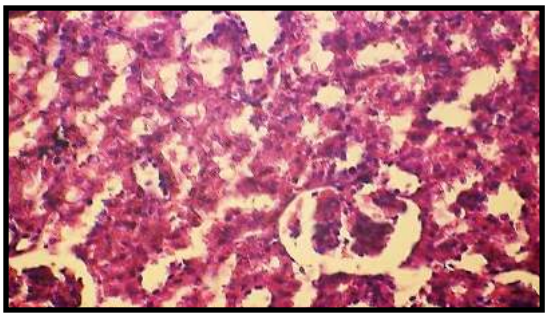
A



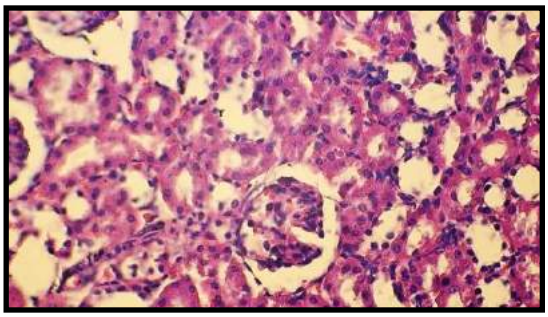
B1



B2



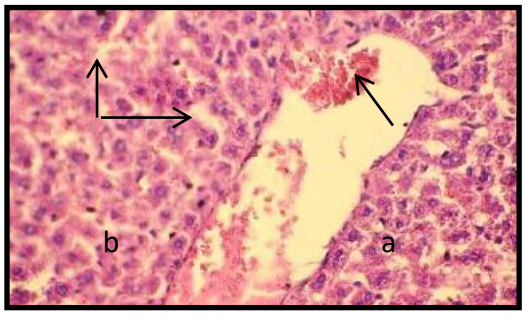
D



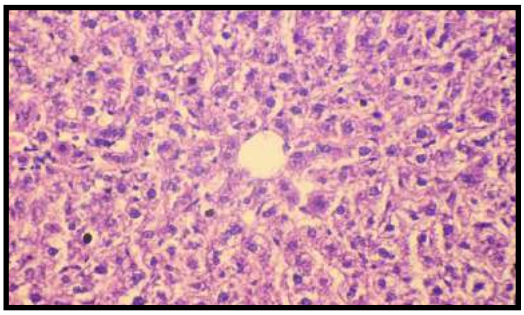
C

صورة (25) مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير 40 X)

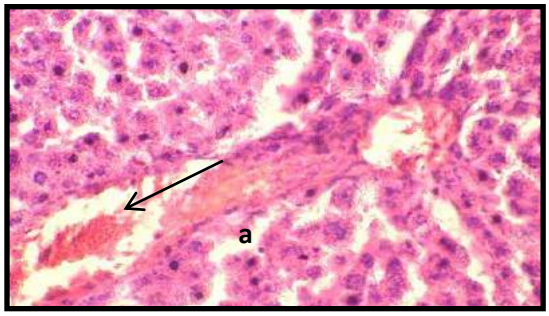
a -ضمور الكبيبة , b- نزف دموي للكبيبة , c– تنخر خلوي , d – تحلل الكبيبة .



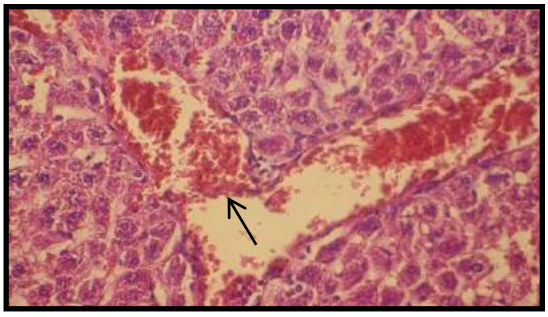
B1



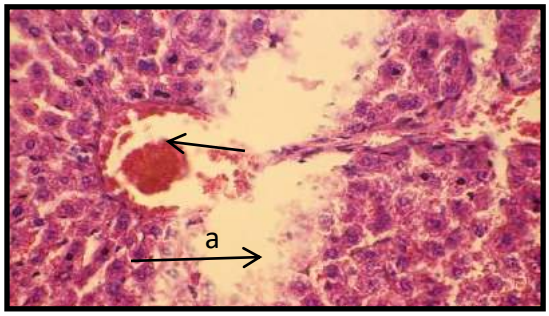
A



B2

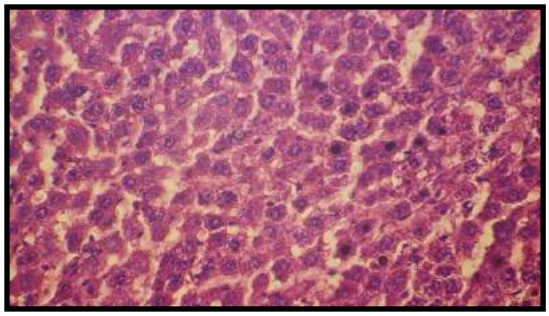


B3

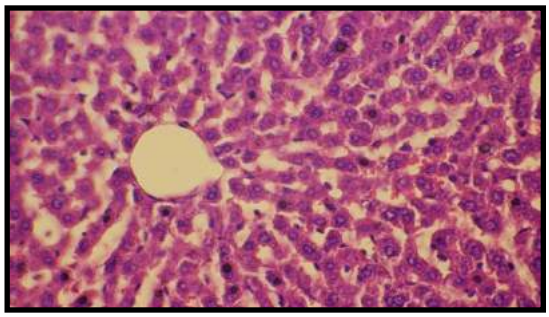


B4

B5



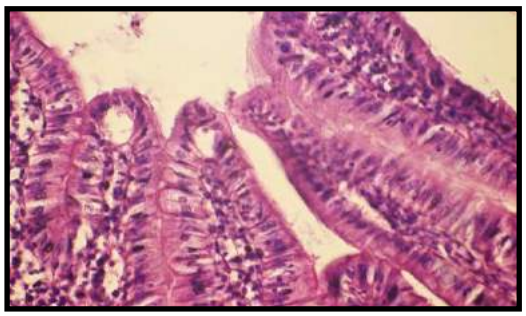
D



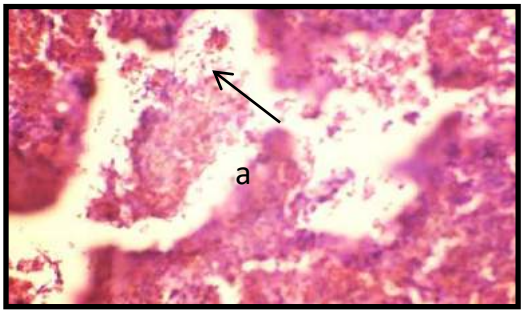
C

صورة (26) مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ الابيض تجربة المبيد (A) معاملة السيطرة (B) معاملة االمبيد فقط (C) معاملة البكتريا *Bacillus*+ المبيد (D) معاملة بكتريا *Bacillus* فقط . (قوة تكبير X 40)

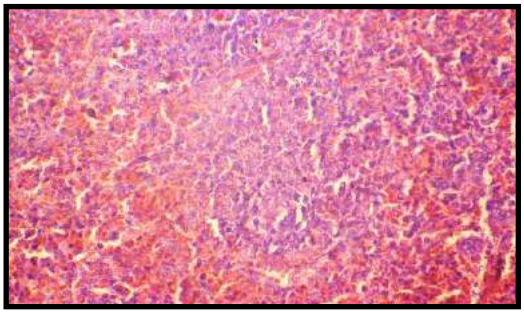
a- احتقان مع توسع وعائي , b- تحلل الخلايا , c – تنخر خلوي



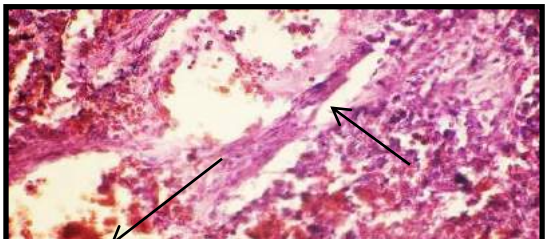
A

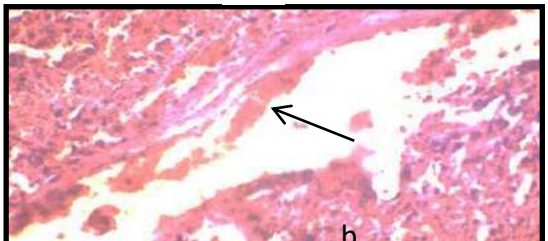


B1



A





4. 2. 4. تاثير مبيد Bifenthrin في نمو نوعي بكتريا *B. subtilis* و *P.fluorescens*

تشير النتائج الموضحة في الجدول(5) عدم وجود تاثيرات سلبية على نمو نوعي البكتريا *P.fluorescens* و*B. subtilis* المنماة على وسط N. A. المعامل بتركيزين من هذا المبيد وكلا" على حده اذ بلغ معدل لوغارتم اعداد البكتريا الاولى 11.6 (5 × 10^{11} و.ت.م./ مل) و 11.4 (3× 10^{11} و.ت.م./ مل) عند تركيزي المبيد (10 و 20) % على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة والتي كان معدل لوغارتم اعداد نفس البكتريا 10.7 (0.9 × 10^{11} و.ت.م./ مل) اما معدل لوغارتم اعداد خلايا بكتريا *B. subtilis* فكانت 9.8 (7.2 × 10^{9} و.ت.م./ مل) و 9.2 (2 × 10^{9} و.ت.م./ مل) عند

التركيزين (10 و 20) % من المبيد في الوقت الذي كان معدل لوغارتم اعداد خلايا بكتريا معاملة السيطرة (غير المعاملة بالمبيد) 8.9 (1×10^9 و.ت.م./ مل) .

وبالنظر لعدم وجود دراسات سابقة بحسب المصادر المتوفرة عن استخدام نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* في معالجة مبيد Bifenthrin عليه سيتم مقارنة نتائج هذه الدراسة مع دراسات مقاربة لما وجده Ortiz *et al.*(2010) في المكسيك من فعالية انواع البكتريا *Stenotrophomonas malthophilia* و *Proteus vulgaris* و *Vibrio metschinkouii* و *Serratia ficaria* و *Serratia* spp. و *Yersinia euterocolitica* في تحطيم مبيد tetrachlorvinphos TCV في الاوساط الغذائية الغنية ولكن على الاوساط الفقيرة والحاوية على مبيد TCV فقط كمصدر للكاربون وجد ان عزلة واحدة استطاعت النمو وتحليل المبيد , وتم الكشف عن التحلل باستخدام تقنية(Gas- GC) chromotography-mass . في بولندا وجد ان عزلات البكتريا *Pseudomonas luteola* و *P. fluorescens* وثلاث عزلات *Bacillus megaterium* وعزلة واحدة من *B. licheniformes* قادرة على تحلل المبيد الفطري Carbendazin وكانت نسب التحلل مختلفة تبعا لاختلاف مدة الحضن مع البكتريا ففي 20 يوم حضانة كانت نسبة التحلل لمبيد 32% وارتفعت هذه النسبة الى 44% بعد مرور 40 يوم من الحضن في حين وصلت الى 53 % بعد مرور 60 يوم حضن , واتبعت تقنية HPLC في الكشف عن مقدار نسب التحلل للمبيد (Kalwasinska *et al.*, 2008) .

وجد (Thabit &EL- Naggar(2013 في دراسة اجريت في السعودية ان خمسة انواع من البكتريا هي *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus amyloliquefaciens* و *Staphylococcus sciuri* و *Bacillus pseudomycoides* و *B. licheniformis,* قادرة على تحطيم مبيد malathion مبيد حشري فسفوري وقد ظهر مركبين جديدين سميا malathion monocarboxlic و malthion dicarboxylic acid كنواتج لعملية تحلل المبيد الاصلي وقد استخدمت تقنية GC في الكشف عن نواتج التحلل .

جدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من مبيد bifenthrin في معدل اعداد الخلايا لنوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis*

البكتريا	*P. fluorescens*	*B. subtilis*

تركيز المبيد (%)	معدل اعداد البكتريا (و.ت. م. /مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل	معدل اعداد البكتريا (و.ت. م. /مل)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل
10	5×10^{11}	11.6	7.2×10^{9}	9.8
20	3×10^{11}	11.4	2×10^{9}	9.2
Con.	0.9×10^{11}	10.7	1×10^{9}	8.9
L.S.D.(0.05)		**0.45**		**0.39**

4. 2. 5. المعالجة الاحيائية لمبيد Bifenthrin بدليل نسبة الانبات لحبوب بعض المحاصيل

4. 2. 5. 1. حساب نسب الانبات لبعض انواع الحبوب المعاملة بالمبيد (في الاطباق)

اشارت نتائج هذا الاختبار التفاوت في نسب الانبات لحبوب ثلاثة انواع من المحاصيل هي الشعير والحنطة و الذرة الصفراء والمعاملة بأربعة تراكيز من مبيد Bifenthrin الممزوج مع عالق عزلتي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده وحسب المعاملات المدونة في الجدول (6) . حيث بينت النتائج فعالية العزلتين في اختزال سمية المبيد الكيمياوي قيد الدراسة وذلك من خلال حساب معدلات نسب (%) انبات حبوب تلك المحاصيل , فيلاحظ ان بكتريا *B. subtilis* في معاملة البكتريا مع المبيد بتركيز5مايكروليتر/100مل , والمتمثل بادنى تركيز اعطت نسبة انبات في حبوب الشعير 90% وفي حبوب الحنطة 100% اما في الذرة الصفراء فكانت النسبة 30% , بينما في معاملة المبيد فقط عند نفس التركيز بلغت النسبة في محصول الشعير 90% والحنطة 30 % وفي الذرة بلغت النسبة

30% ايضا" , وانخفضت نسبة الانبات عند التركيز الاعلى للمبيد البالغ 100مايكروليتر/100مل وكانت النسبة في معاملة البكتريا مع المبيد في محصولي الشعير والحنطة 70% اما في الذرة الصفراء فانخفضت النسبة الى 6.6 % وفي معاملة المبيد فقط باعلى تركيز فقط محصول الشعير اعطى نسبة انبات وصلت الى 60% بينما كانت النسبة 0% لمحصولي الحنطة والذرة الصفراء , اما في ما يخص معاملة البكتريا فقط فقد كانت النسبة (98.3 و 100 و 85) % لكل من الشعير والحنطة والذرة الصفراء على التوالي , في حين كانت في مجموعة السيطرة البالغة 96.6% للحبوب الشعير و 90% لحبوب الحنطة اما في الذرة فبلغت 73.3 % .

اما ما يخص فعالية عزلة البكتريا *P. fluorescens* في اختزال سمية مبيد Bifenthrin فتفوقت في قدرتها في الاختزال على عزلة *B. subtilis* ولنفس التراكيز وكما موضح في جدول(7) .

حيث بلغت نسبة الانبات عند ادنى تركيز من المبيد الكيمياوي الممزوج مع البكتريا 93.3% لحبوب الشعير بينما كانت النسبة 85% لحبوب الحنطة و 66.6% للذرة الصفراء , اما في التركيز الاعلى (100 مايكروليتر/100مل) كانت فعالية الاختزال واضحة من خلال النسب في انبات الشعير والبالغة 76.6% و 90% للحنطة و 10% للذرة الصفراء , اضافة الى ان النسب في الانبات عند معاملة المبيد فقط بالتركيز الادنى فبلغت (90 و 30 و30) % وفي التركيز الاعلى (67 و 0 و 0) % للمحاصيل الثلاثة على التوالي وكان التفاوت في النسب معنويا عند المقارنة مع معاملة السيطرة والتي كانت النسب فيها 96.6% للشعير و 100% للحنطة و 83.3% للذرة . اما في المعاملة المتمثلة بالبكتريا فقط فكانت النسب100% لحبوب الشعير والحنطة و 83.3% للذرة الصفراء .

جدول (6) اختبار فعالية بكتريا *B. subtilis* في اختزال سمية المبيد الكيمياوي Bifenthrin بدلالة معدلات نسب انبات (%) حبوب بعض انواع المحاصيل (في الاطباق) .

نوع المحصول / المعاملات	الشعير	الحنطة	الذرة الصفراء
بكتريا + المبيد (5مايكروليتر/100مل)	90	100	30
بكتريا + المبيد (25مايكروليتر/100مل)	86.6	83.3	20
بكتريا + المبيد (50مايكروليتر/ 100مل)	76.6	73.3	13.3
بكتريا + المبيد (100ايكروليتر /100مل)	70	70	6.6
المبيد فقط (5مايكروليتر/100مل)	90	30	30
المبيد فقط (25مايكروليتر/100مل)	76	30	20

10	20	70	**المبيد فقط (50مايكروليتر /100مل)**
0	0	60	**المبيد فقط (100مايكروليتر/100مل)**
85	100	98.3	**البكتريا فقط**
73.3	90	96.6	**السيطرة**
14.5	**10.6**	**10.8**	**L.S.D.(0.05)**

جدول (7) اختبار فعالية بكتريا *P. fluorescens* في اختزال سمية المبيد الكيمياوي Bifenthrin بدلالة معدلات نسب انبات (%) حبوب بعض انواع المحاصيل في الاطباق .

نوع المحصول / المعاملات	الشعير	الحنطة	الذرة الصفراء
بكتريا + المبيد (5مايكروليتر/100مل)	93.3	85	66.6
بكتريا + المبيد (25مايكروليتر/100مل)	86.6	83.3	56.6
بكتريا + المبيد (50مايكروليتر/ 100مل)	80	76.6	66.6
بكتريا + المبيد (100ايكروليتر /100مل)	76.6	90	10
المبيد فقط (5مايكروليتر/100مل)	90	30	30
المبيد فقط (25مايكروليتر/100مل)	75	25	20
المبيد فقط (50مايكروليتر /100مل)	70	20	10
المبيد فقط (100مايكروليتر/100مل)	67	0	0

88	100	100	**البكتريا فقط**
83.3	100	96.6	**السيطرة**
15.8	**10.6**	**8.2**	**L.S.D.(0.05)**

4. 2. 6. تصنيع مستحضرات حيوية من لقاح نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis*

4. 2. 6. 1. تحديد الوسط التخمري المناسب لتنمية لقاح نوعي البكتريا

أظهرت نتائج هذا الاختبار تفوق مستخلص حبوب الذرة الصفراء على بقية المستخلصات المختبرة من حيث ملائمتها لنمو وتكاثر نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B.subtilis* اذ بلغ معدل لوغارتيم اعداد البكتريا 11.3 (2.3 × 10^{11} و. ت. م. / مل) و 9.8 (7.7 × 10^{9} و. ت. م. / مل) على التوالي في حين كان معدل لوغارتم اعداد نوعي البكتريا في معاملة السيطرة (المرق المغذي) 10.8 (0.7 × 10^{11} و. ت. م. / مل) و 9 (1 × 10^{9} و. ت. م. / مل) على التوالي . (جدول 8)

واتفقت هذه النتيجة مع ما توصلت اليه الجبوري (2012) في دراستها المتمثلة بتفوق مستخلص حبوب الذرة الصفراء وبفارق معنوي عن وسط المرق المغذي كوسط تخمري ملائم لنمو عزلتي بكتريا *B.subtilis* و *P. fluorescens* وهذا يوافق ايضا" ما توصلت اليه العبيدي (2011) من تفوق وسط مستخلص مخلفات الحنطة وبشكل معنوي عن مستخلصي الذرة الصفراء ومستخلص الشعير كوسط تخمري ملائم لنمو واكثار بكتريا *B. licheniformis* وكذلك تفوق مستخلصي مخلفات الحنطة وبذور

الذرة الصفراء كأوساط تخمرية لإكثار وانتاج اللقاح البكتيري لبكتريا *P. fluorescens* وبفارق معنوي عن مستخلص الشعير .

وتتقارب النتائج مع ما توصل اليه كاظم (2002) من ان افضل الاوساط التخمرية لزيادة اعداد البكتريا *Azospirillium irakinse* هو منقوع الذرة الصفراء لما تحتويه هذه الحبوب على عدد من العناصر الغذائية والمعدنية خصوصاً السكريات والاحماض الامينية المهمة لنمو البكتريا اضافة الى العناصر المعدنية الكبرى والصغرى كالبوتاسيوم والحديد والكالسيوم والصوديوم التي تحفز زيادة معدلات انقسام الخلايا الخضرية للبكتريا وسرعة انقسامها وهذا له الاثر الكبير في زيادة اعداد البكتريا اضافة الى احتوائها على الفيتامينات وخصوصاً فيتامين B . (Anhwange, 2008) .

