تحطيم وتثبيط انتاج السم Aflatoxin B1 أحيائياً في حبوب الذرة الصفراء

عالية هيكل حسين ** عدي نجم اسماعيل*

الملخص

أجريت الدراسة لتقويم كفاءة البكتريا ***Lactobacillus rhamnosus* GG** والزيت الطيار لنبات ***Boswellia* spp.** في تثبيط نمو العزلة المنتجة لسم الافلاتوكسين للفطر ***Aspergillus flavus*** واختزال كمية السم الذي ينتجه و أزالته بعد انتاجه. اظهرت نتائج الدراسة ان اضافة البكتيريا بحجم لقاح 2 ، 3 ، 5 مل / لتر من مزرعة تحوي 16×10^{21} خلية/مل والزيت الطيار بالتراكيز 6، 7، 8 مل/لتر الى الوسط مستخلص الخميرة و السكروز السائل ثم تلقيح الوسط بالفطر ***A. flavus*** ادى الى اختزال معنوي في انتاج الفطر للسم الى 73.7 ، 73.3 ، 53.3 ميكروغرام / لتر للتراكيز الثلاثة المختبرة من البكتيريا ، 130 ، 120 ، 90 ميكروغرام/لتر للتراكيز الثلاثة للزيت الطيار على التوالي قياساً بـ 256.7 ميكروغرام / لتر في المقارنة وأدت اضافة البكتيريا بحجم لقاح 2، 3، 5 مل / لتر والزيت الطيار بالتركيزين 7، 8 مل/لتر الى الوسط السائل بعد 21 يوماً من تلقيحه بالفطر بدرجة 25 ± 2 م الى خفض معنوي في تركيز الافلاتوكسين الى 150 ، 140 ، 106.7 ميكروغرام / لتر للتراكيز الثلاثة للبكتيريا 160 ، 146.7ميكروغرام/لتر للتركيزين 7 ، 8 من الزيت الطيار على التوالي قياساً بـ 255.7 ميكروغرام / لتر في المقارنة.

سببت إضافة البكتيريا الى حبوب الذرة الصفراء بحجم لقاح 30، 40، 50مل/500 غم والزيت الطيار ***Boswellia* spp.** بتركيز 8 مل/كغم ثم تلويث الحبوب بالفطر ***A. flavus*** الى اختزال معنوي في إنتاج السم ، 70، 73، 74ميكروغرام/ كغم للتراكيز الثلاثة للبكتيريا على التوالي ، 147.0 ميكروغرام/ كغم في معاملة الزيت الطيار قياساً بـ 267 ميكروغرام/ كغم في المقارنة بعد 30 يوماً من المعاملة. وأدت معاملة حبوب الذرة الصفراء بالبكتيريا بحجم لقاح 30، 40، 50 مل/500 غم وبالزيت الطيار تركيز 8 مل/ كغم بعد 21 يوماً من التلويث بالفطر والتحضين بدرجة 25 ± 2 م الى خفض معنوي في تركيز السم 86، 47، 28 ميكروغرام/ كغم للتراكيز الثلاثة من البكتيريا على التوالي و 150 ميكروغرام/ كغم للتركيز 8 مل/ كغم للزيت الطيار قياساً بـ 267.0 ميكروغرام/ كغم في المقارنة بعد 30 يوماً من المعاملة.

المقدمة

تتعرض المواد الغذائية بضمنها محاصيل الحبوب للتلوث بالعديد من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية، ومن بين اكثر هذه الفطريات خطورة الانواع التابعة للفطر ***Aspergillus*** المنتج لسموم الافلاتوكسين (8، 21، 36، 41). و يعد محصول الذرة الصفراء من بين اكثر محاصيل الحبوب عرضة للتلوث بالفطر ***A. flavus*** المنتج للافلاتوكسين B1 ، وتبرز اهمية تلوث حبوب الذرة بالافلاتوكسينات من إنها تستهلك مباشرة من قبل الانسان وتمثل جزءاً اساساً في علائق الدواجن واعلاف الحيوانات (3، 4، 5).

اشارت العديد من الدراسات ان الافلاتوكسينات تمتلك القدرة على احداث الطفرات، ومسببة للسرطان، ومثبطة للجهاز المناعي ، وتسبب تشوهات جنينية، وتثبط العديد من الانظمة الأحيائية وتسبب تلفاً لأنسجة الكبد

جزء من رسالة ماجستير للباحث الاول.

* كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد، العراق.

