المعالجة الأحيائية لسم الأوكراتوكسين A بأستخدام بعض البكتريا المعزولة من التمور العراقية

تاريخ الاستلام : 2014/11/18 تاريخ القبول :2015/1/22

.بسعا د عبد زيد
كليةالعلوم
E.mail Bsaid Abd.@gmail.com.

حيدر كامل جبار الكعبي
كلية التمريض
Haydar alkaabi1979@gmail.com.

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى تقييم فعالية بعض انواع البكتريا المعزولة من التمور العراقية في معالجة سم الأوكراتوكسينA وامكانية توضيف عزلة واحدة منها كعقار مضاد لسم الأوكراA داخل جسم الكائن الحي In vivo فأظهرت نتائج الدراسة فعالية بكتريا *Lactobacillus planturm* في اختزال سمية الأوكرا A خارجيا إذ اختفى تألق بقعة سم الأوكرا المعالج بالبكتريا أعلاه من طبقة TLC (Thin layer Chromatography) عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية وعززت هذه النتيجة بالاختبارات الحيوية التي أجريت داخل جسم حيوانات الجرذ الأبيض والمعاملة بسم الأوكرا A المعامل مسبقا ببكتريا *L.plantrum* اذ كانت جميع المعايير الفسيولوجية والنسجية سليمة تماما في حين ظهرت تغيرات مرضية واضحة في تلك المعايير عند معاملة البكتريا بسم الأوكرا A فقط .

وقد أثبتت البكتريا المقتولة حراريا فعالية عالية في اختزال سمية الاوكرا A تجلى ذلك من خلال بقاء كل من كمية الهيموغلوبين والكرياتنين واليوريا ضمن الحدود الطبيعية في دم الحيوانات المعاملة اولا بالبكتريا المقتولة حراريا تبعها المعاملة بسم الأوكرا A أذ بلغت قيم المعايير اعلاه (14 غم /100مل)،(23غم /ديسيلتر)،(65 غم /ديسيلتر) على التوالي في حين كان معدل المعايير اعلاه في دم الحيوانات المعاملة بسم الأوكرا A فقط (9 غم /100مل) ، (43 غم /ديسيلتر) و(320 غم /ديسيلتر) على التوالي ، من جانب آخر كان للبكتريا المقتولة حراريا دور في حماية نسيج الكلى للحيوانات المعاملة بها متبوعا بمعاملة سم الأوكرا A اذ اظهرت نتائج الفحص النسيجي للكلى سلامتها من أي تغيرات مرضية في الوقت الذي ظهرت فيه تغيرات مرضية شديدة في نسيج كلى الحيوانات المعاملة بسم الأوكرا A تمثلت بتضخم جدار الكبيبة وضمور الكبيبات والنزف وتنخر وموت خلايا النبيبات الكلوية .

الكلمات المفتاحية : سموم الاوكراتوكسين A ،بكتريا *Lactobacillus plantrum*،الفشل الكلوي

Microbiology Classification QR_1 (74.5)

المقدمة Introduction

تعد السموم الفطرية احد اهم مجاميع السموم والتي تنتج بواسطة كائنات حية دقيقة متباينة التغذية (Heterophilic Microorganisms)هي الفطريات (Fungi) والتي تتواجد في الطبيعة وتحتاج في نموها وتكاثرها لعوامل عدة منها الحرارة والرطوبة ومواد غذائية كمصدر لطاقة 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 (5).

تكمن المشكلة الحقيقية للسموم الفطرية في كونها ذات أوزان جزيئية واطئة لاتستحث الجهاز المناعي لمعادلة سميتها فضلا عن مقاومتها لدرجات الحرارة العالية وبالتالي فانها لاتتحطم بدرجة الحرارة المستخدمة في طهي الطعام (6). وتتسبب السموم الفطرية في احداث الكثير من العلل والامراض والتي يطلق عليها مصطلح (Mycotoxicosis) كالسرطانات والفشل الكلوي واحداث الطفرات الوراثية مع أضعاف فعالية الجهاز المناعي والجهاز التناسلي وغيرها من الأمراض ولاتوجد في الوقت الحاضر منطقة خالية من التلوث بالسموم الفطرية وتأثيراتها السلبية على صحة الأنسان (7).

يعد سم الأوكرا A أحد السموم الفطرية الذي تم اكتشافه عام 1965 من قبل العالم Scott وترجع تسميته الى اول فطر عزل منه وهو الفطر *Aspergillus ochraceus* الذي ينمو على المحاصيل الزيتية ومنها الفواكه والمكسرات ويؤثر اساسا على الكلى ويكون التسمم به احد اسباب الفشل الكلوي بنوعيه الحاد والمزمن كما يؤدي الى انكماش الكلى واورام في القناة البولية ،وذكر ان لهذا السم علاقة بمرض الأعتلال الكلوي لمنطقة البلقان Balkan Endemic Nephropathy (BEN) والذي تم ملاحضته في المجتمعات الريفية في بلغاريا ورومانيا ويوغسلافيا كما انه يؤثر على تمثيل الكاربوهيدرات في الجسم الى جانب تاثيره على اغشية المايتوكوندريا مما يؤدي الى تثبيطها ().

أستخدمت وسائل عديدة في تحطيم السموم الفطرية كالوسائل الكيميائية والفيزيائية ولكنها لم تكن فعالة في القدر المطلوب فضلا عن كلفتها العالية مما حدا بالكثير من الباحثين في الكثير من مناطق العالم للاتجاه نحو دراسة أمكانية توضيف بعض الأحياء الدقيقة في تحطيم السموم الفطرية كأستراتيجية لعلاج واختزال السموم الفطرية كون هذه الاحياء الدقيقة كفؤة وغير مؤثرة على البيئة والأنسان وبنفس الوقت قادرة على أختزال وازالةالملوثات المختلفة ومنها السموم الفطرية. من الاحياء الدقيقةالمستخدمة في تحطيم سموم الأفلاتوكسينات هي بكتريا *Lactobacillus plantrum*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus lichenformis*، *seudomonas flouroscens*، *Luconistoc mesentroides* و *L actobacillus lactis* (9) .