جدول (8) تأثير نوع الوسط التخمري في نمو نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B.subtilis*

البكتريا / نوع الوسط	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
	معدل اعداد البكتريا (و. ت.م.)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل	معدل اعداد البكتريا (و.ت.م.)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل
وسط الحنطة	1.3×10^{11}	11.1	3.2×10^{9}	9.4
وسط الذرة	2.3×10^{11}	11.3	7.7×10^{9}	9.8
وسط المرق المغذي	0.7×10^{11}	10.8	1×10^{9}	9
L.S.D.(0.05)	0.34		0.19	

4. 2. 6. 2. تحديد مادة التحميل المناسبة لإنتاج المستحضر الحيوي لنوعي البكتريا

تشير النتائج الموضحة في الجدول (9) الى تفوق مادة كاربونات الكالسيوم وبفارق معنوي كمادة حاملة للقاح عزلتي البكتريا *P.fluorescens* و *B.subtilis* مقارنة بمواد الكاؤولين والبتموس Petmose , اذ بلغ معدل لوغارتم اعداد البكتريا لعزلة *P.fluorescens* 11.8 (7.2 × 10^{11} و. ت. و. /غم مادة حاملة) , وفي عزلة البكتريا *B.subtilis* بلغ المعدل 6.4 (6.4 × 10^{9} و. ت. م. /غم) في حين تراجع المعدل عند استعمال مادة الكاؤولين كمادة حاملة لكلا العزلتين وصولا" الى11.1 (1.3 × 10^{11} و. ت. و. / غم) . للعزلة الاولى في حين بلغ 9.8 (3×10^{9} و. ت. م. / غم) للعزلة الثانية , وعند استخدام مادة Petmose كمادة حاملة انخفض المعدل لبكتريا *P.fluorescens* الى11.3 (2.7 × 10^{11} و. ت. م. /غم) . بينما لبكتريا *B.subtilis* وصل المعدل الى9.1 (1.5 × 10^{9} و. ت. م. / غم) .

هذه النتائج توافق مع ما توصلت اليه العبيدي (2011) , والتي اشارت الى كفاءت مادة كاربونات الكالسيوم بوصفها مادة حاملة للقاح البكتريا *B. licheniformis* و *P.fluorescens* اذ اثبتت المادة كفاءة عالية في تنمية لقاح عزلتي البكتريا المذكورة .

وتماثلت النتائج مع ما توصل اليه العاشور (2009) حيث اثبت ان لمادة كاربونات الكالسيوم كفاءة عالية كمادة حاملة للقاح البكتريا *B.subtilis*KB1 وكان معدل اعداد الخلايا 1.78 × 10^{13} وحدة تكوين مستعمرة / غم مادة حاملة .

جدول (9) تاثير نوع المادة الحاملة في معدل اعداد الخلايا البكتيرية لكل من نوعي*P. fluorescens* و *B. subtilis* في الغرام الواحد من المادة الحاملة.

البكتريا / نوع المادة الحاملة	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
	معدل اعداد البكتريا (و. ت. م. /غم)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/غم	معدل اعداد البكتريا (و. ت. م. /غم)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/غم
$CaCo_3$	7.2×10^{11}	11.8	6.4×10^{9}	9.4
الكاؤولين	1.3×10^{11}	11.1	3×10^{9}	9.8
Petmose	2.7×10^{11}	11.3	1.5×10^{9}	9.1
L.S.D.(0.05)	0.44		0.19	

4. 2. 6. 3. تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة

بينت نتائج التحليل الاحصائي جدول (10) وجود فروقات معنوية بين معدلات لوغارتم اعداد البكتريا في الغرام الواحد عند تحميل الوسط الزرعي المنماة عليه نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B.subtilis* كلا" على حده على المادة الحاملة (كاربونات الكالسيوم $CaCo_3$) اذ بلغ المعدل عند النسبة (1 : 1) 11.8 (7.1×10^{11} و. ت. م. / غم) و 9.8 (6.6×10^{9} و. ت. م. / غم) على التوالي في حين كانت معدلات لوغارتم اعداد نوعي البكتريا عند النسبة (1 : 2) اقل من سابقتها اذ بلغت 11.4 (5.2×10^{11} و. ت. م. / غم) و 9 (1.5×10^{11} و. ت. م. / غم) على التوالي .

وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه العبيدي (2011) حيث انخفضت اعداد عزلتي البكتريا *B. thuringiensis* و *Ps. fluorescens* عند استخدام نسبة (1 : 2) وسط الى المادة الحاملة $CaCo_3$

لتصل الى 8.2× 10^8 – 7.3 × 10^8 وحدة تكوين مستعمرة / غم على التوالي بينما ارتفعت في (1 :1)

البكتريا	*P. fluorescens*	*B. subtilis*

لتصل الى 2.21 × 10^9 – 2.10 × 10^9 وحدة تكوين مستعمرة / غم للعزلتين على التوالي .

كذلك اتفقت النتيجة مع ما توصل اليه عبود (2005) عند استخدام نسبة 1 : 1 (مستخلص الشعير المنمى فيه *B. thuringiensis* : كاربونات الكالسيوم) والتي اعطت اعداد جيدة للبكتريا عند أستعمالها في تصنيع مستحضر حيوي .

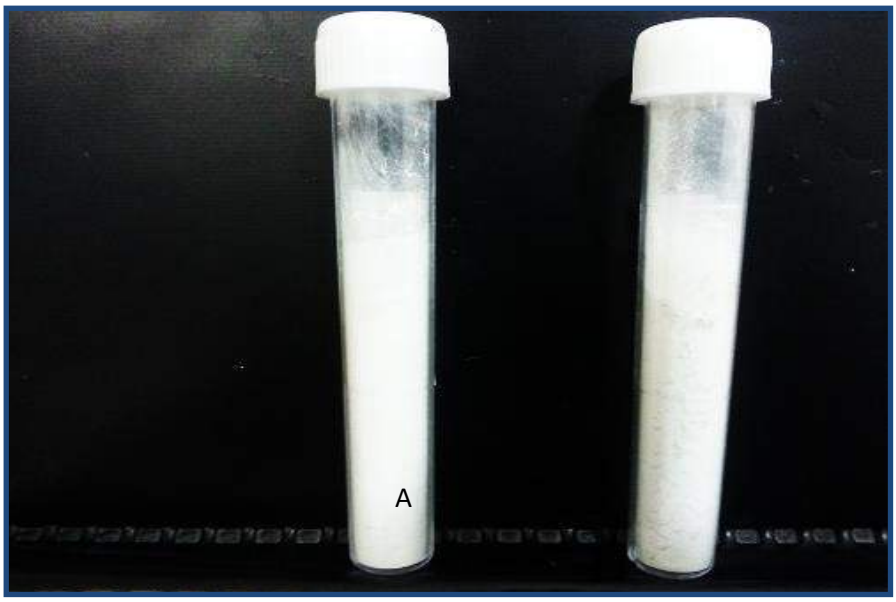
وهذا يتفق ايضا مع ماتوصل اليه العاشور (2005) عند استخدامه نسبة 1 : 1 (مستخلص الذرة البيضاء المنمى فيه *B. cereus* : كاربونات الكالسيوم) والتي بلغت اعداد البكتريا 2.33 × 10^8 وحدة تكوين مستعمرة / غم قياسا بالنسب الاخرى التي اختبرها 1 : 2 و 1 : 4 وبلغت اعداد البكتريا 2.82 × 10^6 وحدة تكوين مستعمرة / غم و 1.57 × 10^6 وحدة تكوين مستعمرة / غم على التوالي .

جدول (10) تأثير نسبة الوسط التخمري الى المادة الحاملة على معدل اعداد خلايا نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* في الغرام الواحد من المادة الحاملة

	معدل اعداد البكتريا (و.ت.م .)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/غم	معدل اعداد البكتريا (و. ت. م.)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/غم
1 : 1	7.1×10^{11}	11.8	6.6×10^{9}	9.8
2 : 1	5.2×10^{11}	11.4	1.5×10^{9}	9.1
L.S.D.(0.05)	0.20		0.22	

4. 2. 6. 4. تصنيع المستحضر الحيوي النهائي

تم اعتماد نسبة 1 وسط تخمري : 1 مادة حاملة كاربونات الكالسيوم في تصنيع تحضيرتين من نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* وكلا" على حده اذ استخدم وسط مستخلص الخميرة كوسط تخمري لتنمية نوعي البكتريا كلا" على حده كونه الافضل من حيث الكتلة الحيوية المنتجة فيه عند تنمية نوعي البكتريا وفقا" لنتائج الاختبار المبين في الفقرة (4. 2. 6. 1.) كما استخدمت مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للمستحضرات المصنعة كونها الاكثر ملائمة من بقية المواد الحاملة الاخرى وكما اثبت في الفقرة (4. 2. 6. 2.) وتم اضافة مادة لاصقة واخرى منشطة للتحضيرة النهائية للمستحضرات الحيوية . وكل مستحضر حيوي من هذين المستحضرين يمكن ان يكون بصورتين الاولى كمسحوق قابل للبلل (صورة 29) . واخرى بهيئة كبسول وبجرعتين (250 و 500) ملغم . (صورة 30) .



صورة (29) تحضيرة من المستحضر الحيوي على شكل مسحوق قابل للبلل

A- مستحضر حيوي لبكتريا *B. subtilis* و B – مستحضر حيوي لبكتريا *P. fluorescens*

صورة (30) تراكيز متدرجة من المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* مكبسلات مبلمرة

A- مستحضر بكتريا *B. subtilis* تركيز 500ملغم , B- مستحضر بكتريا *B. subtilis* تركيز 250ملغم

C - مستحضر بكتريا *P. fluorescens* تركيز 500ملغم , D - مستحضر بكتريا *P. fluorescens* تركيز 250ملغم

4. 2. 6. 5. اختبار فعالية المستحضر الحيوي في تحطيم مبيد Bifenthrin الملوث للتربة

اشارت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة في جدول (11) التأثير المعنوي للمستحضرين الحيويين المصنعين من لقاح نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B . subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد Bifenthrin وذلك من خلال معدلات نسب انبات حبوب الحنطة في التربة ولفترتين زمنيتين بعد 5 – 10 ايام من زراعة الحبوب , حيث بلغت نسبة انبات حبوب الحنطة المعاملة بالمبيد مع مستحضر بكتريا *P. fluorescens* بعد خمسة ايام 70.7% بينما بلغت النسبة بعد عشرة ايام 79.1 %, اما في معاملة الحبوب بالمستحضر الحيوي فقط فبلغت النسبة بعد 5 – 10 ايام (70.6 – 79.4) % على التوالي بينما انخفضت نسبة الانبات بمعاملة المبيد فقط الى الصفر في كلا الفترتين , في حين كانت فعالية

البكتريا *B . subtilis* اقل من البكتريا *P. fluorescens* في تحطيم المبيد اذ بلغت نسبة الانبات في معاملة *B . subtilis* مع المبيد 50.6 % مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغة 70.8 % . وكانت نتائج انبات الحبوب في معاملة البكتريا *P. fluorescens* فقط افضل من معدل انبات الحبوب في معاملة السيطرة اذ بلغت في معاملة البكتريا فقط 79.4 % في حين بلغت 70.0 % في معاملة السيطرة .

جاءت هذه النتائج مقاربة لدراسة اجريت في السعودية حول التحري عن قابلية خمسة سلالات بكتيرية معزولة من التربة *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus amyloliquefaciens* , *Staaphylococcus sciuri* و *Bacillus pseudomycoides* و *B. licheniformis,* على تحطيم مبيد malathionالفوسفاتي العضوي (مبيد حشري) حيث اظهرت الدراسة عدم وجود أي تاثيرات معنوية في المبيد للسلالة *Bacillus amyloliquefaciens* , و *Staaphylococcus sciuri* ولكن بقية السلالات الثلاث كان لها تاثير معنوي واضح في الزيادة في نسبة تحلل مبيد الملاثيون واستخدامه كمصدر للطاقة والكاربون , وبينت النتائج ظهور مركبين جديدين سميا malathion monocarboxlic و malthion dicarboxylic acid كنواتج لعملية التحلل , وقد استخدمت تقنية GC في الكشف عن نواتج التحلل .(Thabit & EL- Naggar , 2013) .

كذلك تقاربت النتائج مع ما توصل اليه Olawale & Akintobi (2011) حيث استعملت ثلاث سلالات بكتيرية تم عزلها من ترب زراعية ملوثة بشكل كبير بمبيد Glyphosate الحشري حيث كانت قادرة على تحليل (1000 ppm) من المبيد وشخصت على انها *Pseudomonas putida,* و *P. aeruginosa* و *Acetobacter faecalis,* اختبرت السلالات بشكل مفرد في قدرتها على التحطيم واعطت تاثيرات معنوية وكذلك عند مزج السلالات الثلاث معا , وقد تدرجت نسبة التثبيط للمبيد وصولا الى الصفر بعد فترة تحضين تراوحت من (12 – 96 ساعة) باختلاف السلالات. وقد لوحظ زيادة في عدد المستعمرات النامية للبكتريا بعد عملية التحلل دليلا على اعتمادها لمبيد الكلايفوسيت كمصدر غذائي .

فيما اشارت دراسة اخرى الى امتلاك بعض انواع الفطريات والبكتريا المعزولة من منطقة rhizospher كالبكتريا العصوية وفطريات *Aspergillus* spp. فعالية واضحة في تحلل المبيد الحشري Chlorpyrifos حيث بينت النتائج ان نسبة التحلل تراوحت بين (76 – 84.5) % للفطر والبكتريا على التوالي (Hindumathy & Gayathri , 2013) .

وقد يعود سبب تفوق معاملات المستحضر الحيوي لبكتريا *P. fluorescens* في زيادة معدلات نسب الانبات في هذه الدراسة الى قدرة البكتريا على انتاج الهرمونات النباتية المنظمة للنمو وخاصة الجبريلينات والاوكسينات مثل الاندول حامض الخليك IAA و كذلك للجبريلنات دور مهم في انبات البذور اذ تعمل على تحفيز طبقة Aleruon layer المحيطة بالبذور لتكوين الانزيمات الحالة للنشا كانزيمات β- amylase و α- amylase وانواع مختلفة من انزيم Protease والتي تحول النشا الى السكر مما يدفع نمو الجنين وتحويله الى بادرة (محمد و اليونس , 1991) . فضلا" عن قدرة هذه البكتريا على كبح نمو العديد من فطريات التربة الممرضة للنبات *Pythium aphandermatum* و *F. solani* و *Rhizoctonia solani* فضلا" عن البذور المرافقة للحبوب وبخاصة الانواع التابعة لجنس Aspergillus وهذه الفطريات تؤثر على حيوية البذور وانباتها (العاشور , 2005 : الجميلي والوائلي , 2002) .

جدول (11) تأثير المستحضرات الحيوية المصنعة من لقاح نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* كلا" على حده في الفعالية السمية لمبيد bifenthrin بدلالة معدلات نسب الانبات لحبوب الحنطة في التربة .

نوع المستحضر	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
نسبة الانبات (%) المعاملات	بعد خمسة ايام	بعد عشرة ايام	بعد خمسة ايام	بعد عشرة ايام
مبيد + بكتريا	70.7	79.1	41.6	50.6
بكتريا فقط	70.6	79.4	66.6	75
مبيد فقط	0	0	0	0
Con.	62.5	70.7	62.5	70.8
L.S.D.(0.05)	2.1	0.9	2.9	1.25

4. 2. 6. 6. قابلية المستحضر الحيوي على الخزن

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (12) عدم وجود فروقات معنوية في اعداد البكتريا في الغرام الواحد لكل مستحضر حيوي بعد مرور (6) أشهر من بداية عملية انتاج المستحضر اذ حافظا على

معدلات اعداد البكتريا خلال هذه المدة ولم يطرأ تغيير كبير على تلك الاعداد عما كانت عليه في بداية تصنيع المستحضر الحيوي . فعند بداية تصنيع المستحضر الحيوي لبكتريا *P. fluorescens* بلغت اعداد البكتريا في الغرام الواحد منه 7.3× 10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / غم ، وبعد مرور ستة أشهر من تأريخ الانتاج اصبحت اعداد البكتريا 7 ×10^{11} وحدة تكوين مستعمرة / غم , اما ما يخص مستحضر البكتريا *B. subtilis* فقد كانت اعداد البكتريا في بداية الانتاج 6.6 ×10^{9} وحدة تكوين مستعمرة / غم وبعد ستة اشهر من تاريخ بداية الانتاج تناقص العدد بشكل طفيف ليصل الى 6.2 × 10^{9} وحدة تكوين مستعمرة / غم .

وقد تعزى كفاءة المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* الى امتلاك تلك البكتريا ميزات كثيرة اهمها تكوينها الابواغ الداخلية ذات المقاومة العالية للظروف البيئية المختلفة التي لها القدرة على استعادة نشاطها الحيوي والفسيولوجي خلال دقائق بعد توافر الظروف الملائمة للنمو والتكاثر . (Schulz *et al.*, 2006) . كما تمتلك هذه البكتريا القدرة على مقاومة الظروف البيئية الاخرى مثل الحموضة والقاعدية والازموزية والاكسدة وتكون هذه المقاومة منظمة بالعامل سكما sigma الذي يحفز عندما تتعرض البكتريا لمثل هذه الظروف (Bandow *et. al.*, 2002) .

كذلك إن المادة الحاملة لها القدرة على المحافظة على خلايا البكتريا الخضرية وذلك من خلال توفيرها ظروف ملائمة من حيث خفض درجة الحرارة وزيادة نسبة الرطوبة وذلك لتواجد البكتريا على سطوح حبيبات كاربونات الكالسيوم والتي تقوم بدورها بامتصاص الرطوبة الموجودة في الهواء فضلا عن قلة امتصاصها الحرارة من المحيط مما يوفر حرارة ملائمة للخلايا الخضرية وتمنع جفافها (حميد ، 2001) .

وهذه النتيجة تتفق مع ما توصلت اليه الجبوري (2012) من قدرة المستحضرين الحيويين المكونيين من عزلتي البكتريا *P.fluorescens* و *B.subtilis* على الخزن في ظروف المختبر ولمدة ستة اشهر من بداية الانتاج .

وتقاربت النتيجة مع ما توصل اليه عبود (2005) من قدرة المستحضر الحيوي المكون من البكتريا *B. thuringiensis* على الخزن في ظروف المختبر ولمدة (6) اشهر من عملية الانتاج . كما وافقت النتيجة مع ما توصل اليه العاشور (2009) , من قدرة المستحضر الحيوي المكون من البكتريا *B. subtilis* على الخزن في ظروف المختبر ولمدة (6) اشهر من بداية تحضير المنتج الحيوي ، كما أن إحدى الدراسات أكدت على قدرة المستحضرات الحيوية المصنعة من جنس البكتريا *Bacillus* على

تحمل ظروف الخزن الطبيعي ومحافظتها على فعاليتها البايولوجية لفترة طويلة قد تصل الى اكثر من عامين . (الجميلي واخرون ، 2007) .

جدول (12) تأثير المدة الخزنية على معدل لوغارتم اعداد خلايا نوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* في المستحضر الحيوي .

البكتريا / مدة الخزن(شهر)	*P. fluorescens*		*B. subtilis*	
	معدل اعداد البكتريا (و.ت. م./غم)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل	معدل اعداد البكتريا (و.ت. م. /غم)	معدل لوغارتم اعداد البكتريا/مل
0	7.3×10^{11}	11.8	6.6×10^{9}	9.8
6	7×10^{11}	11.82	6.2×10^{9}	9.79
L.S.D.(0.05)	**0.04**		**0.03**	

3 . المـــــواد وطرائــق العمــل Meterials and Methods

3 .1 :الاجهزة والمواد المستعملة في تنفيذ الدراسة

3 .1 . 1 الأجهزة والزجاجيات المستعملـة

ت	الآجهزة	الشركة المصنعة	المنشا
.1	حاضنة (Incubator)	Lab-Teach	Korea
.2	حمام مائي (Water bath)	Lab-Teach	Korea
.3	خلاط كهربائي (Blender)	National	Japan
.4	فرن كهربائي (Electric oven)	Memmert	Germany
.5	موصدة (Autoclave)	Sermite	Germany
.6	ميزان حساس (Sensitive balance)	Sartorius	Germany
.7	كاميرا دجتل (Digital Camera)	Sony	Japan
.8	مجهر مركب Light microscopic (compound	Olympus	Japan
.9	المشراح الدوار(Rotary microtom)	R – Tung	Germany
.10	مصدر الأشعة فوق البنفسجي (U.V.transilluminator)	UVP,INK	U.S.A.
.11	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	Milton Roy Company	U.S.A.