** شركة ما بين النهرين – وزارة الزراعة – بغداد، العراق.

تاريخ تسلم البحث: ك 2/2015

تاريخ قبول البحث: ك2/2016

(6، 7، 15). يحدث التلوث بالفطر *A. flavus* في مراحل مختلفة من نمو المحصول واثناء الحصاد والنقل والتخزين ، واثناء نموه يفرز الافلاتوكسين B1 ناتجا" أيض ثانوي ويمثل مشكلة كبيرة كملوث للمحاصيل في الدول النامية (29). أشير الى ان تغذية افراخ فروج اللحم مدة ثلاثة اسابيع على علائق ملوثة بالافلاتوكسين بالتركيزين 3.5 و 7.5جزء بالمليون ادى الى خفض في معدل وزن الجسم ، وتضخم وزيادة حجم الاعضاء الداخلية، وانخفاض نسبة الكلايكوجين والبروتين الكلي (1). وسبب وجود الافلاتوكسين في العلائق الى انخفاض في وزن الطيور وانخفاض في إنتاج البيض (18). ان خلو حبوب الذرة الصفراء من التلوث بأحد السموم الفطرية يكاد يكون مستحيلاً مما حدا بالكثير من الدول المتقدمة لوضع استراتيجيات مختلفة للسيطرة على انتاج السموم الفطرية وتحطيمها في العلائق (14، 21، 24، 32). ومن بين الوسائل الكفؤة في هذا المجال استعمال الزيوت الطيارة التي اشارت العديد من الدراسات الى كفاءتها في تثبيط العديد من الفطريات ومنعها من انتاج السموم (16، 20،27).

ومن الوسائل الاخرى المتبعة في السيطرة على السموم الفطرية استعمال الاحياء الدقيقة ومن اكثر هذه الاحياء استعمالاً البكتيريا اللبنية *Lactobacillus* spp. والتي اظهرت كفاءة في هذا المجال، واشارت دراسات سابقة ان معاملة عينات من حبوب الذرة الصفراء ، ملوثة بالافلاتوكسين ، بالبكتيريا *L.plantarum* الى اختزال الافلاتوكسين بنسبة 77% (29). وأدت معاملة فستق الحقل الملوث بالافلاتوكسين B1 بالبكتيريا نفسها الى اختزال السم بنسبة 60%(17). ووجد ان اضافة البكتيريا *L. rhamnosus* الى الاوساط السائلة الحاوية على الافلاتوكسين B1 ادى الى اختزاله بنسبة 71% (22، 25، 33).

اجريت هذه الدراسة لتقييم كفاءة البكتيريا *L. rhamnosus* وزيت راتنج نبات *Boswellia* spp. في تثبيط نمو الفطر *A. flavus* ومنعه من انتاج الافلاتوكسين B1 وكفاءتها في تحطيمه في الاوساط السائلة و حبوب الذرة الصفراء.

المواد وطرائق البحث

الفطر *Aspergillus flavus*

تم الحصول على عزلة من الفطر *A. flavus* عالية الانتاج للافلاتوكسين B1 من العزل من عينات حبوب الذرة الصفراء في هذه الدراسة. جمعت عينات حبوب الذرة الصفراء بطريقة عشوائية من مناطق مختلفة من العراق (الموصل، الحويجة، بغداد، اليوسفية، ناحية الرشيد، أبي غريب، العزيزية، الحلة، الطارمية، الانبار، التاجي). عقمت حبوب الذرة سطحياً بغمرها في محلول القاصر1% كلور حر لفترة 3 دقائق ثم غسلت بالماء المقطر المعقم وجففت على ورق نشاف. زرعت الحبوب على الوسط الزراعي مستخلص البطاطا – الدكستروز الصلب (PDA) في اطباق بتري قطر 9سم (5 حبوب/طبق) وحضنت الاطباق بدرجة 25 + 2 ْم مدة 7 ايام . نقي الفطر *A. flavus* وشخص الفطر اعتماداً على الصفات المظهرية (38).

اختبار كفاءة الفطر *A. flavus* على انتاج الافلاتوكسين B1

اختبرت 32 عزلة من الفطر *A. Flavus* وذلك بتلقيح 100 مل من وسط الخميرة والسكروز السائل (YES) (20 غم مستخلص خميرة ، 200 غم سكروز في لتر ماء) المعقم بالمؤصدة بدرجة (121 ْم وضغط 1.5 كغم/سم^2) بقرص قطر 0.5 سم من مستعمرة للفطر عمر 7 ايام في دوارق زجاجية سعة 250 مل وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 ْم مدة 21 يوماً(19).

استخلاص السم افلاتوكسين B1 من وسط مستخلص الخميرة والسكروز السائل

استخلص السم من الوسط السائل بأخذ 10 مل من مستخلص الوسط الزرعي للفطر، واضيف اليه 30 مل كلوروفورم في قمع فصل، رج قمع الفصل لفترة 30 ثانية مع مراقبة طرد الغازات المتكونة . وضع قمع الفصل على حامل حديدي لحين انفصال طبقتي الماء والكلوروفورم . جمعت طبقة الكلوروفورم في حاوية زجاجية وجففت بدرجة حرارة 40 ْم ، وحفظت في المجمدة لحين إجراء الاختبارات اللاحقة عليها(28).