على ضوء ماتقدم تم اجراء هذه الدراسة وفقا لبعض الموجبات منها انفتاح السوق العراقية على الأسواق العالمية مما ادى الى دخول كميات كبيرة من السلع الغذائية وهناك دراسات محلية أكدت على ان الكثير من هذه السلع كانت ملوثة بالسموم الفطرية وخاصة الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسينات ومنها دراسات(1 و2).فضلا عن عدم وجود عقار لمعالجة حالات التسمم بهذه السموم ، فجاءت هذه الدراسة لغرض أيجاد وسيلة بديلة عن العقارات والتحطيم الفيزيائي والكيميائي للسموم الذي لم يعد ذات جدوى للحد من مخاطر السموم الفطرية أذ تتضمن هذه الدراسة تقييم الفعالية التحطيمية لبكتريا *Lactobacillus plantrum* المعزولة من التمر خارج جسم الكائن الحي وداخله وامكانية تصنيع تحضيرة Formula حيوية في اختزال سمية الأوكرا A يمكن استعمالها مستقبلا بعد اجراء دراسات تكميلية كعقار لمعالجة التسمم بسم الاوكرا A ولتحقيق هذا الهدف تم اتباع المحاور التالية :

1- عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus plantrum* من التمر المحلي .
2- أختبار الفعالية التحطيمية للبكتريا اعلاه لسم الاوكرا A خارج جسم الكائن الحي واختبا رالأكفأ منها.
3- اختبار فعالية العزلة الأكفا على اختزال سمية الآوكرا A داخل جسم الكائن الحي .
4- تصنيع تحضيرة من العزلة الأكفأ واختبار فعاليتها داخل جسم الكائن الحي.

طرائق العمل

أ-جمع العينات

تم جمع (3) كيلو من التمر المحلي من الأسواق المحلية لمدينة الديوانية لغرض عزل البكتريا المرافقة للتمر، تم مزج العينات ثم أخذت عينة عشوائية بمقدار نصف كيلو غرام من المزيج النهائي وقطعت ثمار التمر الى قطع صغيرة باستخدام سكين معقم بعدها أخذت هذه القطع وزرعت على وسط Brian –Heart Agar المضاف اليه مضاد Amphotericin B لمنع نمو الفطريات بواقع (6) قطع من التمرلكل طبق .حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة ،بعدها تم تشخيص البكتريا بالأعتماد على الصفات التشخيصية التي ذكرها (10) وكذلك تم تشخيصها بأستخدام نظام الـ Viteic 20 .

ب- سم الأوكرا A القياسي

تم الحصول على سم الأوكرا A القياسي بشكل متبلور في عبوة زجاجية من شركة Hi-media بوزن (3) ملغم ، أذيب في (10) مل من مادة (Dimethyle Sulfoxide (DMSO ليصبح التركيز 300 وحفضت مايكروغرام / مل واعتبر كمحلول خزين اساس (Stock Solution) ووضع في قنينة زجاجية معقمة ،غلقت باحكام وغلفت بورق الألمنيوم لبقائها بعيدا عن الضوء بدرجة حرارة -18 لحين الأستعمال.

ج- الحيوانات المختبرية

استعملت ذكور الجرذ الابيض المختبرية (Albino Rats) من النوع Rattus rattus عمرها 8-10اسابيع تراوحت اوزانها بين 200 – 210 غم , تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية التربية / جامعة القادسية . وضعت في أقفاص بلاستيكية بهيئة مجاميع وتم تهيئة الظروف الملائمة من درجة حرارة 23 -28 م واضاءة مناسبة وغذاء صحي .

د- أختبارقدرة العزلة الأكفأ في تحطيم سم الأوكرا A خارجيا باستعمال طبقة (TLC) Thin Layer Chromotography

نشطت العزلات البكتيرية المعزولة خلال الدراسة على الوسط الغذائي نقيع القلب والدماغ السائل(Brain Heart Infusion Broth (BHI المحضر حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi-media أولا ثم حضر نفس الوسط في انابيب اختبار معقمة وبواقع 2 مل من الوسط لقحت لأنابيب بمستعمرات من كل عزلة بكتيرية كلا على حدة وأضيف لكل أنبوب 100 مايكروليتر من سم الأوكراتوكسين A القياسي الذي تم تحضيره في الفقرة ب ، ثم حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 72 ساعة لتحديد أي العزلات البكتيرية أكثر كفاءة في تحطيم سم الاوكرا A ، بعد أنتهاء فترة الحضن تم ترحيل العينات المحضونة على صفائح TLC ،أذ أخذ 0.1 مل من كل عينة ووضعت بشكل بقع مع بقعة سم الأوكرا A فقط (معاملة سيطرة) ووضع على بعد 1.5 سم من الحافة السفلية للصفيحة بعدها وضعت في حوض الفصل الحاوي على طور الفصل المتحرك المكون من (ميثانول :ماء مقطر) بنسبة (90 :10) وتركت لحين وصول الطور المتحرك الى مسافة 1.5 سم من الحافة العلوية للصفيحة ،بعدها اخرجت الصفيحة وتركت لتجف ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية وبطول موجي (340) نانوميتر (11). سجلت النتائج وتم أختبار العزلة الأكفأ بالأعتماد على درجة التالق اللوني للمادة السامة بالمقارنة مع معاملة السيطرة .(10).