.12	جهاز طرد مركزي centrifuge	Gemmy Industrial Crop	Taiwan
.13	جهاز PHmeter	WTW	Germany

2. 1. 3 المواد الكيميائية المستعملة

ت	المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
1	صفائح (TLC)	Fluke	Switzerland
2	شمع البارافين (Paraffin wax)	BDH	England
3	صبغة الايوسين (Eosin stain)	Riedle	Germany
4	صبغة الهيماتوكسيلين(Haematoxyline stain)	Riedle	Germany
5	صبغة كرام Gram ’s stains	Oxoid	England
6	فورمالين (Formalin)	Fluka	Switzerland
7	كحول الايثانول (Ethanol alcohol)	BDH	England

8	كحول الميثانول (Methanol alcohol)	BDH	England
9	كلوروفورم (Cholorophorm)	Fluka	Switzerland
10	كلوريد الصوديوم (Sodium chloride)	BDH	England
11	كليسرول (Glycerol)	BDH	England
12	ثنائي مثيل سلفوكسايد Dimethyl sulfoxide	BDH	England
13	كلورامفينيكول Chloramphenicol	Oxoid	England
14	كاربونات الكالسيوم $CaCo_3$	معمل نورة كربلاء	Iraq
15	هايبو كلورات الصوديوم	معمـــل الفـــرات للمنظفات	Iraq
16	الكاؤولين $Al_2Si_2O_5(OH)_4$	الاسواق المحلية	Iraq

3. 1. 3 الأوساط الزرعية المستعملة في الدراسة

ت	اسم المادة أو الوسط	الشركة المصنعة	المنشأ
1	وسط الاكار المغذي Nutrient agar	Fluke	Germany
2	وسط المرق المغذيNutrient broth	Hi-Media	India
3	وسط Potato dextrose agar P.D.A.	Hi-Media	India
4	وسط MRS الصلب Man Rogosa and Sharpe	Hi-Media	India
5	وسط MRS broth السائل الصلب Man Rogosa and Sharpe	Hi-Media	India

3. 1. 4. الحيوانات المختبرية

استعملت ذكور الجرذ الابيض المختبرية (Albino Rats) من النوع *Rattus rattus* عمرها 8-10 اسابيع تراوحت اوزانها بين 200 – 210 غم , تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية الصيدلة / جامعة كربلاء . وضعت في أقفاص لدائنيه بهياة مجاميع وتم تهيئة الظروف الملائمة من درجة حرارة 23 -28 م واضاءة مناسبة 12:12 ساعة .

3. 2 . طرائق العمل

3 . 2 . 1 . تحضير المحاليل والصبغات

1- صبغة الهيماتوكسلين – هارس hariss haematoxyline Stains

حضرت بحسب طريقة Bancroft and stevens (1982)

- ايثانول مطلق 10 مل.
- شب البوتاس 20 غم.
- ماء مقطر 200 مل.
- أوكسيد الزئبقيك 0.5 غم.
- حامض الخليك الثلجي 8 مل.

أُذيب مسحوق الصبغة في الكحول المطلق ثم أضيف الى الشب المذاب مسبقاً في الماء الحار، وسخن المزيج ثم أضيف إليه أوكسيد الزئبقيك، إلى أن اكتسب اللون الارجواني الغامق، ثم برد المحلول .

2- صبغة الايوسين الكحولي Alcoholic Eosin stains

حضرت بحسب طريقة Bancroft and steven (1982) وذلك بإذابة (1) غم من مسحوق الصبغة في 100 مل ايثانول 45%، استعملت في تصبيغ المقاطع النسيجية.

3- السم القياسي Aflatoxin Standard

تم الحصول على سم الافلاتوكسين القياسي B_1 بشكل متبلور فى عبوة زجاجية من شركة Hi-media بوزن 1 ملغم , واذيب فى 5 مل من محلول الكلوروفورم ليصبح التركيز 200

مايكروغرام /مليلتر , واعتبر محلول الاساس (Stock Solution) ووضع فى قنينة زجاجية معقمة وأغلقت بإحكام وغلفت بورق الألمنيوم (Aluminium foil) لابقائها بعيداعن الضوء وحفظت في حرارة – 18 °م لحين الاستعمال .

4- كاشف الكاتاليز Catalase reagent

استعمل بتركيز 30 % H_2O_2 في قنينة معتمة وحفظ في الثلاجة , استعمل للكشف عن قابلية البكتريا على إفراز إنزيم Catalase (Macfadden , 2000) .

5- كاشف الاوكسيديز Oxidase

حضر بإذابة(1غم) من مادة Tetra-methyl phenylene Diamine dihydrochloride في 100 مل من الماء المقطر ووضع في قنينة معتمة وحفظ في الثلاجة (مدة أقصاها أسبوع واحد) استعمل للكشف عن قابلية البكتريا على إنتاج إنزيم الاوكسيديز Oxidase (Macfadden2000) .

3 . 2 . 2. تحضير الاوساط الغذائية

1- وسط Potato Dextrose Agar (P.D.A)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة اذ تم اخذ 39 غم من الوسط واذيب في 1000مل ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة , استعمل هذا الوسط لغرض تنمية الفطر قيد الدراسة المرافق لبعض انواع الاغذية المحلية , واضيف اليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول وبتركيز 50 ملغم / لتر .

2- وسط Nutrient Agar(N.A)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة اذ تم اخذ 28 غم من الوسط واذيب في 1000مل ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 جو ولمدة 15دقيقة , استعمل هذا الوسط لغرض إكثار عزلة البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* .

3- وسط Nutrient broth

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة اذ تم اخذ 13 غم من الوسط واذيب في 1000مل ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة , استعمل هذا الوسط لغرض تنشيط و تحضير لقاح عزلة البكتريا *P. fluorescens* و *B. Subtilis* .

4- وسط (MRS) الصلب (Man Rogosa and Sharpe agar)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة اذ تم اخذ 62 غم من الوسط واذيب في 1000مل ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة , استخدم هذا الوسط لعزل وتنقيه بكتريا *Lactococcus lactis* وحفظها .

5- وسط (MRS) السائل (Man Rogosa and Sharpe broth)

حضر هذا الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة اذ تم اخذ 55.15 غم من الوسط واذيب في 1000مل ماء مقطر بعدها عقم بالمؤصدة بدرجة حرارة 121م^{o} وضغط 1.5 جو ولمدة 15 دقيقة , استخدم هذاالوسط لتنشيط وتحضير لقاح بكتريا *Lactococcus lactis* .

3. 2. 3. المعالجة الاحيائية لسم الافلاتوكسين B_1

3 . 2. 3 . 1. عزلة الفطر *Aspergillus flavus*

تم الحصول على عزلة الفطر *A. flavus* معزولة ومشخصة من قبل الدكتور سامي عبد الرضا الجميلي اعتمادا على المفاتيح التصنيفية التي وضعها كلا" من (Raper & Fennel , 1965) .

3. 2. 3. 2. اختبار قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلاتوكسين B_1 باستعمال كشف الامونيا

تم تحضير وسط PDA كما مبين في الفقرة (3 .2. 2.) وصب في اطباق بتري وبعد تصلبها لقحت الاطباق باقراص قطرها 5 ملم منمى عليها عزلات من الفطريات *A. flavus* بعمر 7 ايام وضعت في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث مرات , بعدها حضنت بحرارة 25± 2 م° لمدة اسبوع بعدها عوملت الاطباق بمحلول الامونيا 20 % وذلك بقلب الاطباق بحيث تكون قاعدة الطبق الى الاعلى ووضع ورقة ترشيح مشبعة بالامونيا في غطاء كل طبق ثم حضنت الاطباق بالحاضنة بدرجة حرارة 25 م ولمدة 24 ساعة ومتابعة تغير لون قواعد مستعمرات الفطر فتغير اللون من اللون الاصفر الى اللون الاحمر دليل على قدرة العزلة على انتاج الافلاتوكسينات (Saito and Machida , 1999) .

3 . 2 .3. 3 .اختبار قابلية الفطر *A. flavus* على انتاج سم الافلاتوكسين B_1 باستعمال تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة (TLC)

تم تنمية عزلة الفطر *A. flavus* والتي اعطت نتيجة موجبة للاختبار المبين في الفقرة (3. 2. 1. 4.) على وسط (P.D.A) وذلك بوضع قرص من الفطر قطره 5 ملم بعمر اسبوع في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث مرات (مكررات) , بعدها حضنت عند درجة حرارة 25م° ± 2 م° لمدة أسبوع بعدها اختير طبق واحد وتم تقطيع الوسط الزرعي المنمى عليه عزلة الفطر بواسطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بواسطة ابرة معقمة الى خلاط كهربائي حاوي على 20 مل ماء مقطر معقم بعدها مزج الخليط لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة قطعة شاش ثم وضع الراشح في قمع فصل سعة 250 مل واضيف اليه مقدار حجمه كلوروفورم ورج الخليط جيدا مع مراعاة فتح صمام القمع على فترات زمنية لطرد الغازات المتكونة , ثم فصلت طبقة الكلوروفورم الحاوي على

سم AFB_1 ووضعت في دورق نظيف ومعقم , وضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م حيث ركزت الكمية الى ما يقارب 1 مل فقط .

تم الكشف عن وجود الافلاتوكسينB_1 باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة(TLC) ذات ابعاد (20×20) سم حيث نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي 120م° لمدة ساعة قبل الاستعمال (الجميلي ، 1996) . واستخدم نظام الفصل كلوروفورم : ميثانول (98 : 2) .

تم عمل خط مستقيم على صفيحة TLC يبعد بمسافة 1.5 سم من قاعدة الصفيحة ، وأخذ 15 مايكروليتر بواسطة أنبوبة شعرية من السم القياسي AFB_1 ووضع على الخط بمسافة 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة وعلى مسافة 2 سم من البقعة الخاصة بالسم القياسي , وضع نفس الكمية من عينة الفطر المختبرة وعلى نفس المسافة المذكورة أعلاه أي 2 سم, بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول الى مسافة تقارب 2 سم من النهاية العليا للصفيحة ، أخرجت الصفائح وجففت ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول الموجي (360) نانوميتر وتم الكشف عن وجود الافلاتوكسين B_1 بمطابقة معامل الترحيل (Rf) ولون التألق لمحتوى المستخلص من الافلاتوكسين مع المادة القياسية للـ AFB_1 (Sobolev and Dorner,2002).

3 .2. 3 . 4 .استخلاص وتنقية سم الافلاتوكسين B_1

بعد ان تمت عملية التشخيص التاكيدي لعزلة الفطر *A . flavus* المنتجة لسم AFB_1 بالطرق المذكورة اعلاه , تم تحضير 250 طبق بتري من وسط PDA وكما مبين في الفقرة (3. 2. 2.) ولقحت جميع الاطباق باقراص من عزلة الفطر *A . flavus* المنماة مسبقا على وسط PDA بعمر اسبوع وبقطر5 ملم لكل قرص وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 30 م ولمدة عشرة ايام , بعد اتمام عملية استخلاص المادة السامة AFB_1 من الوسط الزرعي والتي سبق توضيحها في الفقرة (3. 2. 3. 3.) تم اجراء

ترحيل للعينة المستخلصة بطريقة وضعها على هيئة خط (Streak) على صفيحة TLC . على بعد 1.5 سم من الحافة السفلية للصفيحة بعدها تم وضعها في حوض الفصل وتركت لحين وصول الطور المتحرك الى مسافة 1.5 سم من الحافة العلوية بعد هذه العملية تم فصل سم AFB_1 من صفيحة TLC من خلال كشط السليكا جل الحاوي على سم B_1 بواسطة شفرة معقمة وجمعه في أنابيب اختبار نظيفة ومعقمة بعدها أضيف لكل انبوبة اختبار حاوية على السليكا جل حاملة للسم B_1 كمية من الكلوروفورم مقدارها 10مل ورجت جيدا ثم عرضت للطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم اخذ الراشح وأهمل الراسب و نقل الراشح الى بيكر صغير ذي حجم 20 مل ووضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 50 م لحين جفاف العينة وهكذا كررت العملية عدة مرات لحين الحصول على الكمية المطلوبة من السم , حضر حجم 100مايكروغرام / كغم من السم وذلك باذابته بمادة ثنائي مثيل سلفوكساید Dimethyl sulfoxid (DMSO) . (الخلف , 2011)

3. 2. 3. 5. عزل وتشخيص بعض الانواع البكتيرية من الحليب واللبن

3. 2. 3. 5. 1. جمع عينات من الحليب واللبن

تم جمع خمس عينات محلية من الحليب واللبن في مدينة كربلاء المقدسة وبواقع 3 عينات حليب و2 لبن لغرض عزل انواع البكتريا المرافقة للحليب واللبن , وحضر الوسط الغذائي الملائم وفقا للفقرة (3. 2. 2.) اذ هيئ 15 طبق من وسط MRS agar .

و تم اجراء سلسة تخافيف عشرية لكل عينة من العينات المدروسة وصولا" الى التخفيف 1×10^4 , ثم اخذ 1مل من التخفيف الاخير وزرع على ثلاث اطباق حاوية على وسط MRS الصلب ونفس هذه العملية طبقت على بقية عينات الحليب , اما عينات اللبن فخضعت لنفس الخطوات السابقة اعلاه باستثناء اخذ 1غم من اللبن من كل عينة من عينات اللبن المدروسة .

3. 2. 3. 5. 2. حفظ العزلات البكتيرية .

بعد عملية تنقية العزلات البكتيرية بشكل مستعمرات منفردة ,عملت موائل slant من وسط MRS الصلب في انابيب اختبار ولكل عزلة من العزلات وتم تعليم كل عزلة من اجل المحافظة على اصل

العزلات وحضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة , حفظت في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب اللاحقة .

3. 2. 3. 5. 3. اختبار الفعالية التضادية لعزلات البكتريا ضد فطر *A . flavus*

لغرض تنفيذ هذا الاختبار تم تنمية عزلات البكتريا اولا على وسط MRS broth ومن ثم حضنها تحت درجة حرارة 37م ولمدة 24 ساعة . بعدها تم تلقيح اطباق حاوية على وسط N. agar والمحضرة مسبقا وفقا لما جاء في الفقرة (3. 2. 2.) بـ 1مل من لقاح كل عزلة بكتيرية لكل طبق على حده وبثلاث مكررات , وتم نشر اللقاح البكتيري بواسطة ناشر زجاجي معقم تلا ذلك تلقيح الاطباق الملوثة باللقاح البكتيري للعزلات المختبرة باقراص من وسط P.D.A ذات اقطار تبلغ 5 ملم منمى عليها الفطر *A. flavus* بعمر اسبوع وضع في مركز الطبق اما معاملة المقارنة فتمثلت باطباق حاوية على وسط N. agar غير ملوثة بلقاح اية عزلة من العزلات المدروسة ولقحت هذه الاطباق باقراص من وسط P.D.A. المنمى عليها الفطر *A. flavus* حضنت جميع الاطباق تحت درجة حرارة 30 م لمدة اسبوع , وحسب مقدار التثبيط للنمو الفطري باخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية بعد انتهاء مدة الحضن وبتطبيق معادلة Abbott (1923) الواردة في كتاب المبيدات (شعبان والملاح , 1993) .

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

R1 = اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على اطباق لاتحوي على البكتريا (معاملة سيطرة)

R2 = اقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على اطباق الحاوية على البكتريا .

بعدها دونت نتائج التثبيط لكل عزله على حده وتم تقييم العزلة الاكفأ في التثبيط اعتمادا على درجة التثبيط الاعلى .

3. 2. 3. 5. 4. اختبار قدرة العزلة البكتيرية الاكفأ في تحطيم سم الافلاتوكسين B1 خارجيا باستعمال تقنية TLC

نشطت العزلات البكتيرية على الوسط الغذائي MRS broth اولا ثم حضر نفس الوسط في انابيب اختبار معقمة وبواقع 2مل من الوسط , لقحت الانابيب بمستعمرات من كل عزلة بكتيرية كل على حده واضيف الى كل انبوب 100 مايكروليتر من سم AFB_1 النقي الذي تم استخلاصه مسبقا"من عزلة الفطر *A . flavus* ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 م لمدة 72 ساعة لتحديد أي العزلات البكتيرية اكثر كفاءة في تحطيم او تقليل فعالية سم AFB1 , بعد انتهاء فترة الحضن تم ترحيل العينات المحضونة على صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة TLC وبنفس الطريقة الموضحة في الفقرة (3. 2. 3. 3.) اذ اخذ 0.1 مل من كل عينة ووضعت بشكل بقعة مع بقعة السم AFB_1 فقط كمعاملة سيطرة , سجلت النتائج وتم اختيار العزلة الاكفا بالاعتماد على درجة التألق اللوني للمادة السامة بالمقارنة مع معاملة السيطرة .

بعد غربلة العزلات البكتيرية الخمسة تم اختيار العزلة الاكفأ منها استنادا الى درجة التثبيط للنمو الفطر *A . flavus* والى القدرة على تحطيم فعالية السم AFB_1 , وحفظت هذه العزلة في وسط MRS broth المعقم بنسبة 90% ومادة Glycerol بنسبة 10% لغرض استخدامها ببقية الاختبارات وحفظت في انابيب ذات سداد محكم Screw vial وضعت في الثلاجة بدرجة (5-1) م .

3. 2. 3. 5. 5. دراسة الخصائص المظهرية والمجهرية للعزلة البكتيرية الاكفا في تحطيم سم AFB_1 .

تمت معاينة ودراسة الخصائص المظهرية والمجهرية لمستعمرات البكتريا التي اثبتت كفاءتها في تحطيم السم الفطري قيد الدراسة وبعد التاكد من انها عائدة لجنس البكتريا *Lactococcus* وذلك عن طريق الفحص المباشر للمستعمرات النامية بعد فترة 24 ساعة من التحضين , حدد حجم المستعمرة ولونها ودراسة قوامها واخذ مسحة بواسطة لوب ونشره على شريحة زجاجية معقمة وتثبيتها ومن ثم تصبيغها بصبغة كرام ومعاينة شكل الخلية البكتيرية , ويعد التصبغ باللون الازرق دليل على ان البكتريا عائدة الى المجموعة الموجبة لصبغة كرام , فيما تكون البكتريا المتصبغة باللون الاحمر سالبة لصبغة كرام (Collee *et al*. , 1996). كذلك تم اجراء بعض الفحوصات الكيموحيوية للبكتريا مثل :

1- إختبار الكاتاليز (Catalase test)

اجريّ هذا الأختبار بمزج مستعمرة بكتيرية بعمر 24 ساعة مع قطرة من كاشف بيروكسيد الهيدروجين 3% على شريحة زجاجية نظيفة. ان ظهور الفقاعات دليل على ايجابية الأختبار (MacFadden, 2000).

2- **إختبار الأوكسديز (Oxidase test)**

تم نقل مستعمرة بكتيرية بعمر يتراوح بين24 ساعة بواسطة عود خشبي معقم (stick) الى ورقة ترشيح وأضيف لها قطرة من كاشف الأوكسديز. فتحول لون المستعمرة الى اللون البنفسجي الغامق دليل على ايجابية الأختبار (MacFadden, 2000).

3. 2. 3. 5. 6 . التشخيص التأكيدي لعزلة البكتريا *Lactococcus lactis*

تم اجراء تشخيص تاكيدي لعزلة البكتيريا *Lactococcus lactis* التي ثبت قابلتها على تحطيم سم AFB_1 في التجربة التي وردت في الفقرة (3. 2. 3. 5. 4.) , وذلك باستعمال مجموعة من الاختبارات البايوكيميائية والتي يتضمنها كت Epi20strep المصنع من قبل شركة France / Biomerieux . وتم اجراء تشخيص تاكيدي اخر باستعمال جهاز Vitic2 المصنع من قبل شركة Biomerieux / France .