الكشف عن السم الـ AFB1 باستخدام صفائح كروماتوكرافي الطبقة الرقيقة TLC

استخدمت صفائح زجاجية جاهزة مطلية بهلام السليكا Sheets Silica gel 60F254 قياس 20 × 20 سم، وبسمك 0.25 ملم انتاج شركة Sigma chemicals ، نشطت صفائح السليكا في درجة حرارة 120 ْم لفترة 15 دقيقة قبل الاستخدام ، وضع 10 مايكروليتر من كل عينة بواسطة محقنة دقيقة Micro Syringe على صفيحة TLC على بعد 2 سم من حافة الصفيحة ، وبمسافة 1.5 سم بين عينة واخرى. أضيف في احد طرفي الصفيحة السم القياسي AFB1 المجهز من شركة Sigma chemicals 2 ملغم/لتر، تم الحصول عليه من الاستاذ الدكتور اياد عبدالواحد الهيتي – أستاذ (سموم فطرية) – كلية الزراعة/جامعة الانبار .

استخدم الطور المتحرك المكون من كلوروفورم – ميثانول (97 : 3) خلط جيداً ووضع في حاوية الترحيل الزجاجية، ووضعت الصفيحة في حاوية الترحيل وتركت لحين وصول محلول الترحيل (الطور المتحرك) مسافة 2 سم من الحافة العليا لصفيحة الـ TLC . رفعت الصفيحة وجففت بدرجة حرارة المختبر ومن ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية بطول موجي 366 نانو متر باستعمال جهاز UV viewing cabinet . قدرت نسبة الجريان Rate of Flow (RF) لكل من السم القياسي والعينات المختبرة على ضوء المعادلة التالية :

RF = المسافة من نقطة الاصل الى البقعة / المسافة من نقطة الاصل الى الجبهة (2).

حددت العزلات المنتجة للسم AFB1 بحسب شدة تألقها ، ومساحة البقعة عينيا، واختيرت العزلة الاكثر إنتاجاً للسم للاختبارات اللاحقة. نمت العزلة المنتجة للسم على حبوب الدخن.

تنمية العزلة الفطرية على حبوب الدخن

غسل 2 كغم من حبوب الدخن بالماء الجاري لفترة 15 دقيقة ووزعت في دوارق زجاجية سعة 1 لتر بمعدل 250 غم/دورق. اضيف لكل دورق 125 مل ماء مقطر وعقمت الدوارق بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 ْم وضغط 1.5 كغم/سم^2 لفترة 20 دقيقة. لقحت الحبوب في كل دورق بـ 5 أقراص قطر 0.5 سم من مستعمرة للفطر *A. flavus* بعمر 7 ايام وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2 ْم لمدة 21 يوماً.

تقويم تقييم كفاءة الزيت الطيار لنبات *Boswellia* spp. والبكتيريا *Lactebacillus rhamnosus* GG في تثبيط الفطر *A. flavus* وانتاجه للافلاتوكسين

استخلاص الزيت الطيار

طحن صمغ نبات *Boswellia* spp.(علك مستك) جيداً تم الحصول عليه من الاسواق المحلية ووضع 100 غم من المسحوق في دورق جهاز كلافنجر واضيف اليه 200 مل ماء مقطر وعرض للتسخين لحين اكتمال الاستخلاص (13).

تكثير البكتيريا *L. rhamnosus* GG

تم الحصول على عزلة من البكتيريا *L.rhamnosus* GG من معهد Ugent.Beem / بلجيكا. نشطت العزلة على الوسط السائل MRS(هو اختصار لأسماء علماء مكتشفو الوسط De Man Regosa and Sharp) (حضر باذابة 55 غم من الوسط في لتر ماء مقطر). لقح 100 مل من الوسط بالبكتيريا في دورق زجاجي سعة 500 مل وحضن بدرجة 37ْ م مدة 48 ساعة. اضيف 50 مل من المزرعة البكتيرية المنشطة الى 2 لتر من الوسط MRS وحضنت بنفس الدرجة السابقة نفسها والمدة نفسها وقدر عدد الخلايا الحية / مل بطريقة التخافيف وعدد المستعمرات على الوسط الصلب PDA.