بعد غربلة العزلات البكتيرية تم أختيار العزلة الأكفأ منها أستنادا الى القدرة على تحطيم سم الأوكرا A ، حفضت هذه العزلة في وسط الحفظ المكون من 90% من وسط نقيع القلب والدماغ السائل و10 % من الكليسرول ،حفضت في الثلاجة بدرجة حرارة (5-1) مْ لغرض استخدامها في التجارب اللاحقة (3)

هـ- أختبار قابلية بكتريا *Lactobacillus plantrum* في تحطيم سم الأوكرا A داخليا وبشكل وقائي

أولا -تهيئة الحيوانات

تم تهيئة (16) حيوان من ذكور الجرذ الأبيض بعمر (8-10) اسبوع وبوزن (200-210) غم وتم تقسيمها الى اربع مجاميع ثانوية وعوملت مايأتي :

أ-معاملة سم الأوكرا A + البكتريا : تم تجريع (4) حيوانات ب 1 مل /كغم وزن حيوان بعالق البكتريا

أعلاه وذلك في اليوم الأول من التجربة وفي اليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات بسم الأوكرا A بجرعة مقدارها 2.5 مل وبتركيز 75 مايكروغرام / كغم وزن حيوان .

ب-معاملة البكتريا فقط : جرعت (4) حيوانات بلقاح البكتريا (1 * 10 ^{8} خلية /مل) وبمقدار 1 مل/ كغم وزن حيوان

ج-معاملة سم الأوكرا A فقط : جرعت (4) حيوانات بسم الأوكرا A الذائب في مادة DMSO وبجرعة مقدارها 2.5 مل/ كغم وزن حيوان وبتركيز 75 مايكروغرام / كغم وزن حيوان

د- معاملة السيطرة : تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO بمقدار 1 مل / كغم وزن حيوان .

كررت عملية التجريع اربع مرات وعلى مدار ثمانية ايام مع متابعة الأعراض التي يمكن ان تظهر على الحيوانات المعاملة ،تركت لمدة يومين وبعدها تم تخدير الحيوانات بمادة الكلوروفورم وسحبت عينات الدم من الحيوانات بطريقة طعنة القلب ووضع الدم في انابيب اختبار حاوية على مادة (EDTA) لأجراء فحوصات الدم الفسيولوجية ثم شرحت الحيوانات عن طريق فتح التجويف البطني واخذت الكلية (Kidney) وحفضت في الفورمالين بتركيز 10 % لدراسة التغيرات النسجية فيها (12).

ثانيا -المعايير المدروسة

أ- المعايير الفسلجية للدم

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

1-حساب كمية الهيموغلوبين . 2- حساب مستوى اليوريا . 3-حساب مستوى الكرياتنين .

ب - الدراسة النسيجية

حضرت المقاطع النسيجية في مستشفى الصدر العام – محافظة النجف الاشرف واتبعت طريقة (13) في تحضير المقاطع .

ج - اختبار فعالية بكتريا *Lactobacillus plantrum* المقتولة حراريا في تحطيم سم الأوكرا A داخل جسم الكائن الحي .

أولا -تهيئة الحيوانات

تم تهيئة (16) حيوان من ذكور الجرذ الأبيض بعمر (8-10) أسبوع وبوزن (200-210) غم وتم تقسيمها إلى أربع مجاميع ثانوية وعوملت كمايأتي :

أ-معاملة سم الأوكرا A + البكتريا المقتولة حراريا : تم تجريع (4) حيوانات ب 1 مل /كغم وزن حيوان بعالق البكتريا المقتولة حراريا في اليوم الأول من التجربة وفي اليوم الثاني جرعت نفس الحيوانات بسم الأوكرا A بجرعة مقدارها 2.5 مل وبتركيز 75 مايكروغرام / كغم وزن حيوان .

ب-معاملة البكتريا المقتولة فقط : جرعت (4) حيوانات بعالق البكتريا المقتولة وبمقدار 1 مل/ كغم وزن حيوان

ج-معاملة سم الأوكرا A فقط : جرعت (4) حيوانات بسم الأوكرا A الذائب في مادة DMSO وبجرعة مقدارها 2.5 مل/ كغم وزن حيوان وبتركيز 75 مايكروغرام / كغم وزن حيوان

د- معاملة السيطرة : تم معاملة الحيوانات بمادة DMSO بمقدار 1 مل / كغم وزن حيوان .

ثانيا :المعايير المدروسة

نفذت نفس الخطوات الوارد ذكرها في الفقرة د فيما يخص المعايير الفسلجية والنسيجية .

النتائج والمناقشة

1- العزل والتشخيص

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن عينات التمر المدروسة كانت حاوية على (13) عزلة بكتيرية توزعت على أربعة أجناس هي *Lactobacillus plantrum* بواقع 7 عزلات (53.84%) و*Streptococcus spp* بواقع 4 عزلات (30.76 %) و *Micrococcus spp* بواقع 2 عزلة (15.38 %).جدول (1).

جدول (1) البكتريا المعزولة من التمور العراقية خلال فترة الدراسة

البكتريا المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية
Lactobacillus plantrum	7	53.84
Streptococcus spp	4	30.76
Micrococcus spp	2	15.38
المجموع	13	

امتازت مستعمرات بكتريا *Lactobacillus plantrum* على وسط MRS الصلب بكونها دائرية الشكل صغيرة الحجم ناعمة ولماعة وكان لونها يتراوح بين الأبيض إلى الكريمي في حين كانت مستعمرات الجنس *Streptococcus* بيضاء صغيرة ومسطحة ذات لون ابيض وامتازت مستعمرات بكتريا *Micrococcus* بكونها أكبر حجما من سابقتها وذات لون كريمي لامعة، محدبة ، اما فيما يخص الفحص المجهري لخلايا العزلات البكتيرية العائدة للجنس *Lactobacillus plantrum* والمصبغة بصبغة كرام فاظهر ان الخلايا كروية الشكل مرتبة بشكل أزواج وبعضها تظهر ثلاثية موجبة لصبغة كرام .اما جنس *Streptococcus* spp فكانت كروية الشكل وبعضها بيضوي تظهر بشكل سلاسل طويلة وقصيرة موجبة لصبغة كرام ،وفيما يخص الجنس *Micrococcus* spp فظهرت خلاياه دائرية الشكل موجبة لصبغة كرام وهذه مطابقة للصفات التي أوردها (10) .