3. 2. 3. 5. 7. اختبارالفعالية السمية لسم AFB_1 والمعامل مسبقا" بالبكتريا *Lactococcus* الاكفأ في تحطيمه في حيوانات الجرذ الابيض

اولا : تهيئة الحيوانات ومعاملاتها

تم تهيئة 12 ذكر جرذ ابيض عمر (8-10) اسابيع وقسمت الى اربع مجاميع ضمت كل مجموعة 3 حيوانات وتم معاملتها وفقا" لما يلي :

1- **معاملـة AFB1 المعامـل مسـبقا" بالبكتريـا :** جرعـت الحيوانـات بالسـم AFB1 وبتركيـز 100مايكروغرام / كغم الذي تم معاملته مسبقا" بالبكتريا والمحضون لمدة 72 ساعة بجرعة مقدارها 1مل / كغم وزن الحيوان .

2- **معاملة البكتريا فقط :** جرعت الحيوانات بلقاح البكتريا (1×10^8 خلية / مل) فقط بمقدار 1مل / كغم وزن حيوان .

3- **معاملة سم AFB1 فقط :** جرعت الحيوانات بسم AFB1 وبجرعة مقدارها 100 مايكروغرام / كغم وزن حيوان .

4- **معاملة السيطرة :** تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO وبمقدار 1مل / كغم وزن حيوان

كررت عملية التجريع اربع مرات وعلى مدار ثمانية ايام مع متابعة الاعراض السريرية التي يمكن ظهورها على الحيوانات المعاملة خلال فترة التجريع , ثم تركت ليومين بعدها تم تخدير الحيوانات بمادة الكلوروفورم وسحبت عينات الدم بطريقة طعنة القلب ووضعت في انابيب اختبار حاوية على (EDTA) لاجراء فحوصات الدم الفسيولوجية , ثم شرحت الحيوانات عن طريق فتح التجويف البطني واخذت الاعضاء (كبد , امعاء , كلية , طحال) وحفظت في الفورمالين تركيز 10 % لدراسة التغيرات النسيجية فيها (Brown, 1976) .

ثانيا : المعايير المدروسة

أ- المعايير الفسلجية للدم

تمت عملية قياس معايير الدم المدونة في ادناه باستخدام جهاز Automated Hematology analyzer المصنع من قبل شركة Japan / Sysmex KX- 21N , وشملت الدراسة الفسلجية الاختبارات الاتية :

1- حساب كمية الهيموغلوبين
2- حساب اعداد كريات الدم الحمراء
3- حساب اعداد الصفيحات الدموية
4- حساب اعداد الخلايا اللمفية

ب - الدراسة النسيجية

حضرت المقاطع النسيجية في مستشفى الصدر العام – محافظة النجف الاشرف واتبعت طريقة Bancroft & Stevens (1982) . التي تضمنت :

1- **الانكاز Dehydration**:-

استخرجت العينات المأخوذة من أعضاء الحيوانات المحفوظة بالفورمالين (10%) وغسلت بالماء المقطر ثم مررت العينات في تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70، 80، 90، 100)% لمدة 1.5 -2 ساعة في كل تركيز لإزالة الماء منها.

2.الترويق Clearing:-

روقت العينات بالزايلين مرتين ولمدة 1 -1.5 ساعة لكل مرة وذلك لإزالة محلول الإنكاز من الانسجة.

3.التشرب Infiltration:-

شربت العينات بشمع البرافين المنصهر في درجة حرارة (56-58)م وذلك بوضع العينات فيه لمدة (1-1.5) ساعة لكل مرة.

4.الطمر Embedding:-

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

5.التقطيع Sectioning:-

حضرت مقاطع نسجية متسلسلة بسمك (5)مايكروميتر باستعمال جهاز المشراح الدوار (Rotary microtome) وثبتت النماذج على شرائح زجاجية باستعمال لاصق البومين ماير (Meyer's albumine) بعدها وضعت الشرائح في الفرن بدرجة حرارة (56-58)م بصورة عمودية لمدة 20 دقيقة لازالة الشمع الزائد.

6.التصبغ Staining:-

صبغت المقاطع النسجية بصبغة الهيماتوكسلين - ايوسين إذ مررت الشرائح في (زايلين- كحول اثيلي (70، 90، 95، 100)% - صبغة الهيماتوكسلين) لمدة ثلاث دقائق لكل منها، غسلت المقاطع بماء الحنفية وغطست بصبغة الأيوسين لمدة 3 دقائق وغسلت بعدها بماء الحنفية أيضا ثم مررت بتراكيز تصاعدية في كل من الكحول الاثيلي (70، 90، 95، 100)% والزايلين لمدة دقيقتين لكل تركيز.

7.التحميل Mounting:-

وضع غطاء الشريحة باستعمال كندا بلسم، وبعدها تم تشخيص المقاطع النسجية لملاحظة التغيرات النسجية.

8. تشخيص المقاطع النسيجية

تم تشخيص المقاطع النسجية مجهريا" من قبل الدكتور حيدر جبر كحيوش / اختصاص في علم الامراض – الفحص النسيجي والخلوي (البورد العراقي في علم الامراض) , مدينة الامام الحسين الطبية – محافظة كربلاء المقدسة .

3. 2. 3. 5. 8. تاثير الملوحة ودرجة الحموضة في نمو بكتريا *Lactococcus lactis* .

أ- الملوحة

تم تهيئة اربعة دوراق بحجم100 مل واضيف لكل دورق وسط MRS agar المعقم بعدها تم اضافة ملح كلوريد الصوديوم NaCl بتركيز 1% للدورق الاول وتركيز 2% للثاني وهكذا لبقية الدوارق بشكل متسلسل وصولا للتركيز 4% للدورق الرابع ., تلاه تعقيم الدوراق بالموصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1 جو لمدة 20 دقيقة وبعد تبريد الوسط صبت محتويات كل دورق في 3 اطباق وتركت لتتصلب , بعدها تم عمل سلسة من التخافيف للوسط الزرعي MRS broth المنمى فيه عزلة البكتريا *Lactococcus lactis* لمدة 24 ساعة من 10 $^{-1}$ ولغاية 10 $^{-8}$ بعدها تم نشر 0.1 مل من التخفيف 10 $^{-8}$ على وسط MRS agar الحاوي على كلوريد الصوديوم بواسطة الناشر الزجاجي وبمعدل ثلاث اطباق لكل تركيز ملحي , ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة بعد الحضن تم حساب عدد المستعمرات النامية في كل طبق ولكل تركيز ملحي مدروس ثم حسبت اعداد البكتريا وفقا لمعادلة Clark (1965) :

عدد الخلايا البكتيرية / مل = عدد المستعمرات في كل طبق × مقلوب التخفيف .

ب – الدالة الحامضية

تم تحضير وسط MRS broth وفقا لما موضح في الخطوة 4 من الفقرة (3. 2. 2.) ووزع الوسط على خمسة دوارق سعة 100 مل بعدها تم تعديل الرقم الهيدروجيني لاربع دوراق باضافة حامض الستريك Citric acid لتعديل الوسط نحو الحامضية وهيدروكسيد الصوديوم NaOH لتعديل الوسط نحو القاعدية , حيث عدلت قيمة PH في الدوارق الى 3 , 6 , 9 , 12 على التوالي , مع ترك الدورق الخامس بدون تعديل كمعاملة سيطرة , ثم عقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121م^{o} وضغط 1جو ولمدة 15 دقيقة وبعد تبريد الوسط لقحت الدوارق بخمسة مستعمرات منفردة من البكتريا *Lactococcus lactis* المنماة على وسط MRS agar لمدة 24 ساعة ثم حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37م^{o} لمدة 24ساعة , بعدها حضرت تخافيف من كل دورق وصولا الى التخفيف (10 $^{-8}$) وزرع التخفيف الاخير بواقع 0.1مل على اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي MRS agar المعقم وكررت (3 مكررات) وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م^{o} (Macfadden , 2000) . ومن ثم حساب اعداد البكتريا في المليلتر الواحد بحسب معادلة Clark (1965) .

3. 2. 3. 5. 9. اختبار قابلية بكتريا *Lactococcus lactis* في تحطيم سم AFB_1 داخليا وبشكل وقائي .

اولا : تهيئة الحيوانات :

تم تهيئة (12) ذكر جرذ ابيض عمر (8-10) اسابيع وقسمت الى اربع مجاميع ضمت كل مجموعة 3 حيوانات .

ثانيا : معاملة الحيوانات :

. تم معاملتها وفقا" لما يلي :

1- **معاملة البكتريا + سم AFB_1:** جرعت الحيوانات بعالق بكتريا *Lactococcus lactis* مقدارها 1مل / كغم وزن الحيوان وذلك في اليوم الاول من التجريع واليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات

بسم AFB_1 بجرعة مقدارها 100 مايكروغرام / كغم وزن حيوان , أي بشكل وقائي وهكذا استمرت بقية الجرعات .

2- **معاملة البكتريا فقط :** جرعت الحيوانات بلقاح البكتريا (1×10^8 خلية/مل) فقط وبمقدار 1مل / كغم وزن حيوان .

3- **معاملة سم AFB_1 فقط :** جرعت الحيوانات بسم AFB_1 الذائب في DMSO وبجرعة مقدارها 100 مايكروغرام / كغم وزن حيوان .

4- **معاملة السيطرة :** تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO وبمقدار 1مل / كغم وزن حيوان .

نفذت نفس الخطوات المتبعة بالتجربة الواردة في الفقرة (3. 2. 3. 5. 7.) من ناحية الدراسة النسجية كما وتم حساب المعايير الفسلجية التالية :

1- حساب كمية الهيموغلوبين

2- حساب معدل اعداد الصفيحات الدموية

3- حساب معدل الخلايا اللمفية .

3. 2. 3. 5. 10. اختبار فعالية البكتريا *Lactococcus lactis* المقتولة حراريا" في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 داخليا.

اولا : تهيئة الحيوانات :

تم تهيئة (12) ذكر جرذ ابيض عمر (8-10) اسابيع وقسمت الى اربع مجاميع ضمت كل مجموعة 3 حيوانات .

ثانيا : معاملة الحيوانات :

عوملت الحيوانات وفقا لما مبين في ادناه :

1- **معاملة البكتريا المقتولة + سم AFB_1 وقائيا" :** جرعت الحيوانات في اليوم الاول من عالق البكتريا المقتولة بجرعة مقدارها 1 مل/ كغم وزن حيوان وفي اليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات بسم AFB_1 بجرعة مقدارها 100مايكروغرام / كغم وزن حيوان , واستمرت بنفس الطريقة لبقية الجرعات .
2- **معاملة البكتريا المقتولة فقط :** جرعت الحيوانات بجرعة مقدارها 1مل/ كغم وزن حيوان من عالق البكتريا المقتولة فقط .
3- **معاملة السم AFB_1 فقط** : جرعت الحيوانات بجرعة مقدارها 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان من سم AFB_1 فقط .

4-معاملة السيطرة : تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO وبمقدار 1مل / كغم وزن حيوان

نفذت نفس الخطوات المتبعة بالتجربة الواردة في الفقرة (3. 2. 3. 5. 7.) من ناحية الدراسة النسجية و تم حساب المعايير الفسلجية الاتية:

1- حساب كمية الهيموغلوبين

2- حساب معدل اعداد كريات الدم الحمراء

3- حساب معدل اعداد الصفيحات الدموية

4- حساب النسبة المئوية للخلايا اللمفية

5- حساب معدل اعداد الخلايا الوحيده .

3. 2. 3. 5. 11. تصنيع تحضيرة من عزلة البكتريا *Lactococcus lactis*

1- تحضير الوسط الغذائي MRS broth : تم تحضير الوسط MRS وفقا" لما موضح في ا الفقرة (3 2. 2.) بعدها وزع الوسط الغذائي على انابيب اختبار معقمة حجم 20 مل وبمعدل 15 مل / انبوبة اختبار بعدها تم تعقيم انابيب الاختبار بما فيها من وسط غذائي بالموصدة بدرجة حرارة 121م° وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقة بعد انتهاء مدة التعقيم تركت الانابيب لتبرد .

2- بعد تبريد الوسط الغذائي في الانابيب لقحت كل انبوبة بخمسة مستعمرات من البكتريا *L. lactis* منماة على وسط MRS agar ثم حضنت بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة (Spicher & Schroeder , 2000) .

3- بعد انتهاء مدة الحضن تم تعريض الانابيب للطرد المركزي وبسرعة 6000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة بعدها اهمل الراشح واخذ الراسب ثم غسلت خلايا الراسب باستخدام دارئ الفوسفات المعقم ذي الاس الهيدروجيني 7 .

4- اضيف للراسب في كل انبوية 1مل من دارئ الفوسفات المعقم ثم قيست الكثافة الضوئية بجهاز Spectrophotometer وعلى طول موجي 650 نانوميتر وعليه عندما تكون قيمة الامتصاصية تساوي 1 فهذا يعني ان اعداد خلايا البكتريا هو 1×10^9 خلية / مل .

(Williams *et al*., 1983) .

5- بعد حساب كثافة البكتريا *L . lactis* تم تعريضها لدرجة حرارة 100م ولمدة 10 دقائق لغرض قتلها (تم اعتماد هذه الدرجة الحرارية والمدة الزمنية لقتل البكتريا بعد اختبار عدة درجات حرارية وفترات زمنية مختلفة) .

6- تم تحميل لقاح البكتريا *L . lactis* على مسحوق الحليب المجفف بحيث كان تركيز البكتريا في الغرام الواحد من التحضيرة هو 10^8 خلية / غم .

3. 2. 3. 5. 12. اختبار فعالية التحضيرة من البكتريا *Lactococcus lactis* المقتولة في حماية النظم الحيوية للجرذ الابيض من التأثيرات السمية لسم AFB_1

اولا : تهيئة الحيوانات:

تم تهيئة (24) ذكر الجرذ الابيض بعمر (8) اسابع وقسمت الى ثمانية مجاميع كل مجموعة ثلاث حيوانات .

ثانيا : معاملة الحيوانات :

عوملت الحيوانات وفقا لما مبين في ادناه :

1- **معاملة التحضيرة المقتولة + AFB_1 وقائيا" :** جرعت الحيوانات في اليوم الاول بالتحضيرة المقتولة بجرعة مقدارها 1 غم / كغم وزن حيوان وفي اليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات بسم AFB_1 بجرعة مقدارها 100مايكروغرام / كغم وزن حيوان , واستمرت بنفس الطريقة لبقية الجرعات .
2- **معاملة التحضيرة فقط :** جرعت الحيوانات بجرعة مقدارها 1غم / كغم وزن حيوان من التحضيرة فقط .
3- **معاملة الحليب + سم AFB_1 وقائيا" :** جرعت الحيوانات في اليوم الاول من محلول الحليب بجرعة مقدارها 1 غم/ كغم وزن حيوان وفي اليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات بسم AFB_1 بجرعة مقدارها 100مايكروغرام / كغم وزن حيوان , واستمرت بنفس الطريقة لبقية الجرعات .

4- **معاملة الحليب فقط** : جرعت الحيوانات بجرعة مقدارها 1غم/ كغم وزن حيوان من محلول الحليب فقط .

5- **معاملة السم AFB_1 فقط** : جرعت الحيوانات بجرعة مقدارها 100مايكروغرام/ كغم وزن حيوان من سم AFB_1 فقط .

6- **معاملة السيطرة** :تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO وبمقدار 1مل / كغم وزن حيوان .

نفذت نفس الخطوات المتبعة بالتجربة الواردة في الفقرة (3. 2. 3. 5. 7.) من ناحية الدراسة النسجية كما وتم حساب نفس المعايير الفسلجية التالية :

1- حساب كمية الهيموغلوبين

2- حساب معدل اعداد كريات الدم الحمراء

3- حساب معدل اعداد الصفيحات الدموية

4- حساب النسبة المئوية للخلايا اللمفية

5- حساب معدل اعداد الخلايا الوحيده .

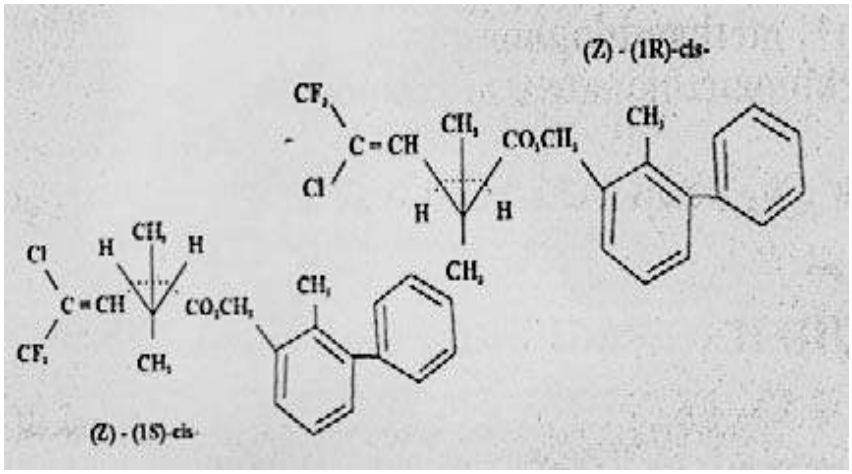
3 . 2. 4. تقييم فعالية نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* في معالجة مبيد Bifenthrin بدلالة الاختبارات الحيوية

3. 2. 4. 1. المبيد المستهدف في الدراسة bifenthrin

1- الاسم الكيمائي :

(2-methyl {1,1-biphenyl}-3-yl) methyl3-(2-chloro-3,3,3-trifluoro-1-propenyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate

2- التركيب الكيمائي :



3- الاسم الشائع : bifenthrin

4- الاسم التجاري : Talstar, Biflex

5- الصيغة الجزيئية : C23H22ClF3O2

6- المجموعة الكيميائية : Pyrethroid

7- السمية : الجرعة النصف قاتلة LD50 للجرذان عن طريق الفم 375 ملغم / كغم

8- معدل الاستعمال : 0.3 _ 0.5 مل / لتر ماء (EC) .

9- الآفات المستعمل لمكافحتها : الحلم على الخضروات , الأرضة والسونة على الحنطة والشعير.

10- التركيز المسموح أخذه يوميا" : 0.02 ملغم / كغم من وزن الجسم .

هذاما جاءت به اللجنة الوطنية العراقية لتسجيل واعتماد المبيدات The National Committee For Approval Iraq & Pesticides' Registration. (عواد , 2002).

3. 2. 4. 2. العزلات البكتيرية

تم الحصول على عزلتين من بكتريا التربة المحلية *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* مشخصة من مختبر الاحياء المجهرية لقسم التحليلات المرضية / كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء .

3. 2. 4. 3. التشخيص التأكيدي لنوعي البكتريا *Bacillus subtilis* و*fluorescens Pseudomonas* .

تم اجراء تشخيص تأكيدي لبكتريا *Bacillus* باستعمال اختبار Vitic2 , وشخصت بكتريا *Pseudomonas* باستعمال اختبار Vitic2 واختبار Epi20E معا" , .

3. 2. 4. 4. تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم ودرجة الحموضة في نمو عزلتي البكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* .

3. 2. 4. 4. 1. اختبار تأثير ملح كلوريد الصوديوم في نمو العزلتين البكتيريتين

تم تهيئة خمسة دوارق زجاجية سعة 250 مل حاوية كل منها على 100 مل من وسط N. agar اضيف للدورق الاول كلوريد الصوديوم بنسبة 1% وللدورق الثاني 2% وهكذا وصولا الى التركيز 4% في حين ترك الدورق الخامس دون اضافة كمعاملة سيطرة . وزع محتوى كل دورق من الوسط الزرعي على ستة اطباق وهذه الاطباق الستة قسمت بدورها الى مجموعتين كل مجموعة تضم ثلاثة اطباق بعدها لقحت الاطباق الثلاثة الاولى بلقاح مخفف من البكتريا *P. fluorescens* مقداره (10^{-9}) في حين لقحت الاطباق الثلاثة الاخرى بلقاح مخفف من لقاح البكتريا *B. subtilis* تخفيف (10^{-8}) وهكذا كررت نفس العملية مع الدوراق الاخرى (الثاني والثالث والرابع) باستثناء الدورق الخامس والذي لم يضاف اليه ملح كلوريد الصوديوم (معاملة سيطرة) فقد صب في ستة اطباق ايضا" وبعد التصلب لقحت ثلاث اطباق من كل تركيز ملحي باللقاح المخفف لبكتريا *P. fluorescens* والثلاثة الاخرى بلقاح مخفف من لقاح بكتريا *B. subtilis* . بعدها حضنت جميع الاطباق تحت درجة حرارة 37 م ولمدة 24 ساعة , بعدها حسبت عدد المستعمرات البكتيرية في كل طبق ولكل تركيز ملحي فضلا" عن معاملة السيطرة (Collee واخرون , 1996) . ثم حسب عدد الخلايا البكتيرية النامية في كل تركيز ملحي وكذلك في معاملة المقارنة باستخدام معادلة Clark (1965) .

3. 2. 4. 4. 2. تاثير درجة الحموضة pH في نمو بكتريا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* .

تم تحضير وسط Nutrient broth ثم وزع الوسط على عشرة دوارق سعة 100 مل قسمت الدوارق الى مجموعتين مكونة من اربع دوارق لكل مجموعة عدلت فيها قيمة pH بالاضافة الى دورقين تركت بدون تعديل pH كمعاملة سيطرة , حيث تم تعديل الرقم الهيدروجيني باضافة حامض الستريك Citric acid لتعديل الوسط نحو الحامضية وهيدروكسيد الصوديوم NaOH لتعديل الوسط نحو القاعدية , حيث عدلت قيمة pH في المجموعة الاولى الى 3 , 6 , 9 , 12 على التوالي , وكررت العملية للمجموعة الثانية من الدوارق . مع ترك دورقين بدون تعديل لقيمة PH , ثم عقمت الدوارق بالموصدة بدرجة حرارة 121م وضغط 1جو ولمدة 15 دقيقة وبعد تبريد الوسط لقحت الدوار ق بخمسة مستعمرات منفردة من البكتريا *Bacillus subtilis* للمجموعة الاولى و *Pseudomonas fluorescens* للمجموعة الثانية والمنماة على وسط Nutrient agar لمدة 24 ساعة بالاضافة

الى دوراق السيطرة , ثم حضنت الدوارق بدرجة حرارة 37م لمدة 24ساعة , بعدها حضرت تخافيف من كل دورق وصولا الى التخفيف (10 $^{-8}$) وزرع التخفيف الاخير بواقع 0.1مل على اطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي Nutrient agar المعقم وبواقع (3مكررات) وحضنت الاطباق لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م (Macfadden , 2000) . بعدها تم حساب اعداد البكتريا في المليلتر الواحد باستخدام معادلة Clark (1965) .

3. 2. 4. 5. تقييم فعالية نوعي البكتريا . *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* في اختزال سمية مبيد Bifenthrin .

اولا : معاملة مبيد bifenthrin بلقاح نوعي البكتريا

تم تهيئة ستة دوارق حجم 250 مل حاوية على 100 مل من وسط المرق المغذي N. broth وبعد تعقيمها بدرجة حرارة 121 م وضغط 1جو تركت لتنخفض درجة حرارتها الى 40 م بعدها اضيف مبيد bifenthrin لثلاث دوارق وبتركيز 0.05 (5 مايكروليتر/100مل) رجت الدوارق الثلاثة جيدا" لغرض تجانس المبيد مع الوسط الزرعي ثم لقح الدورق الاول بخمسة مستعمرات من البكتريا *P. fluorescens* المنمى على وسط المغذي N. agar وبعمر 24 ساعة اما الدورق الثاني فلقح بخمسة مستعمرات من البكتريا *B. subtilis* النامية على نفس الوسط وبالعمر ذاته اما الدورق الثالث فترك دون تلقيح كمعاملة مقارنة (A) , اما الدوارق الثلاثة الاخرى والتي لم تعامل بالمبيد فالدورقين الاول والثاني فلقحا بنوعي البكتريا *P.fluorescens* و *B. subtilis* وبواقع خمسة مستعمرات لكل نوع اما الدورق الثالث فلم يلقح باي نوع بكتيري . بعدها حضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 35م° لمدة 48 ساعة .

ثانيا" : تهيئة الحيوانات :

تم تهيئة (18) ذكر جرذ ابيض عمر (8 -10) اسابيع وقسمت الى ستة مجاميع كل مجموعة 3 حيوانات .

ثالثا" : معاملة الحيوانات :

عوملت المجاميع الحيوانية وفقا لما مبين ادناه:

1- **معاملة المبيد + بكتريا *B. subtilis* :** عوملت الحيوانات بجرعة مقدارها 100 مايكروليتر / كغم وزن حيوان من المبيد المعامل مسبقا" بعالق البكتريا *Bacillus subtilis* والمحضون لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 35 م .

2- **معاملة المبيد + بكتريا *P. fluorescens*** : عوملت الحيوانات بجرعة مقدارها 100 مايكروليتر / كغم وزن حيوان من المبيد المعامل مسبقا" بعالق البكتريا *Pseudomonas fluorescens* والمحضون لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 35 م .

3- **معاملة البكتريا *B. subtilis* فقط :** جرعت الحيوانات بعالق البكتريا بجرعة مقدارها 1مل / كغم وزن حيوان .

4- **معاملة البكتريا *P . fluorescens* فقط :** عوملت الحيوانات بعالق البكتريا بجرعة مقدارها 1مل / كغم وزن حيوان .

5- **معاملة المبيد فقط :** عوملت الحيوانات بجرعة مقدارها 100 مايكروليتر / كغم وزن حيوان من عالق المبيد bifenthrin فقط .

6- **معاملة السيطرة :** عوملت الحيوانات بالمرق المغذي الغير معامل بالمبيد اوالبكتريا وبجرعة مقدارها 1مل / كغم وزن حيوان .

كررت عملية التجريع خمسة مرات وعلى مدار عشرة ايام مع متابعة الاعراض السريرية التي يمكن ظهورها على الحيوانات المعاملة خلال فترة التجريع , وبعده اتبعت نفس الخطوات التي اجريت في الفقرة (3. 2. 3. 5. 7.) من حيث الدراسة النسجية كما وتم حساب المعايير الفسلجية التالية .

1- حساب كمية الهيموغلوبين

2- حساب معدل اعداد كريات الدم الحمراء

3- حساب معدل اعداد الصفيحات الدموية

4- حساب النسبة المئوية للخلايا اللمفية

3. 2. 4. 6. تـاثير مبيـد bifenthrin فـي النمـو لنـوعي البكتريـا *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* .

تم تحضير وسط **Nutrient agar** وفقا لطريقة الموضحة في الخطوة 2 من الفقرة (3. 2. 2.) وزع الوسط على دورقين وبمعدل 120 مل / دورق وبعد تعقيمها تحت درجة حرارة 121 م وضغط 1جو لمدة 20 دقيقة وتركت لتبرد وتصل درجة حرارته 40 م° اضيف للدورق الاول مبيد bifenthrin بتركيز 10% في حين اضيف للدورق الثاني نفس المبيد ولكن بتركيز 20% بعدها صب محتوى كل دورق في ستة اطباق وقسمت هذه الاطباق الى مجموعتين كل مجموعة ضمت ثلاث اطباق لقحت الاطباق الثلاثة الأولى بلقاح بكتريا *B. subtilis* المخفف (10^{-7}) وبمعدل 1مل لكل طبق , اما الاطباق الثلاثة الاخرى فقد لقحت بلقاح بكتريا *P. fluorescens* مخفف (10^{-9}) وبواقع 1مل لكل طبق . خضع محتوى الدورق الثاني (تركيز 20%) لنفس الخطوات السابقة . واحتوى هذا الاختبار على معاملة مقارنة وتمثلت بستة اطباق لم يتم معاملتها بالمبيد اذ لقح ثلاث منها بلقاح مخفف من البكتريا *B. subtilis* والثلاثة الاخرى بلقاح مخفف ايضا من بكتريا *P. fluorescens* بعدها حضنت جميع الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , بعدها حسبت اعداد المستعمرات النامية في كل طبق ثم طبقت معادلة (Clark (1965 لاستخراج اعداد البكتريا في المليلتر الواحد .

عدد خلايا البكتريا (مل) = معدل عدد المستعمرات في كل طبق × مقلوب التخفيف .

3. 2. 4. 7. المعالجـة الاحيائيـة لمبيـد Bifenthrin بـدليل نسـبة الانبـات لحبـوب بعـض المحاصيل .

أ – تهيئة الحبوب :

تم تهيئة ثلاث انواع من حبوب المحاصيل الاقتصادية المحلية حنطة , شعير , ذرة صفراء قسم كل نوع الى قسمين بواقع 300 حبة لكل قسم , بعدها قسمت كل مجموعة الى 10مجاميع ثانوية (وفقا لعدد المعاملات) بواقع 30 حبة لكل مجموعة (3) مكررات لكل معاملة , عقمت الحبوب سطحيا بمحلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% لمدة خمسة دقائق وغسلت بعدها بماء معقم ثم جففت على ورق الترشيح .

ب – تحضير تراكيز من مبيد bifenthrin المعامل بعزلتي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* .

حضر وسط المرق المغذي المشار الية في الخطوة 3 من الفقرة (3. 2. 2.) وتم توزيعه على ثمانية دوراق نظيفة وبواقع 100 مل / دورق , بعدها اضيف تركيز واحد لكل دورقين من التراكيز (5 , 25 , 50 , 100) مايكروليتر / 100 مل بعدها لقحت اربعة دوارق منها بالبكتريا *B. subtilis* والاربعة الاخرى بالبكتريا *P. fluorescens* وبمعدل خمسة مستعمرات من نوعي البكتريا وكلا على حده لكل دورق والمنماة على وسط المرق الصلب N. agar وبعمر 24 ساعة بعدها حضنت الدوارق بدرجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة . (Leben واخرون , 1987) .

ج – معاملة الحبوب :

تم معاملة اصناف الحبوب الثلاثة (حنطة , شعير , ذرة صفراء) كلا على حده بالمعاملات التالية :

1- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (5مايكروليتر/ 100مل) والمعامل مسبقا" بالبكتريا *p. fluorescens*
2- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (25مايكروليتر/ 100مل) والمعامل مسبقا" بالبكتريا *p. fluorescens*
3- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (50مايكروليتر/ 100مل) والمعامل مسبقا" بالبكتريا *p. fluorescens*
4- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (100مايكروليتر/ 100مل) والمعامل مسبقا" بالبكتريا *p. fluorescens*

5- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (5مايكروليتر/ 100مل) فقط
6- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (25مايكروليتر/ 100مل) فقط
7- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (50مايكروليتر/ 100مل) فقط.
8- معاملة الحبوب بمحلول المبيد (100مايكروليتر/ 100مل) فقط.
9- معاملة الحبوب بعالق بكتريا *P. fluorescens* فقط :
10- معاملة السيطرة , حبوب لم تعامل باي شي .

عوملت الحبوب بالتراكيز للمبيد bifenthrin المعامل مسبقا بعالق البكتريا والمحضون لمدة 24 ساعة والحال نفسه عند معاملة الحبوب بالمبيد فقط (الغير معامل بالبكتريا) وذلك بتنقيعها بالعالق البكتيري لمدة خمسة دقائق ثم وزعت على اطباق بتري معقمة وضع فيها ورق ترشيح تم ترطيبه بماء مقطر معقم وبواقع 10 بذرات لكل طبق ولثلاث مكررات لكل معاملة , حضنت الاطباق بحرارة 30 م° لمدة سبعة ايام , اجريت نفس الخطوات المذكورة اعلاه في معاملة اصناف الحبوب الثلاثة بعزلة البكتريا *B. subtilis* .

د – حساب نسبة الانبات :

تم حساب نسبة الانبات للحبوب بعد مرور اسبوع على حضنها بدرجة حرارة 35م° وذلك وفقا" للمعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد الحبوب النابتة}}{\text{العدد الكلي للحبوب المزروعة}} \times 100$$

3. 2. 4. 8. تصنيع مستحضرات حيوية من لقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و. *P . fluorescens*

3. 2. 4. 8. 1. تحديد الوسط التخمري المناسب لتنمية لقاح نوعي البكتريا .

تم اختبار كفاءة نوعين من المستخلصات كأوساط تخمرية سائلة لانتاج لقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* هي مستخلص بذور الذرة الصفراء والحنطة , حيث تم جرش 25 غم من كلا النوعين من انواع البذور بواسطة مطحنة كهربائية ونقعت في 250 مل ماء مقطر معقم ولمدة

24 ساعة ثم رشحت المستخلصات بواسطة قطع شاش معقم وجمعت بدوارق نظيفة ثم عقمت الدوارق بالموصدة لمدة 20 دقيقة بحرارة 121م° وضغط 1جو . (حميد , 2001 و العاشور, 2005) .

بعدها بردت الاوساط ولقحت بخمس مستعمرات من عزلتي البكتريا *B.subtilis* و *P. fluorescens* المنماة على وسط N. agar ولمدة 24 ساعة كلا" على حده , وحضنت دوارق الاوساط التخمرية لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37 م° بعدها تم عمل سلسلة من التخافيف للوسط الملقح ببكتريا و *P. fluorescens*. (10 $^{-1}$ - 10 $^{-9}$) و (10 $^{-1}$ - 10 $^{-7}$) للوسط الملقح ببكتريا *B.subtilis* وزراعة 1 مل من التخفيف الاخير بطريقة النشر في اطباق بتري حاوية على وسط N.agar المعقم وبواقع (3) مكررات ,ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة , وحسبت معدل اعداد البكتريا في كل طبق ثم استخرجت اعداد البكتريا في المليلتر الواحد حسب معادلة Clark(1965) .

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

تم اختيار الوسط الأكثر كفاءة في زيادة معدل الأعداد للبكتريا كوسط تخمري لإنتاج المستحضر الحيوي .

3. 2. 4. 8. 2. تحديد مادة التحميل المناسبة لانتاج المستحضر الحيوي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* .

تم اختبار كفاءة ثلاثة مواد هي كاربونات الكالسيوم , الكاؤولين (طين خاوة) , petmose بوصفها مواد حاملة للقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* . واختبار افضلها للتحميل وشمل الاختبار اخذ (100) غم من كل مادة ووضعه في اواني نظيفة ثم عقمت الاواني الحاوية على مواد التحميل في فرن كهربائي بدرجة حرارة 160 م° ولمدة ساعة وتركت لتبرد , ثم اضيف للآنية الاولى (100) مل من الوسط التخمري لبكتريا *B. subtilis* اما الانية الثانية فاضيفت اليها 100 مل من الوسط التخمري المنمى عليه بكتريا *P. fluorescens* والمحضر مسبقا" بعمر 24 ساعة بعدها نقلت الاواني الى فرن كهربائي بدرجة حرارة 40م° لمدة اربعة ايام لحين جفافها جيدا بعدها تم طحن المساحيق المحملة عليها نوعي البكتريا كلا" على حده في غرفة معقمة (Hood) بعد ذلك حضرت سلسلة تخافيف من كل مسحوق من المسحوقين المحضرين , (10 $^{-1}$ - 10 $^{-7}$) للمسحوق الاول و (10 $^{-1}$ - 10 $^{-9}$) للمسحوق الثاني ثم نقل 1 مل من التخفيف الاخير للعالق المسحوق الى اطباق زجاجية حاوية على

وسط N. agar المعقم وبواقع (3) مكررات وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 1±37 م° لمدة 24 ساعة (حميد , 2001 : العاشور ,2005)

بعدها تم تقدير اعداد البكتريا في الغرام الواحد من كل مسحوق وذلك بحساب معدل عدد المستعمرات النامية في الاطباق مضروبا في مقلوب التخفيف (السماك , 1983) .

3. 2. 4. 8. 3. تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة .

في ضوء نتائج التجربة الموضحة في الفقرة اعلاه تم اعتماد كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة ومستخلص بذور الذرة الصفراء كوسط تخمري لنوعي البكتريا , ولتحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة أخذ (300) غم من كاربونات الكاسيوم المعقمة ووزعت الى قسمين في اواني معقمة بواقع 100غم و 200 غم لكل انية واضيف لكل منها وسط التخمر لعزلتي البكتريا والمحضر مسبقا بعمر 24 ساعة بنسبة (100) مل كلا" على حده (أي مجموعتين) ومزجت جيدا ثم وضعت في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 م ° لمدة اربع ايام لحين جفافها , بعد التجفيف تم طحن النسب المختلفة للمادة الحاملة الممزوجة مع لقاح العزلتين كلا" على حده وحضرت منها سلسلة تخافيف (10 $^{-1}$ - 10 $^{-7}$) لبكتريا *B. subtilis* (10 $^{-1}$ - 10 $^{-9}$) لبكتريا *P. fluorescens* وزرع التخفيف الاخير من كل مجموعة في اطباق من وسط N. agar المعقم وبواقع ثلاثة مكررات , حضنت الاطباق بدرجة حرارة 1±37 م° لمدة 24 ساعة (حميد , 2001) .

بعدها تم حساب كثافة نمو البكتريا من خلال تطبيق معادلة Clark(1965) .

3. 2. 4. 8. 4. انتاج المستحضر الحيوي النهائي لنوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* .

على ضوء الاختبارات السابقة تم اعتماد وسط مستخلص بذور الذرة الصفراء كوسط تخمري ومادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح نوعي البكتريا *B.subtilis* و *P. fluorescens* وبنسبة 1 :1 (وسط تخمري , مادة حاملة) واجريت نفس الخطوات المشار اليها في الفقرة (3. 2. 4. 7. 2.) .

بعد الانتهاء من انتاج المستحضر الحيوي تم تقسيمه الى نمطين الاول حضرت منه كبسولات مبلمرة (Rekha , 2006) .

والنمط الاخر حفظ في قناني زجاجية معقمة ذات سداد محكم وحفظت من اجل الاستعمال المتكرر . (العاشور , 2009) .

3. 2. 4. 8. 5. اختبار فعالية المستحضر الحيوي في تحطيم مبيد bifenthrin الملوث للتربة .

تم تهيئة 12 سندانة قطر الواحده منها 13 سم قسمت الى اربع مجاميع كل مجموعة ثلاثة سنادين ثم ملئت ثلاثة مجاميع منها بتربة مزيجية مقدار 200غم ملوثة بتركيز 1% من مبيد bifenthrin وتركت مجموعة واحدة ملئت بتربة غير ملوثة بالمبيد كمعاملة سيطرة , حضرت حبوب حنطة صنف مكسيباك ونظفت من الشوائب ثم عقمت بمادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2% ولمدة خمسة دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم بعدها تم تعفير الحبوب بالمستحضرات الحيوية التي صنعت من لقاح نوعي البكتريا *B. subtilis* و *P. fluorescens* بتركيز 10 غم / كغم حبوب كلا" على حده , بعدها زرعت في السنادين وبواقع 30 كغم / دونم (العميدي , 2009) .

وزرعت حبوب غير معاملة بالمستحضر في التربة الملوثة بالمبيد كمعاملة مقارنة ايضا اضافة الى معاملة المقارنة المتمثله بالحبوب الغير معاملة والمزروعة في التربة الغير ملوثة بالمبيد , بعدها سقيت جميع السنادين بالماء ووضعت في المنبتة بدرجة حرارة 25 م^{o} وحسبت النسبة المئوية للانبات بعد مرور (5 – 10) ايام من الزراعة على وفق المعادلة التالية :

$$\text{النسبة المئوية للانبات} = \frac{\text{عدد الحبوب النابتة}}{\text{العدد الكلي للحبوب}} \times 100$$

3. 2. 4. 8. 6. قابلية المستحضر الحيوي للخزن

بعد الانتهاء من عملية انتاج المستحضر الحيوي الجاف لنوعي البكتريا *B.subtilis* و *P.fluorescens* كلا" على حده , تم تخزينه في ظروف المختبر , وبعد مرور 6 أشهر من الانتاج تم تقدير اعداد البكتريا في الغرام الواحد وكما ورد في الفقرة (3. 2. 4. 7. 2.) . (حميد , 2001 و العاشور , 2009)

3. 3. التحليل الاحصائي

نفذت التجارب المختبرية على وفق التصميم العشوائي الكامل كتجارب وحيدة العامل , حللت النتائج باستعمال جدول تحليل التباين وقورنت المتوسطات بحسب اختبار اقل فرق معنوي (L.S.D.) تحت مستوى معنوية (0.05) .

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات Conclusions

1- اظهرت بكتريا *Lactococcus lactis* فعالية عالية في تحطيم سم الافلاتوكسين B_1 خارج الجسم الحي *Invitro* وداخل الجسم الحي *Invivo* .