2 –أختبار قدرة العزلة الأكفأ في تحطيم سم الأوكرا A خارجيا بأستعمال تقنية TLC

اثبتت نتائج هذه التجربة كفاءة بكتريا *Lactobacillus plantrum* في تحطيم سم الأوكرا A على طبقة TLC وذلك من خلال الأعتماد على درجة التالق اللوني للمادة السامة حيث بينت النتائج انخفاض نسبة التالق

اللوني للمادة السامة المعاملة ببكتريا *Lactobacillus plantrum* وتفاوتت العزلات السبعة العائدة لنفس الجنس والنوع في تحطيمها لسم الأوكرا ولكن أبدت العزلة رقم 5 (Lp5) قدرتها العالية في تحطيم السم إذ انخفضت درجة التألق اللوني إلى الحد الذي لايمكن مشاهدته عند استخدام الأشعة فوق البنفسجية مقارنة مع السم القياسي والسم المعامل ببقية العزلات البكتيرية العائدة لنفس النوع في حين أبدت عزلات الجنس *Streptococcus* spp كفاءة قليلة جدا في تحطيم السم ولكن لم تظهر عزلات بكتريا *Micrococcus* spp أي فعالية في تحطيم السم المدروس وعلى هذا الأساس تم اختيار العزلة الأكفأ في تحطيم السم وهي Lp5 .

جاءت هذه النتيجة مقاربة في مفهومها لما توصل إليه (14) الذي اشار الى قابلية كل من بكتريا *Lactococcus lactis* و *Lactobacillus plantrum* في اختزال وأزالة سمية سم الأفلا B1 في الأوساط السائلة بنسبة 20%-46 % للبكتريا اعلاه على التوالي ،كذلك مقاربة لماتوصل اليه (15) من أمتلاك سلالات مختلفة من بكتريا Lactic acid الفعالية في أختزال سمية سموم الأوكرا A والباتولين بأستخدام تقنية HPLC ، اما (3) أشارت الى قابلية بكتريا *Lactococcus lactis* على تحطيم سم الأفلاتوكسين في جسم الكائن الحي .

3- تقييم فعالية بكتريا *Lactobacillus plantrum* في تحطيم سم الأوكرا A داخل جسم الكائن الحي

أ- الفحوصات الفسيولوجية

1-كمية الهيموغلوبين

تشير النتائج الموضحة في الجدول (2) الى وجود تأثير معنوي $P<0.05$ لسم الأوكرا A على معيار كمية الهيموغلوبين بالنسبة للحيوانات المعاملة به فقط أذ بلغت الكمية 9.22 غم / 100 مل مقارنةبمعاملة السيطرة والبالغة 12.1 غم /100 مل اما كمية الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بالبكتريا فقط فقد ارتفعت الى 14.1 غم /100 مل كذلك ارتفعت كمية الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بالبكتريا مع سم الأوكراتوكسين A الى 13.6 غم /100 مل مقارنة مع معاملة السم فقط .

قد يعود سبب أنخفاض كمية الهيموغلوبين في الحيوانات التي جرعت سم الأوكرا A الى أن السموم الفطرية تعمل كمثبطات تنافسية للأنزيمات المسؤولة عن التخليق الحيوي لكريات الدم الحمر (16) أما سبب ارتفاع كمية الهيموغلوبين في معاملة بكتريا *L. plantrum* فقد يعود الى قدرة البكتريا على تحطيم سم الأوكرا A وربما أستغلت

انواع التحطيم كمصدر غذائي من قبل الحيوان وبالتالي زادت الفعاليات الحيوية الخاصة بتصنيع كريات الدم الحمر ،علما ان سم الوكرا A غني بعنصر الكاربون وعند تحطيمه يستغل من قبل الحيوانات كمصدر للكاربون في العمليات الحيوية (17).

2- مستوى الكرياتنين واليوريا

ادت معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A فقط الى حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في كمية الكرياتنين واليوريا أذ بلغت كمية الكرياتنين 45 غم /ديسيلتر مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغ فيها 18 غم /ديسيلتر بينما بلغت كميته 24.2 غم /ديسيلتر عند معاملة الحيوانات بسم الأوكرا والبكتريا معا ،في حين ادت معاملة الحيوانات ببكتريا *L.plantrum* الى خفض مستوى الكرياتنين الى 16.4 غم /ديسيلتر مقارنة مع المعاملة بسم الأوكرا فقط . اما اليوريا فقد ارتفعت الى 300 غم /ديسيلتر عند معاملة الحيوانات بسم الاوكرا A مقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغ فيها المعدل 22.5 غم /ديسيلتر اما عند معاملة الحيوانات بالسم والبكتريا معا فانخفض مستوى اليوريا الى 75 غم /ديسيلتر ويزداد هذا الانخفاض حتى وصل الى مستواه الطبيعي عند معاملة الحيوانات بالبكتريا فقط اذ بلغ مستوى اليوريا 21 غم /ديسيلتر في هذه المعاملة مقارنة مع معاملة السم فقط .

ان قياس تركيزبعض المركبات النتروجينية في الدم كاليوريا والكرياتنين يعد مؤشرا على كفاءة الكلية في اداء وظائفها المتمثلة بازالة هذه االمركبات من الدم عن طريق الترشيح الكبيبي وطرحها مع الأدرار (18) وقد يعود سبب زيادة هذين المعيارين عند معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A الى حصول قصور في وظيفة الكلية بسبب التلف الحاصل فيها ،أذ اشارت بعض الدراسات الى ان سم الأوكرا يعمل على تحلل الخلايا الطلائية المكعبة المبطنة للنبيبات الدانية في الكلية بسبب الجذور الحرة المتولدة بفعل السم والتي تسبب اكسدة للدهون غير المشبعة الموجودة في أغشية الخلايا الكلوية (19).