2- لم يكن لنواتج التحطيم الحيوي اية اثار سمية في النظم الحيوية لحيوانات ذكور الجرذ الابيض .

3- حافظت بكتريا *Lactococcus lactis* على فعاليتها التحطيمية لسم الافلاتوكسين B_1 بعد معاملتها حراريا" .

4- التحضيرة المصنعة من بكتريا *Lactococcus lactis* والمقتولة حراريا" كانت فعالة في اختزال سمية الافلاتوكسين B_1 في النظم الحيوية لذكور الجرذ الابيض .

5- ابدى نوعي البكتريا *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* قدرة على النمو في الوسط الزرعي .P.D.A والمسمم بالمبيد Bifenthrin .

6- اثبتت عزلة بكتريا *Pseudomonas fluorescens* فعالية عالية في اختزال سمية مبيد bifenthrin مقارنة ببكتريا *Bacillus subtilis* داخل الجسم الحي تجلى ذلك من خلال حمايتها للنظم الحيوية المدروسة لحيوانات الجرذ الابيض .

7- اظهر نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* حماية جيدة لحبوب بعض المحاصيل من الاثار السمية لمبيد Bifenthrin في الاطباق .

8- اثبت المستحضرين الحيويين المصنعين من نوعي البكتريا *P. fluorescens* و *B. subtilis* فعالية عالية في معالجة التربة الملوثة بمبيد Bifenthrin .

التوصيات Recommendation

1- اجراء دراسة باستخدام الحيوانات المختبرية تتضمن تجريع الحيوانات بجرع مختلفة من التحضيرة الحيوية لبكتريا *Lactococcus lactis* لمدة زمنية طويلة بحيث لاتقل عن 48 – 96 اسبوع للتاكد من عدم وجود اعراض جانبية للمستحضر . بعدها يمكن استخدامه تجريبيا" على متطوعين لاثبات فعاليته في اختزال سمية السموم الفطرية وبخاصة الافلاتوكسينات داخل جسم الانسان . مع اجراء اختبارات تكميلية للتحضيرة الحيوية وامكانية تصنيعها على شكل دواء .

2- اختبار فعالية المستحضر الحيوي لبكتريا *Lactococcus lactis* في معالجة سموم فطرية اخرى مثل Ochratoxin A و Fumonisin و Patulin وغيرها .

3- اجراء تجربة حقلية للتعرف على تاثيرات البيئة على فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح بكتريا *P. fluorescens* في معالجة مبيد Bifenthrin .

4- اختبار فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح البكتريا *P. fluorescens* في معالجة مبيدات اخرى ملوثة للتربة .

- Agag, B.I. (2004) . Mycotoxins in foods and feeds : Aflatoxins . Association of Universal Bullettin of Environmental Research . 7(1) : 173-191 .
- Aislabie, J. and Lioyd-Jones, G. (1995). A review of bacterial degradation of pesticides , Australin J. of Soil . Research. 33. Pp. 925-942 .
- Akehrberg, C. ; Hofvendahl, K. ; Zacchi, G. and Hahn-Hägerdal, B. (1998). Modellingth influence of PH ,temperature , glucose and lactic acid concentration on the kinetics of lactic acid prodaction by *Lactococcus lactic* spp. Lactic ATCC 19436 in whole-wheat floure. Applied Micro. And Biotech. 49(6): 682-690 .
- AL-Adil, K. M. ; Busima, A. A. N. ; Sawsan, A. Y. and Kassim, A. D. (1977) . Contamination by *Aspergillus flavus* group of some food stuffs in Baghdad . Bull. Biol. Res. Center. 9 : 107-115.
- Albert, J. F. ; Englbrecht, Y. ; Steyn, P. S. ; Holzapfel, W. H. and Vanzyl, W. H. (2006). Biological degradation of aflatoxin B_1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. Int. J. Food Microbiol. 109: 121-126 .
- Alina, P. ; Cristina, M. P. ; Valentin, T. G. ; Mihai, P. (2012). Histopathological changes in the Liver and Kidney tissus of marsh frog (*pelophylax ridibundus*) in duced by the action of Talstar 10EC insecticide . Analele Univer. Din Oradea. Fascicula Biologia . Tom . XIX , Issue : 1. Pp. 5-10 .
- Allameh, A. ; Razzaghi-Abyaneh, A. ; Shams, M. ;Rezaei, M. B. and Jaiman, K. (2001). Effects of neemleaf extract on production of aflatoxins and fatty acid synthetase , citrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus* . Mycopathologia . 154 :79- 84 .
- Amara, M. A. ; Robie, K. A. and Tajkhan, A.(1996) . Activity of fluorescens mutants in relation to groth Pseudomonas regulators production and biological control in tomato plant . Annals of Agriculture Science Cairo. 41(1):111-124 .

- Anhwange, B. A. (2008). Chemical composion of Musa sapientum (Banana) peels. J. of Food Technology. 6 (6):263-266 .
- Ara, K. (2007). Bacillus minimum genome factory : effective utilization of microbial genome information . Appl. Biotechnol. Biochem. 46(3): 169-178 .
- Asao, T. ; Buchi, G. ; Abdel-Kader. M. ; Chang, S. B. ; Wick, E. L. and Wogan, G. N. (1963). Aflatoxin B and G . J. Am. Chem. Soc., 85: 1706-1707 .
- Bancroft, J. D. ; Stevens, A. (1982). Theory and practice of histological technique .Churchill living Stone. New York . pp.117 .
- Bandow, J. E. ; Britz, H. and Hecker, M. (2002). *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentration of rifampin involves the B-dependent general and multiple stress response . J. Bacteriology . 184(2): 459-467 .
- Barragan-Huerta, B. E. ; Costa, C. ; Peralta, J. ; Barrera, J. ; Esparza, F. and Rodriguez, R. (2007) . Biodegradtion of Organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous stracture of green bean coffee Spain . Inter. Biodeterioration and Biodegr. 59: 239-244 .
- Bata, A. and Lasztity, R. (1999). Detoxification of Mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms . Trend Food Sci. Technol. 10: 223-228 .
- Belgin, M. ; Ozlem, K. and Halukcelik, T. (2004) . Detection of aflatoxin M1 in cheese samples by ELISA . Food Control. J. 15(1): 45-49 .
- Bennett, J. W. and Christensen, S. B. (1983). New perspectives on aflatoxin biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol., 29: 53-92.
- Bhalli, J. A. ; Khan, Q. M. ; Haq, M. A. ; Khalid, A. M. and Nasim, A. (2006). Cytogenetic anaylsis of Pakistani individuals occupationally exposed to pesticide in a pesticide production industry . Mutagenesis . 21: 143-148 .
- Bhaskar, V. ; Raj, T. R. ; Kandasamy, S. K. ; Vijayknmar, P. and Achary, A. (2008). Optimization of production of subtilish in solid substate

fermentation using response surface methodology . African J. of Biotech. Vol. 7(13): 2286-2291 .

- Bhatnagar, D. ; Lillehoj, E. B. and Arara, D. K. (1992). Hand book of Applied Mycology . vol. 5 Mycotoxions in ecological system . Marcel dekker. Inc. NewYork. Pp.213-229 .
- Blanco, J. L. ; Carion, B. A. ; Liria, N. ; Diaz, S. ; Garcia, M.E.; Dominguez, L. and Suarez,G. (1993). Behaviour of aflatoxin during manufacture and storage of yoghurt Milchwissenschaft . 48:385-389 .
- Bloomquist, J.R. (1993). Neuro receptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance . Rev. Pestic. Toxico. , 2:185-226 .
- Bologenes, C. ; Bonatti, S. ; Degan, P. ; Gallerani, E. ; Peluso, M. ; Rabboni, R. ; Roggieri, P. and Abbondandolo, A. (1997). Genotoxic activity of giyphosate and its technical formulation roundup . J. Agric. Food Chem. , 45:1957- 1962 .
- Bologenes, C. ; Perrone, E. and Landini, E. (2002). Micronucleus monitoring of afloriculturist population from western liguria. Itaiy . Mutagenesis . 17(5): 391- 397 .
- Bologenes, C. (2003). Genotoxicity of pesticides : a review of human biomonitoring studies . Mutant. Res. 543: 251-272 .
- Braat, H. ; Rottiers, P. ; Hommes, D.W. ; Huyghebaert, N. ; Remaut, E. ; Remon, J. P. ; VanDeventer, S. J. ; Neirynck, S. ; Peppelenbosch, M. P. and Steidler, L. (2006). A phase Itrial with transgenic bacteria expressing interleukin -10 Crohn' s disease. Clin Gastroenterol Hepatol . 4(6): 754-759 .
- Broadbent, P. ; Baker, K. F. and Waterworth, Y. (1971). Bacteria and Actinomycetes soil . Austr. J. Biol. Sci. , 24:925- 944 .

- Brotz, H. and Sahl, H. G. (2000). New insights into the mechanism of action of antibiotics diverse biological effects by binding to the same molecular target . J. Antimicrob Chemother. 46(1): 1-6 .
- Brown, B.A. (1976). Principles and procedure . 2nd ed. Lea and Febiger . Philadelphia. NewYork . pp. 78 .
- Buffin, D. (2000). Diazinon pesticide news . 49 : p20. https:// secure.
- Bull, S. ; Flecher, K. ; Boobis, A.R. and Battershill,J.M. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators : areview, Mutagenesis . 21:93- 103 .
- Carlson, H.K. ; Fares, B.I. and Garder, J.O.(2002). Aflatoxins , In : Mycotoxins . Let. Rev. London . Press. P.1-7 .
- Cast, .(2003). Mycotoxins : risks in plant , animal and hnman system (Cunical for Agricultaral Science and Technology). Task Force Report , Ames Low , USA . No. 139 . pp:45- 60 .
- Chango, S. B. ; Abdel-Kader, M.M. ; Wick, E.L. and Wagon, G.N. (1963). AflatoxinB2 : Chemical identity and biological activity Scince . 142: 1191-1192 .
- Chen, X. H. ; Koumoustsi, A. ; Scholz, R. and Eisenreich, A. (2007). Comparative analysis of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens*FZB42 . Nature Biotech. Vol.25 :No.9 .
- Chinoy, N. J. ; Joseph, R. ; Sequeira, E. and Narayana, M.V. (1991). Effect of mycotoxins on the muscle and liver of albino rats . India . J.Environ. Food Toxicol. 1: 129-134 .
- Chiou, A. ; Verger, R. and Kokotos, G. (2001). Synthetic routes and lipase inhibiting activity of long chain alpha-keto amides . 63(5):535-542.
- Ciegler, A. ; Lillehoj, B. ;Peterson, R.E. and Hall, H. (1966). Microbiol detoxification of aflatoxin . Appl. Microbiol. 14: 826-833.

- Ciegler, A. ; Burmeister, H. R. and Vesonder, R. F. (1983). Posionous fungi : Mycotoxin and mycotoxicosis in fungi pathogenic for human and animal . Part B. Pathogenicity and Detection : 1" (D.H.Howard and L.F. Howard eds.) . pp. 413-469 .
- Clark, F.E. (1965). Agar- plats method for total microbial (C. F. Black, 1965 methods of soil anaylsis . Part2 puplisher Madison , Wisconsin . USA . PP. 1572 .
- Cole, K. E. ; Hsu, I. C. and Trump, B.F. (1986).Comparative ultastural effect of aflatoxin B_1 on mouse , rate and human gepatocytes in primary culture . Cancer Research . 46:1290-1296 .
- Coles, D.V. M. and Embert, H. (1986). Veterinary Clinical Pathology . 4th. ed. W. B. Saunders Company .
- Coles, E.H. (1990). Veterinary Clinical pathology .3.E.W. Saunders Company . PP.56-70 .
- Collee,J.G. ; Fraser, A.G. and Marmion , B.P. (1996). Practical medical microbiology . (14 th ed.) Churchill Livinston . USA. a37 .
- Cook, R. (1996). Acceptable risk . Barkley, NewYork . N.Y.
- Cotty, P.J. (1989).Viruleuce and cultural characteristic of two Aspergillus flavus strains pathogenic on cotton . Phytopathology J. 79(7):808- 814 .
- Cotty, p., (1988). Aflalatoxin and Sclerotial production by Aspergillus flavus influence of pH . Phytopathology , 78: 1250 – 1253 .
- Creppy, E.E. (2002). Update of survey , regulation and toxic effect of Mycotoxin in Europe doxicol. Lette. 127(1-3): 19-28 .
- Cullen, J. M. and Newberne, P.M. (1994). Human health , Veterinary , and Agricultural significance . San Diego , Calfornia USA : Academic press. Pp. 1-26 .
- Curtis, D.K. and John, B.W. (2003) . Casarett & Doull's Essentials of toxicology . McGraw- Hill Companies, Inc. Medical Publishing Division . pp: 533.

- Desaint.S. ; Hartman, A. ; Parkh, N.R. and Fournier, J. C. (2000). Genetic diversity of carbofuran degrading soil bacterial . FEMS Microbio. Ecology . 34:173-180 .
- Detroy, R.W. ; Lillihoj, E.B. and Ciegler, A. (1971).Aflatoxins and related compound . In '' Microbial toxin '' (A. Ciegler, S. Kadis and S. J. Ajl . eds) . vol.6 0 pp.1-178 .
- Donmez, N. ; Donmez, H. ; Keskin , E. and Kisadere, I. (2012). Research article effects of aflatoxin on some haematologyical parameters and protective effectiveness of esterified glucomannan in merino rams . The Sci. World J. 10: 1- 4 .
- Dorner, J.w. (2005). Biological control of aflatoxin crop control . In: H. K. Abbas (ed), aflatoxin and food safety , Taylor and Francis ,Boca Roton , pp. 333- 352 .
- D´Souza, D.H. and Brackett, R.E. (2000).The influence of divalent cation and chelators on aflatoxin B1 degradation by Flavobacterium aurantiacum J. Food Prot. 63: 102-105 .
- D´Souza, D.H. and Brackett, R.E. (2001).AflatoxinB1 degradation by Flavobacterium aurantiacum in the presence of reducing condation and seryl an sulfhydryl group inhibitors J. Food Prot. 64: 268- 271 .
- Dutton, M.F. and Heathcote, J.G. (1969).Two new hydroxyl aflatoxin . Chem. Ind. 983 .
- Eaton, M. G. and Gallagher, G.F. (1994). Proprieties of aflatoxin . FAD. Food and Nutrition . pp. 15:12-13 .
- Eklow, L. ; Rossi, L. ; Thor, H. and Orrenius, S. (1986).Effect of oxidative stress caused by hyperoxida and diquat. A study in isolated hepatocytes . Free. Radic. Res. Commun . 2(1-2): 57-68 .

- EL-Hamshary, O.I.M. and Khattab. A. A. (2008). Evaluation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* and their fusant against *Fusarium solani* . Research J. of Cell and Medecular Biology . 2(2): 24- 29 .
- EL-Khatib, E. and Rokaya, H.A. (2001).Genotoxic effect of two pesticides and their mixtures : Invitro chromosomal aberrations assays J.Union Arab. Biol.(16A) Zoology . 355- 380 .
- EL-Khoury, A. ; Atoui, A. and Yaghi, J. (2011). Analysis of aflatoxin M_1 in milk and yogurt and AFM_1 reduction by Lactic acid bacteria used in Lebanese industry . Food Control. 22: 1695-1699 .
- Ellen, M. ; Anthony, B. and Deirdre, M. (2013) . Milk and dairy production in human nutrition . Food Agric. Organi. Of the United Nations. Pp.374 .
- EL-Nezami, H. ; Kankaanpaa, P. ; Salminen, S. and Ahokas, J. (1998).Ability of dairy strains of lactic bacteria to bind acommon food carcinogen , aflatoxin B1 . Food Chem. Toxicol., 36:321-326 .
- EL- Sanhoty, R.M. (2008). Screening of some *Lactobacillus* strains for their antifungal activites against aflatoxin – producing Aspergilli invitro and maize . J. OF Food Agr. And Environ. Vol.6 . 38(4): 35-40 .
- Erik, D. (2004). Mycotoxin regulation implications for International Agricultural Trade. Economic Research Service, United States Department of Agriculture .
- Esser, K.and Lemke, W.A.(1996). Series preface . In M.H. Howard and J.M. Miller (Nds). The Mycoto. Springer Verlag. Berlin , Ermany. Mycologia J. 12(10):13-15 .
- FAO, Food and Agriculture Organization . (2003). Worlde regulation for mycotoxin in food and feed . Food and Nutrition paper 81 .
- FDA, US Food and Drug Administration . (2012).History of the GRAS list and SCOGS Review. FDA. Relrieved . 11 May .

- Finley, S.D. ; Broadbelt, L.J. and Hatzimanikatis, V. (2010). In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1,2,4-Trichlorobenene , BMC system Biology . vol.4 , No.7 . pp. 4-14 .
- Forbish, R.A.; Bradley, B.D. ; Wagner, D.D.; Long-Bardly, P.E. and Hairston, H. (1986).Aflatoxin residues in milk of dairy Cows after ingestion of naturally contiaminated grain . J. Food Prot. 44: 781-785 .
- Fuchs, S. ; Sontag, G. ; Stidl, R. ; Ehrlich, V. ;Kundi, M. and Knasmuller, S. (2008). Detoxification of Patulin and Ochratoxin A two abundant Mycotoxins by Lactic acid bacteria . Food Chem. Toxicol. 46:1398- 1407 .
- Furukawa, K. (2003). ''Super bugs '' for Bioremedation Trends in Biotechnology . 21:187-190 .
- Garrido, N.S. ; Iha, M. H. ; Santos, M. R. and Duarte, R. M. (2003). Occurrence pf aflatoxin M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirao Preto-SP , Brazil . Food Addit . Contam. 20:30-70 .
- Gasson, M. (1993). Progress and potential in the biotechnology of lactic acid bacteria . FEMS Microbiol Lett. 12:3-20 .
- Geiger, L. E. ; Ballester,E. S. ; Barbera, J. and Malloy, A. V. (1986). D Unpublished report No. A83-974 .
- Gibb, A.P. ; Martin, K.M. ; Davidson, G.A. ; Walker, B. ; Murphy, W.G. (1995) . Rate of growth of Psudomonas fluorescens in donated blood . J. of Clinical pathology . 48(8) : 717-8 .
- Govan, J.R. (1997). Pseudomonas of non fermenters . In: Medical microbiology aguide to microbial infection pathogenesis, immunity , laboratory diagnosis of control , By: Green wood,D. ; Slack, R. ; Fpenther, J. 15th ed. Churchll living stone .Tokyo . p.248-289 .

- Groopman ,A.M.;Stevan ,M.A. and Cole,M.N.(2003).Astudy about effect of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* in chiken ,Journal.Med.45(9):5-12.
- Haas, D. and Keel, C. (2003) Regulation of antibiotic production in root – colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease . Annual Reviews of Phytoasthology . 41:117-153 .
- Haas, D. and Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescens* . Nature Reviews in Microbiology . 3(4):307-19 .
- Hagedorn, C. ; Gould, W.D. ;Canmet-EMR and Bardinelli, T.R. (1993). Field evaluations of bacterial inoculants to control to seeding disease pathogens on cotton . Plant disease . 77(3):278-282 .
- Halliwell, B. (2007) . Oxidative stress and cancer : have we moved forward ? Biochemistry Journal . 401: 1-11 .
- Hartley, R.D. ; Nesbitt, B.F. and O′kelly, J. (1963).Toxic metabolites of veterinary toxicology . Litte Rock, Arkansas, USA .PP.231-235 .
- HawKworth, D.L. (1991).The funal dimension of biodiversity : Magnitude , Sihnificance and Conservation . Mycol. Res. 95:641-655.
- Heathcot, J.G. and Hibbert,J.R. (1978).Aflatoxin chemical and biological aspects . Elsevies . NewYork . 55-82 .
- Hedayati, M.T. ; Pasqualotto, A.C. ; Warn, P.A. ;Bowyer, P. and Denning, D. W. (2007). *Aspergillus flavus* : human pathogen , allergen and myctoxin producer . Miocrobiology J. 153(6):1677-1692 .
- Hernandez-Mendoza, A. ;Garcia, H. S. and Steele, J. L. (2009). Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1 . Food Chem. Toxicol. 47: 1064-1068 .