وقد يعود سبب بقاء مستويات الكرياتنين واليوريا ضمن الحدود الطبيعية عند معاملة الحيوانات ببكتريا *L.plantrum* الى قدرة هذه البكتريا على تحطيم سم الأوكرا A وتمنع فعله التأكسدي في تخليق الجذور الحرة وبالتالي حماية الكلية من فعل الجذور الحرة والمحافظة على أداء وظائفها بالصورة الصحيحة .

جدول (2) **تأثير بكتريا *L. plantrun* في الحد من تأثيرات سم الأوكرا A في المعايير الفسيولوجية لذكور الجرذ الأبيض .**

المعاملة	المعايير المدروسة

	الهيموغلوبين غم /100 مل	الكرياتنين غم /ديسيلتر	اليوريا غم /ديسيلتر
سم الأوكرا A (75)مايكروغرام/كغم	9.22	45	300
سم الأوكرا (75)مايكروغرام/كغم +بكتريا L.plantrum (2.5 مل /كغم)	13.6	24.2	75
بكتريا L.plantrum ((2.5 مل /كغم)	14.1	16.4	21
مادة DMSO	12.1	18.1	22.5

ب- المعايير النسجية

ـ سلخ ستخليص نسجيلي مسلطع ـ ماخوذة من كلى الجـرذان التـي تـم معاملها بـ75 مـايكروغرام /كغـم مـن وزن الحيوان بسم الاوكرا A حدوث تأثيرات نسـيجية مختلفة فيلكليـة تمثلـت بحصـول ضـمور (atrophy)(التطـور غيـر الطبيعـي للكبيـة (Abnormal development) فـي الكبيبـات الكلوية مع تضخم في جـدارها ونـزف دمـوي بالأضافة الى ظهورحالة التحبب في نسيج الكلى Granulation نتيجـة لتجمـع مفـرط فـي الخلايـا الألتهابية وبروز النوية بشكل واضح (صورة، C). وأختفت أغلب برات عنـد تجريـع الحيوانات ب 75 مايكروغرام /كغـم مـن سـم الاوكراA ومن ثم ب 2.5 مل من عالق بكتريـا *L.plantrum* أذ لم يظهر في الكلية أي تأثيرات مرضية تذكر(صورة D،) كما لـم تظهـر أي تأثيرات تذكر عند تجريع الحيوانـات بالبكتريـا اعلاه فقط اومادة DMSO (صورة A و B).

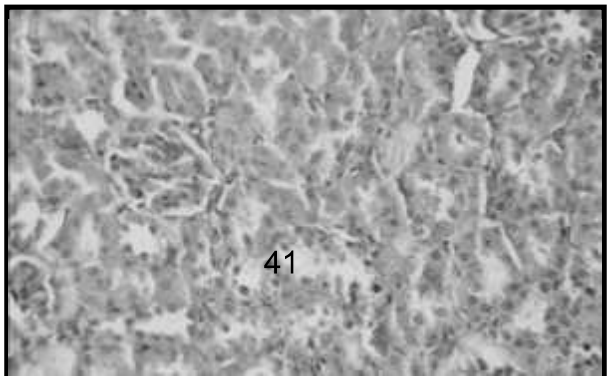
تتفق نتائج هذه الدراسة مع ماذكره (20) بأن سم أوكراتوكسين A يعد بحد ذاته من السموم المؤثرة على الكلية ومن أهم التغيرات التي يحـدثها هـي حصول تاه سفسوالأيلب سطراتيبة الق وة بالأبليب ذة في لب الكلية وحصول ضمور للكبيبات الكلوية بالأضافة الى النزف الدموي . كذلك أشار (21) الى حدوث تغيـرات مظهريـة لمـزارع الخلايا الطلائية لكلية القرود الافريقية ، وأنخفاضا في أعداد الخلايا وفي معدل أنقساماتها الخيطية مع زيادة في النسبة المئوية للخلايا غيـر الطبيعيـة والمتسببة من جراء أوكراتوكسين A .

وقد يعود سبب هذة التاثيرات إلى ان سم الأوكرا أدى إلى حصول زيادة في عملية تزنخ الدهون ، إذ تـؤدي المركبـات الثانويـة الناتجـة مـن تحـول سـم الأوكرا داخل جسم الكائن الحي إلى رفع مستوى بيروكسيد الدهن في الخلايا وأن زيـادة عمليـة تزنـخ الـدهون المتواجـدة فـي الأغشـية الخلويـة وبالتـالي حصـول التحلـل الخلـوي (Cell lysis) (22) إذ يـحصـل الـتحطم التأكسـدي فـي الخلايـا أو الأنسجة عندما يتجـاوز تركيـز الأنـواع الأوكسـجينية الفعالـة (OH، - O) القابليـة المضـادة للأكسـدة فـي الخلايـا وأن سبب ذلك قد يرجع إلى الأنخفاض الواضـح في مستويات المـواد المضـادة للأكسـدة اللانزيميـة (مثـل فيتــامين C و E) وكــذلك فــي مســتويات المــواد المضـادة للأكسدة الأنزيمية مثل (الكتاليز وبيروكسيد الكلوتاثـايون) والتـي قـد تحطمهـا السـموم أو تـرتبط معهـا مسببة هذا النقص فيهـا وبالتـالي التـأثير علـى