- Hill, E.F. (2003).Wildlife toxicology of organophosphorus and carbamate pesticides : Hand book of Ecotoxicology , in D.J. Hoffman ; B.A. Rattner ; G.A. Burton ; J. Cairns . (Eds) , Lewis publisher, Boca Raton . Florida . pp. 281-312 .
- Hindumathy, C. K. and Gayathri, V. (2013).Effect of pesticide Chlorpyrifos on soil microbial flora and pesticide Dedradation by strains isolated from contaminated soil . J. Bioremed. And Biodegr. 4:2 .
- Hocking,A.D. and Pitt,J.I. (1997).Fungi and food spoilage (second ed.) Shampan and Hill. U.K. pp.989 .
- Hooghe, R.L. ;Devos, S. and Hooghe-Feters, E.L. (2000).Effect of selected herbicides on cytokine production in vitro .Life . Sci. , 66(26):2519-2525 .
- Hormisch,D. ; Brost, I. ; Kohring, G.W. ; Giffhorn,F. ;Kroppenstedt, R.M. ;Stackebrandt, E. ;Farber, P. and Holzapfel, W.H. (2004). *Mycbacterium fluoranthenivorans* sp. nov. , afluoranthen and afalatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of aformer coal gas plant . Syst. Appl. Microbiol. 27:653-660 .
- Hussein, S. and Brasel, J.M. (2001). Toxicity , metabolism and impact of mycotoxin on hummans and animals . Toxicolgy . 15: 101-134 .
- Jay,J. M. (2000).Taxonomy , role and significance of microorganism in food , In. Modern Food Mictobiology , Aspen Publisher. Gaithersburg MD . P. 13 .
- Ji, B. T. ; Silverman, D.T. ;Stewart, P.A. ;Blair, A. ;Swanson, G.M. ; Baris, D. ; Greenberg, R. S. ; Hayes, R.B. ;Brown, L.M. ; S chwartz, A. G. and Hoover, R. N. (2001) . Occupational exposure to pesticide and pancreatic cancer . Ame. Jou. Ind. Med., 39:92-99 .
- Jouany, J. W. , Ziannikouris, A. and Bertin, G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of animals have been identified . Research centre of Clermont-Theix . France . pp.78 -90 .

- Jong-Gyn, K. (2007). Anti-aflatoxigenic activity of some bacteria related with fermentation . Republic of Korea . Trends in Appl. Microbiology . 704-701.
- Kabak, B. (2002). *Lactobacillus acidophilus* and Bifiacbacterium pumpkin Bifidum *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 investigation of the effect on invitro . Msc.Cukurova University Institute of Science , Adana in Turkish .
- Kalwasinska, A. ;Jacek, k. and Dondersk, W. (2008). Biodegradation of carbendazin by Epiphytic and neustonic bacteria of Eutrophic chelmzynskic lake . Polish J. of Microb. Vol. 57 . No. 3: 22-230 .
- Kankaankpaa, P. ; Tuomola, E. ; El-Nezami, H. ; Ahokas, J. and Salminen , S. P. (2000). Binding of aflatoxin B_1 alters the adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in acaco-2 model . J. Food Prot., 63: 412-414 .
- Kassie, F. ; Parzefall, W. and Knasmuller, S. (2003) . Single cell gell electrophoresis assay : anew technique for human biomonitoring studies . Mutat. Res., 463: 13-31 .
- Kemacki A. ; David, M. and Broti ,M.(1998). Histopathology ,O.Chuchil Living stone .New York.pp:12-14.
- Kerovuo, J. ; Rouvinen, J. and Hatzack, F. (2000). Analysis of mycoinositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus phytase* indication of Anoval action mechanism . Biochem. J. vol. 352:623- 628 .
- Klassen, C. ; Amdur, M. and Doull, J. (1996) . Casarett and Doulls' Toxicology . Macmillan Publishing Company . 3rd ed. Pp. 591 .
- Kloepper, J.w. and Ryu, C. M. and Zhsng, S. (2004). Induced rsystem , resistance and promotton of plant growth by Bacillus spp. Phytopathology . 94: 1259-1266 .

- Koh, H. and Tseneg, T. (1975). Isolated and identification of an aflatoxin production strain of Aspergillus flavus group from stored rice . Bot. Bull. Academic Sinica . 16: 115 -125
- Kornuta, N. ; Bagleg, E. and Nedopitanskaya , N. (1996) .Genotoxic effect of pesticides . J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., 15(2-4) : 75-78 .
- Kown-Chung, K. J. and Bennet, J. E. (1992) . Medical Mycology . Lea. and Febiqer . pp. 745 .
- Krishnamachari, K.A.V. ; Bhat, R. V. ; Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G. (1975) . Investigation into an break of hepatitis in part of western India . Indian J. Med. Rej. 63:1036- 1048 .
- Kusmaningtyas, E. ;Widiastuti, R. and Maryam, R. (2006) . Reduction of aflatoxin B_1 in chicken feed by using *Saccharomces cerveisiae* , *Rhizopus oligosporus* and their combination . Mycopathologia . 162: 307-311 .
- Laura, A. ; Claudio, B. ; Cristina, C. and Gianfranco, G. (2013) . Lateral flow Immunoassays for aflatoxins B and G and for aflatoxin M1 : Aflatoxins Recent Advances and future prospects '' chapter15 . Agric.and Biol. Sci.
- Laura, O.H. ; Eurique, S.S. ; Edgar, D. G. and Maria, L.C.G. (2013) . Pesticide biodegradtion : Mechanisms , Genetics and strategies to enhance the process: " biodegradation – life of science " chapter 10 . Agric. And Biol. Sci.
- Leben, S.D. ; Wadi, J.A. and Faston, G.D. (1987). Effect of *pseudomonas fluorescens* CHAO on potato plant growth and control of *Verticlillum dahliae* . Phytopathology . 77:1592- 1595 .
- Lee, K. O. ; Bai, Y. ;Smith, D. ; Han, H.S. and Supanjan, J. I. (2005) . Isolation of plant –growth prompting endophtic bacteria from bean nodules . Research J. of Agricu. And Biological . Sci., 1(3): 232-236 .

- Lillehoj, E. B. ; Wall, J.H. and Bowers, E. J. (1987). Pre-harvest aflatoxin contamination effect of moistures and substrate variation in developing cotton seed and corne kernel . App. Environ. Microbiol. , 53: 584-586 .
- Liu, D. L. ; Yao, D. S. ; Liang, Y.O. ; Zhou, T. H. ; Song, Y. P. ; Zhao, O. L. and Ma, L. (2001) .Production , purification and characterization of an intrsclluler aflatoxin – detoxifizyme from *Armillariella tabescens* E20 . Food Chem. Toxicl., 39:461 -466 .
- Lucero, L. S. ; Pastor, S. ; Suarez, R. ; Durban, G. ; Gomez, T. ; Parron, A. and Creus, R. (2000) . Cytogentic biomonitoring of Spanish green house workers exposed to pesticides micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cell . Mutat. Res. , 464: 255-262 .
- 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 .
- MacSween, R.W. and Whaley, K. (1992). Murices development and survey .Food Addit. Cutam. 16: 253 .
- Madigan, N. and Martinko, J. (2005) . Brock biololgy of microorganisms (11th ed.) . Prentice Hall . ISBN .13- 144329 .
- Magan, N. and Olsen, M. (2002) . Mycotoxin in food . wood head publishing limited .Cambridge England . pp.700 .
- Mandelbaum, R. T. ;Allan, D.L. and Wackett, L.P. (1995). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the striazine herbicide atrazine . Appl. Environ. Microbiol. . 61:1451- 1457 .
- Marin, D. E.; Taranu, I.R.P.; Bunacin , F., Pascale , Tudor , D.S.; Avarm , N.; Sarca , M. ; Cureu , I. ; Criste , R. D.; Stuta , V. and Oswald , I. P. (2002) . Changes in Performance , blood parameters , humeral and cellular immune

responses in wealing piglets exposed to low doses of aflatoxin . J . Anim .Sci. 80 : 1250 – 1257 .

- Martello. N. (2006) . Mycotoxin list articals biological decontaminat resource center . United states . pp. 12-45 .
- Maurhofer, M. ; Keel, C. ;Hass, O. and Defago, G. (1994) . Pyoluteorin production by *pseudomonas fluorescens* strain CHAO is involved in the suppression of pythium damping off of cress but not of cucumber . European J. of Plant Pathology . 100:221- 232 .
- McCauley , L.A. ; Anger, W. K. ; Keifer, M. ; Langiey, R. ; Robson. M. G. and Rohlman, D. (2006) . Studies health outcomes in farm worker population exposed to pesticide . Environ. Helth Perspeet., 114:953-960 .
- McFadden, J. F. (2000) . Biochemical test for identification of medical bacteria . (3rd ed.) . Williams and Willkins Company . USA . pp. 912 .
- Meerdink, G.L. (2004) . Aflatoxins . In: Plumlee, K.H. (ed.) . Clinical veterinary toxicology . Little Rock , Arkansas, USA . pp.231-235 .
- Mehmet, T. ; Emrah, S. ; Ilhami, G. ; Yasemin, Ö. And Mustafa, K. (2010) .Effect of aflatoxin on the proportion of peripheral blood leukocytes and alpha- naphthyl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes in the mouse . Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. , 16(2): 337-341 .
- Mello, C.F. ; Barberio, J.C. and Campos, M. A. F. (2003) . Histological analysis of the influence of AFB1 in the albino rat kidney an liver . Revista Associacao Paulista Cirurhia Dent. 17:35-41 .
- Mishra, H.N. and Das, C. (2003). Areview on biological control and metabolism of aflatoxin . Crit. Rev.Food Sci. 43:245-264 .
- Mislivec, P. B. (1981) . Mycotoxin production by conidial fungi in '' Biology of conidial fungi : vol. 2 '' (G. T. Cole and Hendrick , eds.) Acadamic press . pp. 37 -74 .

- Mohmmed, M.S. (2009) . Degradation of methomyl by the novel bacterial strain stenotrophomonas maltophilia M1 . Biotechnology. 12:1-6 .
- Morikawa, M. (2006) . Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bucillus subtilis* and related species . J. Bio. Sci. Bioengineering . 101(1):1-8 .
- Moss, M. O. (1998) . Recent studies of mycotoxins . J. Appl. Microbio. Symposium Supplement . 84: 62-76 .
- Motomura, M. ; Toyomasu, T. ;Mizuno, K. and Shinozawa, T. (2003) . Purification and characterization of an aflatoxin degradation enzyme from pleurotus ostreatus . Microbiol. Res. 158 : 237-242 .
- Moyne, A.L. ; Shellby, S. ;Cleveland, T.E. and Tuzun, S. (2001) . Bacillomycin D : an Iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* . J. Appl. Microbio. 90:622-629 .
- Muniz, J.F. ; McCauley, L. ; Scherer, M. ; Koshy. M. ; Kow, Y.W. ; Nazarstewart, V. and Kisby, G.E. (2008) . Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultueal worker ; apilot studay , Toxicol. Appl. Pharmacol, 227:97- 107 .
- Murphy, S.D. (1986) . Toxic effect of pesticides . In: Klaassen. C.D. ; Amudur, M.O. and Doull, M.D. (eds.) Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons (3rd ed.). Macmillan Publishing Company . New York. 519-581 .
- Murphy, P.A. ; Hendrich, S. ; Landgren, C. and Bryant, C.M. (2006) . Food mycotoxins : An update . J. Food Sci. 71:51-65 .
- Nagroska, K. ; Bikowiski, M. and Obuchowski, M. (2007). Multicellular behavior and production of wide variety of toxic substances support usage of Bacillus subtilis as powerful biocontrol agent . Act. Biochim. Polonica . vol. 54. No. 3 : 495-508 .

- Nakazato, M. ; Morozumi, S. ; Saito, K. ; Fujinuma, K. ; Nishima, T. and Kasai, N. (1990) . Inter conversion of aflatoxin B_1 and aflatoxicol by several fungi . Appl. Environ. Microbio. 56: 1465- 1470 .
- Nelson, M.R. ; Bigelow, R.D. ; Cotty, P.J. and Orum, T.V. (1998) National cotton council . Memphis TN- 1: 163 .
- Olawale, A.K. and Akintobi, O.A. (2011) . Biodegradation of Glyphosate pesticide by bacteria isolated from Agricultural soil . Nigeria . Report and Opinion . 3(1) .
- Omolo, K. M. ; Magoma, G. ; Ngamau, K. and Muniru, T. (2012) . Characterzation of methomyl and carbofuran degading bacteria from soils of horticultural farms in Rift valley and central Kenya . African. J. of Enviro. Sci. and Technology. Vol. 6(2): 104-114 .
- Onilude, A. A. ; Fagade, O.E. ; Bello, M.M. and Fadahunsi, I. F. (2005) . Inhibition of aflatoxin –producing Aspergilli by lacti acid bacteria isolated from indigenously fermented cereal gruels . African J. of Biotechnology . vol. 4(12). Pp.1404-1408 .
- Ortiz-Hernandez, M.L. and Enrique, S. S. (2010) . Biodegradation of organophosphate pesticide Tetrachlorovinphos by bacteria isolated from agricultural soil in Mexico . Rev. Int. Contam. Ambient. 26(1) : 27-38 .
- Osman, M.M. ; EL-Fiky, S.A. ; Soheir, Y.M. and Abur, A. I. (2009) . Impact of pollution on histopathological and electrophoretic characters of Oreochromis niloticus fish . Research J. of Environ. Toxico. 3(1) : 9-23 .
- Palleroni, N.J. (1984) . Pseudomonadaceae. Bergey's manual of systematic bacteriology . Krieg, N.R. and Holt J. G. (editors) . Baltimore : The Williams and Wilkins Co., p. 141- 199 .
- Papiya, M. (2005) . Phyarmacological and toxicological studies of some mycotoxins in animals . J. Med. Vol. 44, No. 78 .

- Park, Y.J. (2001) .Expression , characterization and antifungal activity of phytase from *Bacillus subtilis* Ts 16-111-PhD thesis . Seoul national university library .
- Paulitz, T.C. and Belanger, R.R. (2001). Biological control in green house system . Annu. Rev. Phytopathol . 39: 103-133 .
- Payane, G.A. (1992) . Aflatoxin in maize . Critical Reviews in plant Sciences . 10:423-440 .
- Perez. A. R. ; Abanes-De, M.K. and Poglin, O. (2000) . SpoIIB localizes to active sites of septal biogenesis and spatially regulates septal thinning during engulfment in *Bacillus subtilis* . J. of Bacteriology . 182(4): 1096-1108 .
- Pletonen, K. ; EL-Nezami, H. ; Haskard, C. ; Ahokas, J. and Salminen, S. (2001) . Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria . Dairy Sci. 84:2152-2156 .
- Prescott, L.M. (2002) .Introduction to all major areas of microbiology . Amazon co.uk. the sixth edition . pp. 410 .
- Qinghua, W.U. ; Alena, J. ; Zonghni, Y. ; Lucie, P. ; Vlastimil, D. and Kamil, K. (2009) . Biological degradation of aflatoxin . Drug Metabolism Reviews . 41(1): 1-7 .
- Raber, K. B. and Fennell, D. I. (1965). The genus *Aspergillus* . Williams & Wikins Company , Baltimore . 686 pp.
- Rao, A.S. (1997) . Introduction to microbiology . Eastern Economy Edition , 5^{th} . pp.216 .
- Ray, B. (1996) . Spoilage of specific food groups In Fundamental Food Microbiology , CRC press, Boca Raton Fl, p.220 .
- Reddy, K.R.N. ; Reddy, C.S. and Muralidharan, K. (2009) . Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains . Food Control . 20: 173-178 .

- Rekha, P.D. ; Lai, W.A. ;Arun, A.B. and Young, C. C. (2006) . Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-PG104 on plant growth under gnotobiotic conditions Bioresource technology . 48: 447- 451 .
- Richardson, K.F. ; Nelson, L. A. and Hamilton, P.B. (1987) . Effect of dietary fat levels on dose response relationships during aflatoxicosis in young chickens . Poultry Sci. 66(9): 1470-1478 .
- Robert, R. L. and Deborah, R.F. (1998) . Effect of various fungal and bacterial organism for control of *Fusarium* wilt of tomato . plant Disease . 82(9): 1022-1028 .
- Roy, U. ; Batish, V.K. ; Grover, S. and Neelakantay, S. (1996) . Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* sub sp. lactis . International J. of Food Microb. Vol. 32. Issues 1-2 .
- Sabbioni, G. and Numann, H. G.(1990) . Biomonitoring of arylamines : hemoglobin adducts of urea and carbamate pesticides . Carcinogenesis . 11: 111-115 .
- Saif, Y.M. ; Barnes, H. J. ; Fadly, A. M. ; Glisson, J. R. ; McDougald, L. R. and Swayne, D. E. (2003) . Disease of poultry , 11thed. Lowa State University press, USA . Black well publishing company .
- Sakhare , P.S.; Harne , S.D.D.R.; Kalorey , D. ; Warke , S.R.; Bhandarkar , A.G. and Kurkure , N.V. (2007) . Effect of toxirak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis , ochratoxicosis and combind mycotoxicosis in broilers . Vet. Archiv., 77 : 129 – 146 .
- Samuel, A. O. and Olubukola, O. and Mathew, A. O. (2009) . Hematological and immunological effect on chiken exposed to aflatoxin . Nigeria . Veterinary world . vol. 2(1) : 5-7 .

- Sassahara, M. ; Pontesnetto, D. and Yanaka, E. K. (2005) . Aflatoxin Occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the north of parana state . Food Chem. Toxicol. 43:981- 984 .
- Satio, M. and Machide, S. (1999) . Arapid identification method for aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasitica* by ammonia vapor . Mycoscience . 40 : 250- 258 .
- Schaechter, M. ; Ingraham, J. L. and Neidhardt, F.C. (2006) . Microbiology . ASM press . Washington . pp. 1325 – 1343 .
- Schieifer, K. H. ; Kraus, J. ; Dvorak, C. ; Kilpper-Bälz, R. ; Collins, M.D. and Fischer, W. (1986) . Transfer of *Streptococcus lactis* and related *streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. J. Syst. Bacteriol. 36 : 354-356 .
- Schulz, B. J. E. ; Boyle, C.J.C. and Sieber, T. N. (2006) . Microbiol root endophytes . spriger-verlag . Berlin , Germany .
- Selvam, A. G. and Thatheyus, A.J. (2013) . Biodegradation of the synthetic pyrethroid , fenvalerate by *Bacillus cereus* Mtcc1305 . India . World j. of Environ. Engineering . vol. 1 , No. 2: 21 – 26 .
- Setlow, P. (2006) . Spores of Bacillus subtilis : Their resistance to and killing by radation , Heat and Chemicals . J. of Microbio. 101 (1) : 1-8 .
- 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 .
- Shapira, R. (2004) . Detection and control . In: Magan, N. and Olsen, M. (Eds.), Mycotoxin in food . Bacca Raton , Florida, USA . CRC press. P. 207 .
- Smith , J.E. ; Solomons , G. ; Lewis ,G. and Anderlson ,J. C . (1995) . Natural toxins . Bio Sci . Biotechnol .3 (4) :187-192.

- Sobolev, V.S. and Doruer, J.W. (2002) . Cleanup procedure for determination of aflatoxin in major agricultural commodities by liquid chromatography . J. of Association of official Analytical chemists International . 85: 642- 45 .
- Sood, A. ; Sharma, S. ; Kumar, V. and Thakur, R.L. (2008) . Estabished and abandoned Tea (Camillia sinensis L.) Rhizosphere: Dominant bacteria and their antagonism. Polish J. of Microbio. Vol. 57.No. 1: 71-76 .
- Spicher, G. and Schroeder , R. (2000) . The microflora of sourdough : bacterial composition of sourdough starter . Beijerinck . Z. Lebensm Unters .Forsch . 67:342-354 .
- Strong, P.J. and Burgess, J.E. (2008) . Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters : areview , Bioremediation J. 12 : 70 -87 .
- Susheela, A.K. ; Kumar, A. and Bhatnagar, M. (1992) . Prevalence of myctoxins with gastrointestinal manifestation in animals . J. Med. 12(5): 26-78 .
- Szepietowski, T. and Adamiec, R. (1987). Kidney damage after peroralpoisoning with herbicides. Pol – Try – Lek. . 42 (48) : 1503.
- 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 .
- Thabit, T.M.A. and EL-Naggar, M.A.H. (2013) . Malathion degradation by soil isolated bacteria and detection of degradation products by GC-MS . Inter. J. of Environ. Sci. vol.3 ,No. 5 .
- Thomas, C.E. and Aust, S. D.(1986). Reductive release of iron from ferritin by cation free radicals of paraquat and diquat and other bipyridyls. J. Biol . Chem. 261 (28) : 13064 – 70.