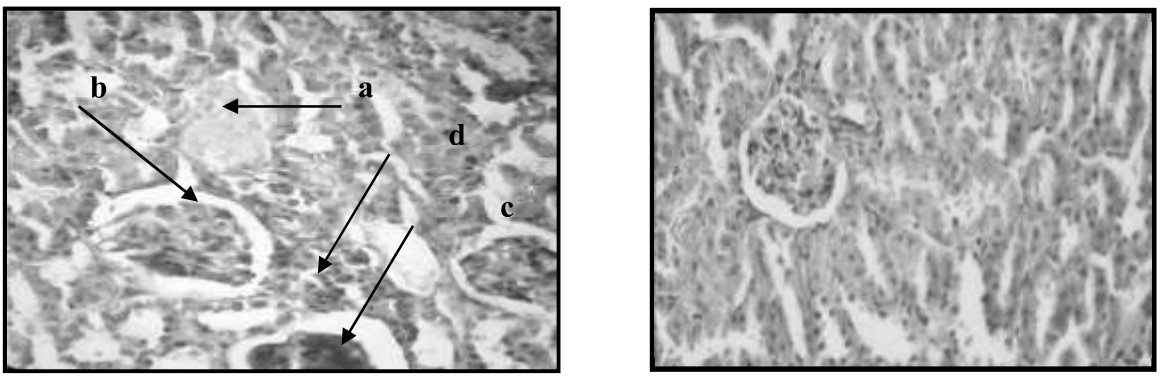
الخلية (3).او قد يهاجم سم الاكراتوكسين جسيمات البيروكسيسوم (peroxisome) مسببا تلف الانزيمات فيها والتي تعمل على تحطيم H_2O2 في الخلية مما يؤدي الى زيادة بيروكسيد الهيدروجين عن المستوى الطبيعي .

كما أن تفعيل المواد الناتجة من التحول الحيوي للسموم داخل الجسم يؤدي إلى أرتباطها بالجزيئات الكبيرة في الخلية وبالتالي أيذاؤها ، أو ترتبط مع الحامض النووي DNA والبرتينات مسببة عرقلة لكافة فعاليات الخلية وبالتالي موتها (23) أو قد يعود سبب هذة التأثيرات إلى قابلية سم الأوكرا على الأرتباط مع الجدار الخلوي للخلايا مسببة أنحلالهُ، أو أنها تمتلك تأثيراً على المستوى الوراثي مسببة تلف أو عدم تصنيع بروتينات الجدار وبالتالي عدم تكوينهِ ثم موت وأنحلال الخلايا ، فقد أشار (24). إلى أن بعض السموم الفطرية لها القابلية على الأرتباط بمواقع خاصة في الجدار الخلوي للكائن الحي ومواقع الأرتباط هذه هيβ-D-glucans التي تعد المكون الأساس للجدار الخلوي ، إذ تعمل السموم على تخريب هذة الطبقة وتجعل الجدار فاقداً لقوامهِ الأصلي مخترقة أياه إلى النواة مسببة تأثيرات على المستوى الجيني .

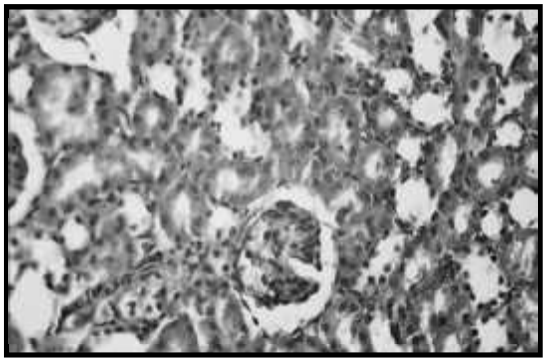
اظهرت البكتريا *L.plantrum* الاكفأ في تحطيم الأوكراتوكسين A فعالية عالية في حماية نسيج الكلى من التأثيرات السامة لهذا السم حيث ظهرت المقاطع النسيجية لكلى الحيوانات المعاملة بسم الأوكراتوكسين والمعالج احيائيا بالبكتريا اعلاه خالية من اي اعراض مرضية مشابهة في ذلك معاملة السيطرة , وهذا يعود ربما الى قدرة البكتريا على اختزال سمية المادة السامة بدرجة كبيرة وهذا ما يؤكد سلامة العضو المدروس من اضرار هذا السم . او يعود سبب أختفاء اغلب التأثيرات النسجية عند تجريع الحيوانات بسم الأوكراA والبكتريا اعلاه الى قابلية هذه البكتريا على تحطيمه لسم الاوكرا الى مركبات اقل سمية اولقابلية البكتريا على ربط السم في جدارها الخلوي مانعة بذلك تأثيراته السمية وهذا ماأشار اليه (4) 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



A



C B



D

صورة (2)مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض(A) معاملة السيطرة(B))معاملة الحيوانات ببكتريا ***L.plantrun*** بجرعة مقدارها 1 مل /كغم. (C) معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A بجرعة مقدارها 75 مايكروغرام /كغم (D) معاملة بسم الأوكرا A بجرعة مقدارها 75 مايكروغرتام+بكتريا***L.plantrum*** (قوة تكبير 40 X).

a=نزف دموي ، b = تضخم جدار الكبيبة، c =ضمورالكبيبة (التطور غير الطبيعي للكبيبة) ، d= تجمع بؤري لخلايا ألتهابية (تحبب نسيج الكلية Granulation) .

4 -تقييم فعالية بكتريا ***Lactobacillus plantrum*** المقتولة حراريا في تحطيم سم الأوكرا A داخل جسم الكائن الحي

أ- الفحوصات الفسيولوجية

1-كمية الهيموغلوبين

تشير النتائج الموضحة في الجدول (3) الى وجود تأثير معنوي $P<0.05$ لسم الأوكرا A على معيار كمية الهيموغلوبين بالنسبة للحيوانات المعاملة به فقط أذ بلغت الكمية .9 غم / 100 مل

مقارنةبمعاملة السيطرة والبالغة 12.4 غم /100 مل اما كمية الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بالبكتريا فقط فقد ارتفعت الى 14.5 غم /100 مل كذلك ارتفعت كمية الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بالبكتريا مع سم الأوكراتوكسين A الى 14 غم /100 مل مقارنة مع معاملة السم فقط . وتم تفسير النتائج في الفقرة (3) .