- Thomas, T.D. and Pritchard, G.C. (1997) . Proteolytic enzymes of dariry starter cultures . FEMS Microbiol. Rev. 46 : 245- 268 .
- Todar, K. (2003) . Todar′s online textbook of bacteriology the genus *Bacillus* . University of Wisconsin-madison , Department of Bacteriology .
- Tsokos, J. O.(1989). Evidence in vive for elevation of intracellular freeCa2+ in the liver after diquat. Acetaminophen, and ccl4. Biochem . Pharmacol., 38 (18) : 3061 – 5.
- Tucker, A. N.; Vore, S. J. & Luster, M. I. (1986). Suppression of B- cell differentiation by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Mol. Pharmacol., 29 (4): 372-377. (Abstract).
- Turner. T.B. (1978) . Fungal metabolism . Academic press , London .h.k. pp. 34 -70 .
- Turner, T.B. and Alderidage, D. C. (1983) . Fungal metabolites Academic press , London , h.k. pp. 45-70 .
- Turcksess, M. W. and Wood, G. E. (1997). Immunochemical methods for mycotoxins in food. Food test. Anal., 3 (4): 24-27 .
- 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 .
- Van Egmond, H. P. (1989). Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerance and status of standard methods of sampling and analysis . Food Additives and Contaminations . Vol. 6. No. 2. 139-188 .
- Van Egmond, H. (1999) . Worldwide Regulations for Mycotoxins. Third Joint FAO / WHO / UNEP International Conference on Mycotoxins.
- Verma, R.J. (2004) . Aflatoxin cause DNA damage . Int. J. Hum. Genet. 4: 231-236 .

- Ware, G. W. and D. M. Whitacare (2004). In : The pesticide book . 6th Ed., meister media , world wide, will ongh by Ohio. Pp: 496 .
- Wardhaugh, K.G. (2005) . Inscticidal activity of synthetic pyrethroids , Organophosphates , insect growth regulators and other livestock parasiticides :An Australian perspective Environmental Toxico. and Chemistry . 24: 789- 796 .
- Wessels, S. ; Axelsson, L. ; Bech-Hansen , E. ; DeVuyst, L. ; Laulund, S. ; Lahteenmaki, L. and Lindgren, S. (2004) . The lactic acid bacteria , the food chain and their regulation . Trends in Food Sci. and Technology . 15(10): 492-505 .
- WHO, (1992) . Control technology for the formulation and packing of pesticides , World Health Organisution . Geneva .
- WHO, (2003) .World wide regulation for mycotoxins in food and feed in the international inquiry from 2002-2003 .
- Williams, J.H. ; Philips, T.D. ; Jolly, P.E. ; Stiles, J.K. ; Jolly, C.M. and Aggarwal, D. (2004) .Human afltoxicosis in developing countries and a review of toxicology , exposure , potential health consequences and interventions . Am. J. Clin. Nutr. 80:1106-1122 .
- Williams, P. A. ; Lambert, M.R. ; Brown, R. J. (1983). The role of the Oand K antigen is determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis, J. Gen. Microbial .129: 2181-2191 .
- Wood, G.E. (1992). Mycotoxin in foods and feeds in the United States . J. Anim. Sci. 70:3941- 3949 .
- Yabye, K. and Hamasaki, T. (1993). Sterochemistry during aflatoxin biosynthesis cyclase reaction recomization of versiconal acerate . Appl. Environ. Microbiol. 59(8): 2486-2492 .

- Yousef, M.I., El-Demerdash, F.M. Kamel, K. I. and Al –Salhen, K.S. (2003). Changes in some hematological and biochemical indices of rabbits induced by Isoflavones and cypermethrin. Toxicol. 189: 223-234.
- Yu, J. ; Cleveland, T. E. ; Nierman, W.C. and Benett, J.W. (2005) . *Aspergillus flavus* genomics : Gateway to human and animal health , food safety and crop resistance to diseases . Rev. Iberoam Mycology J. 22:194-202 .
- Yu , J. ; Erlich, K. C. ; Cary, J. W. ; Bhatnagar, D. ; Cleveland, T. E. ; Payne, G. A. ; Linz, J. E. ; Woloshuk, C. P. and Bennet, J. W. (2004). Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. Contamination of crop. Appl. Environ. Microbiol ., 70 : 1253- 1262 .
- Zinedine, A. ; Faid, M. and Benlamlih, M. (2005) . Invitro aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread . Int. J. Agr. Biol. 7:67-70 .
- ابراهيم، أسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري. (1998).السموم الفطرية. الطبعة الثانية. مركز اباء للأبحاث الزراعية.
- جاسم , ناجي سالم . (1999) . المقاومة الحيوية والكيمياوية للفطر *Fusarium graminearum* (schwab) المسبب لمرض لفحة الفيوزاريوم في الحنطة . رسالة ماجستير , كلية الزراعة , جامعة البصرة . 178 صفحة .
- الجبوري , سهاد محمد مدفون . (2012) . دراسة امكانية استخدام بعض المواد الطبيعية في التقليل من الاثار السمية للافلاتوكسينات B1 و B2 في النظم الحيوية لذكور الجرذ الابيض . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- الجبوري, محيميد مد الله . (1990) . علم البكتريا الطبية . مطابع التعليم العالي في الموصل . 351 صفحة .
- الجميلي ,سامي عبد الرضا .(1996). المقاومة المتكاملة ضد الاصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B1 في حاصل فستق الحقل .اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة – جامعة بغداد .ص 87.

- الجميلي ، سامي عبد الرضا علي وضياء سالم الوائلي. (2000). دراسة كفاءة سلالة البكتيريا *Pseudomonas fluorscens* pf-5 في مقاومة الفطريات *Fusarium graminearun* و *Rhizoctonia solani* وزيادة النمو في محصول الحنطة . مجلة البصرة للعلوم الزراعية .
- الجميلي ,سامي عبد الرضا ورائد علي حسين ابو شبع (2005) .تقييم كفاءة بعض العوامل الكيمياوية والحيوية في حماية حاصل الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *Aspergillus flavus* و*Aspergillus niger* .مجلة جامعة كربلاء , العدد الخاص بمؤتمر كلية العلوم 16-17-2005.
- الجميلي , سامي عبد الرضا علي و مرزه , ثامر خضير والخفاف , الاء عبد علي . (2007) . تقييم المبيدين الحيويين فلوراميل والباسلين في السيطرة على مرض تعفن وموت البادرات المتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum* لنبات الخيار في المشتل . مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد (5) العدد 4 : 396- 402 .
- الجميلي , سامي عبد الرضا علي . (2014) السموم الفطرية (Mycotoxins) . دار الكتب للطباعة والنشر – العراق , 423 صفحة .
- الجنابي ،بيداء عبود حسن. (2009) .دراسة التاثيرات السمية للفطر *Aspergillus flavus* في بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية والنسيجية لدى اناث الجرذ الابيض وامكانية السيطرة على الاضرار الناجمة عنها. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الكوفة.
- الحدراوي , سعاد وحيد كاظم . (2011) . توصيف الاحياء المجهرية الملوثة لبعض الحبوب المخزونة ودراسة اثارها السمية وامكانية السيطرة عليها . اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- حمودي , سنبل جاسم وعلي عبد الله الدوري (2001) . تأثير تلوث الأعلاف بسموم الافلاتوكسين B1 على وزن الجسم وأوزان بعض الأعضاء . مجلة العلوم الزراعية العراقية , المجلد (32) :86 صفحة .
- حميد ، سميرة كاظم . (2001). تقنية مستحدثة في انتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة *Pseudomonas fluorscens* CHAO . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- الخالدي ،بهيجة عبيس حمود. (2010) .التوصيف الوظيفي والجزيئي لبعض عزلات الفطر Sp Geotrichumوالكشف عن بعض تأثيراتها الوظيفية والنسيجية المرضية في ذكور الجرذ الأبيض . اطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة الكوفة .

- الخلف, سما صفاء عبد الامير . (2011) . دراسة التاثيرات السمية للافلاتوكسين B1 و B2 في بعض المعايير الفسلجية والكيموحيوية والنسيجية المرضية لذكور الجرذ الابيض وسبل الحد من تاثيراتها . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- الربيعي ، عبير فوزي مراد ،(2007). التأثيرات السمية للفطرين *Penicillium digitatum* و *Penicillium italicum* في بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية والنسيجية لذكور الجرذ الأبيض وأمكانية السيطرة عليهما في المخزن . اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم . جامعة بابل .
- الساعدي, ابتسام بشير كاظم . (2012) . توصيف عزلات الفطر *Aspergillus* spp. الحاملة لجين *afla*R الملوثة لبعض الاغذية في اسواق النجف الاشرف . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- السماك, مهدي مجيد . (1983) . النقنية المختبرية في الجراثيم المرضية لمعاهد المهن الصحية العالمية . شركة المطابع النوذجية المساهمة المحدودة , (تيبكو) . 645 صفحة .
- سهلب , عبد العظيم سمو ومنيب موسى الساكت وماضي توفيق الجعيفر ومنير ناصر غرايبة (1990) . علم السموم الحديث . دار المستقبل للنشر والإعلان – الجامعة الأردنية .330 صفحة .
- الشامي, فرح حسين . (2004) . التاثيرات المناعية للمبيد الحشري ديازينون في ذكور الفئران البيض . رسالة ماجستير , كلية العلوم ابن الهيثم . جامعة بغداد .
- شعبان, دعاء مثنى وكركز محمد ثلج . (2013) . تحديد فعالية النيسين المنتج من عزلة .L lactis في تثبيط بعض الاحياء المجهرية المرضية . قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة . جامعة تكريت . مجلة جامعة تكريت للعلوم الزراعية , المجلد (13) العدد 3 .
- شعبان, عواد ونزار, مصطفى الملاح . (1993) . المبيدات . دار الكتب للطباعة والنشر , الموصل . ص 81-320 .
- العادل, خالد محمد (2006) . مبيدات الافات مفاهيم اساسية ودورها في المجالين الزراعي والصحي . الطبعة الاولى , كلية الزراعة , جامعة الموصل . ص 55-103 .
- العادل ,خالد ومولود , كامل عبد . (1979) . المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات . دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل . ص 13-45 .

- العاشور , علي جابر جاسم .(2005) . إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- العاشور، علي جابر جاسم . (2009) . تقييم كفاءة بعض العزلات المحلية التابعة للجنس *Bacillus* في السيطرة على بعض الفطريات الممرضة لنباتي الحنطة والباميا . اطروحة دكتوراه . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- عبد الحميد, زيدان هندي .(2000) السمية البيئية و التفاعلات الحيوية للكيميائيات والمبيدات . الدار العربية للنشر والتوزيع . مصر . الطبعة الاولى . 802 صفحة
- عبود , بسعاد عبد زيد .(2005) . دراسة إمكانية تصنيع مستحضر حيوي من لقاح البكتريا . *B thuringensis* لمقاومة حشرة مَن الخوخ الأخضر .رسالة ماجستير .قسم علوم الحياة- كلية العلوم . جامعة الكوفة.
- العبيدي , اثير باسل عباس (2011) . تصنيع مستحضر حيوي من البكتريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في علائق الدواجن . اطروحة دكتوراه . قسم علوم الحياة – كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- العميدي ، رملة أحمد محمد حسن . (2009) . تقييم كفاءة بكتريا *Bacillus subtilis* في حماية بذور الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* تحت ظروف الخزن الطبيعي وفي التربة . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- كاظم , سعاد وحيد .(2002) . إنتاج سماد حيوي من لقاح سلالة البكتريا *Azospirillium Irakinse* . رسالة ماجستير .قسم علوم الحياة . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- محسن , يسرى محمد باقر. (2005) . دراسة التاثير التثبيطي لعزلات محلية من بكتريا *Lactococcus lactis* ضد فطر *Penicillium* spp. . مجلة العلوم الزراعية العراقية . 36 (6) : 85- 90 .
- محمد , عبد العظيم كاظم ومؤيد, احمد اليونس . (1991) . اساسيات فسيولوجيا النبات . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . جامعة بغداد . 461 صفحة .

- محمد , سبأ طاهر . (2009) . تاثير بكترياحامض اللاكتيك ورواشحها على طفيلي *ryptosporidium parvum* وطفيلي *Giardia lamblia* في الفئران . مجلة علوم المستنصرية . المجلد(20) العدد 1 .
- المسعودي, ذوالفقار عباس متعب فرج . (2013) . تاثير جرع مختلفة من مبيد Bifenthrin على بعض معايير الدم الفسلجية والهرمونيو والكيموحيوية والجنينية في اناث الجرذ الابيض اثناء الحمل . رسالة ماجستير . كلية التربية للعلوم الصرفة , جامعة كربلاء .
- الهاشمي , هدى عبد الرضا عبد الله . (2009) . التحري الاحيائي عن التأثير المطفر لبعض مبيدات الافات المستعملة في مكافحة افات الخضر . رسالة ماجستير . كلية التربية , جامعة كربلاء .
- الوائلي ، هديل وائل . (2002) . تأثير الزيت الطيار للقشور الصفراء لثمار الكريب فروت *Citrus paradisi* وأوراق حشيشة الليمون *Cymbopogon citratus* في نمو الفطر *Aspergillus flavus* وانتاجه للافلاتوكسين B1 . رسالة ماجستير . كلية التربية . جامعة بغداد .

Summary

This study aimed to evaluate the effectiveness of some species of bacterial isolated from dairy in the treatment of toxic aflatoxin B1 and the possibility of appointment one isolate them as us drug countary poison aflatoxin B_1 In Invivo as well as on the assessment of the efficiency of the two species of bacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* in degradation pesticide Bifenthrin and the possibility of products formula from this bacteria bioremediation of contaminated soil this pesticide .

Used Biochemical tests to determined the activity of these bacterial species Bioremediation of aflatoxin B_1 and pesticide Bifenthrin.

The study results showed the effectiveness of the bacteria *Lactococcus lactis* in reducing the toxicity of aflatoxin externally (Invitro) since disappeared shine spot poison aflatoxin B_1 treatment with bacteria from the plate Thin layer chromatography when exposed UV , reinforced this result vital tests that took place inside the body of animals albino Rat and the transaction of Aflatoxin pre- treatment bacterium *Lactococcus lactis* that they were all organs of the studied included the liver and kidneys, intestines and spleen completely intact while showed pathogenic changes clear in those animals treated with the organs **It** also proved of the of aflatoxin B_1 untreated bacteria.
formula manufactured from bacteria *L. lactis* and debilitating heat highly effective in reducing the toxicity of aflatoxin B_1 demonstrated by the survival of all of the numbers of platelets and the percentage of lymphocytes within normal limits in the blood of animals treated first by formula manufactured followed by treatment of the aflatoxin B_1 as it stood at 548.3×10^3 plate / ml and 59.9 %, respectively, while the numbers of platelets in the blood of animals treated of aflatoxin B_1 only 1045×10^3 plate / mL and the percentage for the numbers of lymphocytes 32.7 % . **Also** that the number of monocyts were within normal

limits in the blood of animals treated by formula followed poison aflatoxin B_1 , amounting to 0.04×10^3 cells / mm^3 , while bypass prepared in the blood of animals treated name of aflatoxin only natural boundaries much until it reached $1.36 \times {}^{3}10$ cells / mm^{3} on the other hand it was the preparation of vital important role in defense the tissues of animals treated by followed by treating them aflatoxin B_1 , as results showed histological examination of sections of textile for organs of the liver , kidneys, intestines and spleen safety of any pathological changes , in the time it appeared pathological changes severe in all those organs of the animals organs tissues treated by aflatoxin B_1 only was the emergence of necrosis and cells death of the tubules renal in kidneys either in the liver appeared to congestion and vascular dilation with multiplicity in the gaps necrotic, and intestines are other damaged as occurred lysis completely villi with cell necrosis (necrotic cellular) and did not escape the spleen from the effects aflatoxin B_1 as it appeared vascular congestion and cellular necrosis

Also of this study showed of the formula manufactured from bacteria *L. lactis* safety biomaterial did not have any negative effects on critical systems for Albion rat animals and the striking that this is of the Preparatory increased level of concentration of hemoglobin in the blood of animals treated them as it reached its quantity 14.6 g /100 ml , while were in the control treatment (not treated by the Preparatory or poison aflatoxin B_1) 12.2 g / 100 ml .

And demonstrated this study on the effectiveness of the bacteria *Pseudomonas fluorescens* in reducing the toxicity of the pesticide Bifenthrin and demonstrated by the lack of any decrease in hemoglobin levels and prepare the red blood cells in the blood of animals treated with pesticide chemical processor in advance , the bacterium *P. fluorescens* from their levels in the control treatment (animals not treated with pesticide) as of full treatment in the first 12.23 g / 100 ml and 7

× ^{6}10 balls / mm^{3} , respectively, while their levels in the control treatment 11.7 g / 100 ml and 6.4 × ^{6}10 balls / mm^{3} , respectively, while the effect of pesticide negatively in the amount of hemoglobin (10.93 g / 100 ml) and the preparation of red blood cells (9.4 × ^{6}10 balls / mm^{3}) . also maintained the numbers of platelets and the percentage of lymphocytes to normal levels in the blood of animals treated with pesticide chemical that bioremedy by bacteria as it reached the 557.5 × ^{3}10 plate / ml and 51.4 % and did not differ significantly from the control treatment while snowball the numbers of platelets in the blood of animals treated by Bifenthrin only to 772.5 × ^{3}10 plate / mL which is much higher than for natural boundaries as the preparation of lymphocytes decreased to 38.6% .

The results of the histological study are consistent with the results of the study physiological to confirm the effectiveness of the bacterium *P. fluorescens* in the treatment of the pesticide chemical studied as results showed histological examination the absence of any pathological changes in the tissues of the organs of the liver , kidney, intestines and spleen of animals treated with pesticide pretreated bacteria . While affected negatively , those organs of the animal insecticide treatment Bifenthrin that non bioremediation as it showed the results of a microscopic examination of the clips histological presence of pathological changes histologic in the kidney was the occurrence of congestion and vascular atrophy and the disappearance of the glomerulus and inflated wall in addition to the occurrence of cell necrosis of the glomerulus and renal tubule , either in liver appeared to congestion and vascular and hemorrhage) with cell necrosis , and in the intestines Event decomposition of the villi with cell necrosis , either changes in the spleen vascular and necrosis cell in addition to hemorrhage . were the results of the therapeutic efficacy of the bacterium *Bacillus subtilis* relatively less for the bacteria *P. fluorescens* the results of the test activity degrading pesticide Bifenthrin in terms of germination of

seeds of wheat to compliment the test results is vital using laboratory animals (male albino rat) as shown bacteria *P. fluorescens* highly effective in reducing the toxicity of the pesticide chemical and represent the ability of grains of wheat insecticide that bioremedy by these bacteria on germination by 90 %, while the rate was 0% in the treatment of chemical pesticide untreated bacteria , while the bacteria *Bacillus subtilis* was less effective than the bacteria *P. fluorescens*

And proved of the Preparatory vital manufacturer of bacteria *P. fluorescens* highly effective in the treatment of the pesticide chemical Bifenthrin in the soil as the rate of germination of grains of wheat treatment of the preparation is vital 79.1 % when grown in soil contaminated with pesticide and a concentration of 1 % after ten days of agriculture , while the percentage of germination of the same grain and planted in soil contaminated with pesticide and same concentration above and the treatment of the preparation for the vital bacteria *B. subtilis* 50.6% as severalty is vital preparation for the two species of bacteria susceptibility on storage for 6 months .

Ministry of Higher Education & Scientific Research

University of Kerbela

College of Education for pure sciences

Department of Biology

Bioremediation for Aflatoxin B_1 and bifenthrin pesticide by Using Some Species of Bacteria

A thesis Submitted

To the Council of the College of Education for Pure Sciences - Kerbela University as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Philosophy Dactora degree of science in Biology / Zoology- Ecotoxins

By

Huda Abdul-Rada Abdullah Al Hashemi

M. Sc. In Biology / zoology

Supervised by

Prof. Dr. Sami. A. AL-Joumaly **Assit. Prof. Dr. Jasim M. Salman**

1435 *A.H.* **2014 *A.D.***