2- مستوى الكرياتنين واليوريا

عند معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A فقط ادت الى حصول زيادة معنوية ($P<0.05$) في كمية الكرياتنين واليوريا أذ بلغت كمية الكرياتنين 43 غم /ديسيلتر مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغ فيها 16.4 غم /ديسيلتر بينما بلغت كميته (23) غم /ديسيلتر عند معاملة الحيوانات بسم الأوكرا وبكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا ،في حين ادت معاملة الحيوانات ببكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا فقط الى خفض مستوى الكرياتنين الى 15 غم /ديسيلتر مقارنة مع المعاملة بسم الأوكرا فقط . اما اليوريا فقد ارتفعت الى 320 غم /ديسيلتر عند معاملة الحيوانات بسم الاوكرا A مقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغ فيها المعدل20.5 غم /ديسيلتر اما عند معاملة الحيوانات بالسم والبكتريا اعلاه المقتولة حراريا معا فانخفض مستوى اليوريا الى 65 غم /ديسيلتر ويزداد هذا الانخفاض حتى وصل الى مستواه الطبيعي عند معاملة الحيوانات بالبكتريا فقط اذ بلغ مستوى اليوريا 20 غم /ديسيلتر في هذه المعاملة مقارنة مع معاملة السم فقط .أيضا تم تفسير هذه النتائج في الفقرة (3).

جدول (3) **تأثير بكتريا*L. plantrum* المقتولة حراريا في الحد من تأثيرات سم الأوكرا A في المعايير الفسيولوجية لذكور الجرذ الأبيض .**

المعاملة	المعايير المدروسة		
	الهيموغلوبين غم /100 مل	الكرياتنين غم /ديسيلتر	اليوريا غم /ديسيلتر
سم الأوكرا A (75)مايكروغرام/كغم	9	43	320
سم الأوكرا (75)مايكروغرام/كغم +بكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا (2.5 مل /كغم)	14	23	65
بكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا فقط (2.5 مل /كغم)	14.5	15	20
مادة DMSO	14.2	15.4	20.5

2 –المعايير النسجية

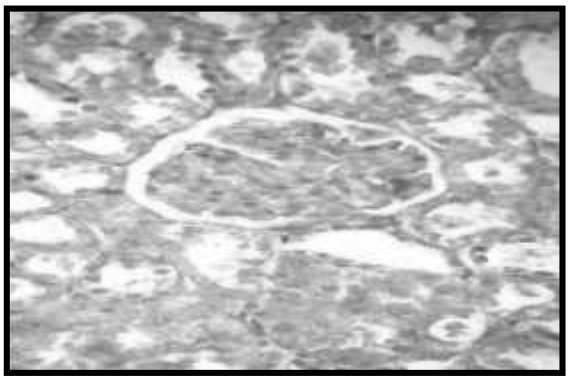
أوضحت نتائج فحص المقاطع النسجية للحيوانات المعاملة بسم الاوكرا A بتركيز 75 مايكرو غرام/ كغم وزن حيوان حصول تأثيرات نسيجية في الكلى مشابهة للتأثيرات التي ظهرت في التجارب السابقة والتي نفذت في هذه الدراسة أذ أظهرت النتائج حدوث التنخر وموت الخلايا للنبيبات الكلوية مع التوسع والاحتقان في الأوعية الدموية ,بالأضافة الى تضخم جدار الكبيبة وكما موضح في (صورة 3 – B1 و B2) .

اما عند معاملة الحيوانات ب 75 مايكروغرام /كغم وزن الجسم من سم الأوكرا A مع بكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا فقد ظهر التهاب بسيط في الكبيبات الكلوية (صورة 3 –C).

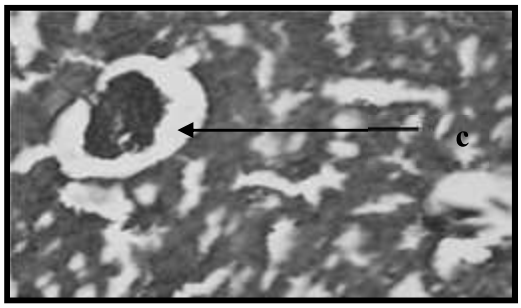
.

بينما لم تظهر اي تغيرات مرضية في الانسجة المعاملة بالبكتريا *L.Plantrum* المقتولة حراريا" فقط وكذلك الحال مع معاملة الحيوانات بمادة DMSO. (صورة 3 ،A و D) . وتم تفسير هذه النتائج في فقرات سابقة .

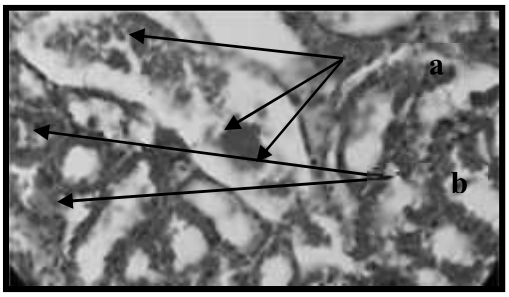
نستنتج من الدراسة الحالية بان بكتريا *L.plantrum* أبدت فعالية عالية سواء الحية أو المقتولة حراريا في الحد من التأثيرات السامة لسم الأوكرا A وبهذا من الممكن استخدام هذه البكتريا في برنامج السيطرة الحيوية على السموم الفطرية وتأثيراتها المرضية وينصح بالإكثار من تناول التمر لما له من فائدة لاحتواءه على البكتريا اعلاه التي ظهر من خلال نتائج الدراسة الحالية ان لها فائدة في الحد من تاثيرات سموم الأوكراA بالأضافة الى فوائد التمر المعروفة .



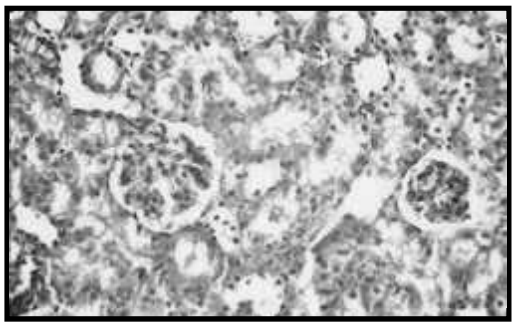
A



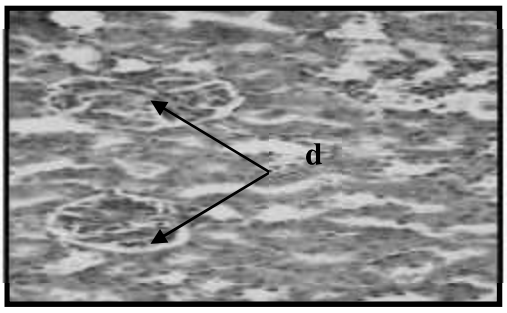
B2



B1



D



C

صورة (3)مقطع في نسيج الكلية لذكور الجرذ الابيض(A) معاملة السيطرة(B1 وB2)معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A بتركيز 75 مايكروغرام / كغم وزن حيوان. (C) معاملة الحيوانات بسم الأوكرا A بتركيز 75 مايكروغرام /كغم وبكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا (D) معاملة بكتريا *L.plantrum* المقتولة حراريا (قوة تكبير 40 X).

a= توسع واحتقان الأوعية الدموية ، b = تنخر وموت خلايا النبيبات الكلوية ، c = تضخم جدار الكبيبات ، d= التهاب الكبيبة .(قوة التكبير 40 X) .

المصادر

1- 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.

2- 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 .

3- الهاشمي , هدى عبد الرضا عبد الله . (2014) . المعالجة الحيائية لبعض السموم البيئية بأستخدام بعض انواع البكتريا.أطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة , جامعة كربلاء.

4- الجميلي , سامي عبد الرضا علي . (2014) السموم الفطرية(Mycotoxins)) . دار الكتب للطباعة والنشر – العراق , 423 صفحة .

5- Hussein, S. and Brasel, J.M. (2001). Toxicity , metabolism and impact of mycotoxin on hummans and animals . Toxicolgy . 15: 101-134

6.-Ciegter, 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

7-Verma, R.J. (2004) . Aflatoxin cause DNA damage . Int. J. Hum. Genet

- 4: 231-236

8- Ceovic ,H.B. Fuche .F.O. Verma.B.E. (1991) Balkan endemic nephoputhy and associated urinary tract tumors :are view on etiological causes and the potential role of mycotoxins food .;19:282-302.

9- 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

10-MacFadden, J. F. (2000) . Biochemical test for identification of medical bacteria . (3rd ed.) . Williams and Willkins Company . USA . pp. 912.

11-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 .

12-Brown, B.A. (1976). Principles and procedure . 2nd ed. Lea and Febiger . Philadelphia. NewYork . pp. 78.

13-Bancroft, J. D. ; Stevens, A. (1982). Theory and practice of histological technique .Churchill living Stone. New York . pp.117

14-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

15- 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 .

16- 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.

17-Bennett, J. W. and Christensen, S. B. (1983). New perspectives on aflatoxin biosynthesis. Adv. Appl. Microbiol., 29: 53-92.

18- Meyer ,D.J.& Harvey ,J.W.(1998) Verterinary laboratory medicine 2nd .Saunder ,W.B.Compny .Philadelphia ,p:241-247.

19- Pfohl-leszkowicz A.Petkova-Bocharova ,T. Cheronzem –Sky (2002) Urinary biomrkers and risk of mycotoxin ,lancet ;339:943-6.

20- Aislabie, J. and Lioyd-Jones, G. (1995). A review of bacterial degradation of Toxin, Australin J. of Soil . Research. 33. Pp. 925-942 .

21- lbert, J. F. ; Englbrecht, Y. ; Steyn, P. S. ; Holzapfel, W. H. and Vanzyl, W. H. (2006). Biological degradation of some mycotoxins by *Rhodococcus erythropolis* cultures. Int. J. Food Microbiol. 109: 121-126 .

22- Creppy, E.E. (2002). Update of survey , regulation and toxic effect of Mycotoxin in Europe doxicol. Lette. 127(1-3): 19-28 .

23-Meerdink, G.L. (2004) . Aflatoxins . In: Plumlee, K.H. (ed.) . Clinical veterinary toxicology . Little Rock , Arkansas, USA . pp.231-235 1-

24-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 .

-

Bioremediation for Ochratoxin A by Using Some Species of Bacteria isolated from Iraqi Dates

Basaid A.Zaid,Science college .Microbiolgy. ***E.mail.*** Bsaid Abd.@gmail.com

Haidar K.Jabar ,Nursing college , Clinical pathology. ***E.mail.*** Haydar alkaabi1979@gmail.com.

Receved :18/11/2014 **Accepted : 22/1/2015**

Abstract

This study aimed to evaluate the effectiveness of some species of bacterial isolated from Iraqi Dates in the treatment of toxic Ochratoxin A and the possibility of appointment one isolate them as us drug country poison Ochratoxin A In Invivo.

The study results showed the effectiveness of the bacteria *Lactococcus plantrum* in reducing the toxicity of Ochratoxin A externally (Invitro) since disappeared shine spot poison Ochratoxin A 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 Ochratoxin A pre- treatment bacterium *Lactococcus plantrum* that were in organ of the studied included the kidneys, completely intact while showed pathogenic changes clear in those animals treated with the organs of Ochratoxin A untreated bacteria.

It also proved of the formula manufacturedfrom bacteria *L. plantrum* and debilitating heat highly effective in reducing the toxicity of Ochratoxin A demonstrated by the survival of all of the level of hemoglobin ,Keriatenin and urea the levels of these parameters were (14g/ml,23 g/dl and 65g/dl)respectively /, while the level s of above parameters in animals treated of Ochratoxin A only(9g/ml,43g/dl and 320g/dl) respectively.

On the other hand it was the preparation of vital important role in defense the tissues of animals treated by followed by treating them Ochratoxin A, as results showed histological examination of sections of textile for kidneys safety of any pathological changes , in the time it appeared pathological changes severe in all those organs of the animals organs tissues treated by Ochratoxin A only was the emergence of hypertrophy of glomerulus, necrosis and cells death of the tubules renal in kidneys.

Keyword:Ochratoxin A,*Lactobacillus plantrum*,Renal faliure