معاملة وسط YES بالبكتريا والزيت الطيار

أضيف الى 100 مل من الوسط الزراعي YES في دوارق زجاجية سعة 250 مل ، الزيت الطيار بالتراكيز 6، 7، 8 مل/لتر، واضيفت البكتيريا بحجم لقاح 2 ، 3 ، 5 مل/دورق من مزرعة تحوي 16×10^{21} وحدة تكوين مستعمرة/مل ثم لقح الوسط بقرص قطر 0.5 من مزرعة للفطر *A. flavus* عمر 7 ايام وحضنت الدوارق بدرجة 25 + 2ْ م مدة 21 يوماً وقدر تركيز السم في الوسط بعد انتهاء التجربة (باستخدام عده اليزا القياسية).

تقويم كفاءة الزيت الطيار والبكتيريا في تحطيم الافلاتوكسين في الوسط السائل

لقح 100 مل من الوسط YES السائل بقرصين قطر 0.5 سم من مستعمرة للفطر عمر 7 ايام ، في دوارق زجاجية سعة 250 مل، وحضنت بدرجة 25 ± 2ْ م مدة 14 يوماً. اضيف الزيت الطيار الى الدوارق بتركيز 6، 7، 8 مل/لتر واضيفت البكتيريا الى دوارق اخرى بحجم لقاح 2 ، 3 ، 5 مل/ دورق من مزرعة تحوي 16×10^{21} وحدة تكوين مستعمرة/مل وحضنت بدرجة 25 ± 2ْ م مدة 21 يوماً وقدر تركيز السم مصليا (باستخدام عدة اليزا القياسية) في الوسط بعد انتهاء التجربة.

تقويم كفاءة الزيت الطيار والبكتيريا في تثبيط الفطر ومنع انتاج السم في حبوب الذرة الصفراء

نقعت حبوب الذرة الصفراء بالماء لفترة ساعتين ثم رشح الماء وعقمت الحبوب بالمؤصدة بدرجة حرارة 121ْ م وضغط 1.5 كغم/سم^2 مدة 20 دقيقة. وزعت الحبوب في حاويات بلاستيكية سعة 1 كغم، 500 غم/حاوية، اضيف الزيت الطيار للحاويات بالتراكيز 6، 7، 8 مل/ كغم ولوثت الحبوب بالفطر المنمى على حبوب الدخن (لقاح) بمعدل 10 غم/حاوية. اضيف لحاويات اخرى 30، 40، 50 مل/500 غم من مزرعة تحوي 16×10^{21} وحدة تكوين مستعمرة/مل، ثم لقحت بالفطر *A. flavus* بالطريقة السابقة نفسها. خزنت الحاويات في المختبر لمدة 30 يوماً واستخلص السم من الحبوب حسب الطريقة الموصوفة من قبل (10) وقدر تركيزه مصلياً بتقنية الاليزا بعد انتهاء التجربة.

تقويم كفاءة الزيت الطيار والبكتيريا في تحطم الافلاتوكسين B1 في حبوب الذرة الصفراء

حضرت حبوب الذرة الصفراء وعقمت بالطريقة السابقة نفسها ووزعت في حاويات بلاستيكية بواقع 5 كغم/حاوية، لقحت الحبوب بـ 100 غم من حبوب الدخن الملوثة بالفطر *A. flavus* . اغلقت الحاويات وحضنت بدرجة حرارة 25 ± 2ْ م لمدة 21 يوماً ،بعدها اضيف الزيت الطيار لمجموعة من الحاويات بالتراكيز 6 ، 7 ، 8 مل/ كغم ولمجموعة اخرى من الحاويات اضيفت البكتريا بحجم لقاح 30 ، 40 ، 50 مل / حاوية من معلق البكتيريا

يحوي 16 × 10^{21} وحدة تكوين مستعمرة/مل بواقع 3 مكررات لكل معاملة وخزنت الحاويات في المختبر مدة 30 يوماً ثم استخلص السم من الحبوب وقدر تركيزه في نهاية التجربة(10).

استخلاص سم الافلاتوكسين B1 من حبوب الذرة الصفراء

تم اخذ حبوب الذرة الصفراء المخزنة ووضعت في الفرن لمدة 48 ساعه ثم طحنت بواسطه طاحونه كهربائية وتم استخلاص مباشر للسم وذلك بأخذ 10 غم من الذرة المطحونة و30 مل من محلول الاستخلاص (اسيتونايترل– ماء) 15:85 توضع في دوارق زجاجيه محكمه الغلق ثم توضع في الهزاز الكهربائي لمده ساعة ثم نأخذ الراشح بواسطه ورق الترشيح ثم توضع في الفرن بدرجه حراره 40م الى ان تجف و تحفظ لحين اجراء الاختبارات اللاحقة عليها.

تقدير تركيز السم بتقنية الاليزا

استعملت عدة قياسية لتقدير السم من شركة **Shenzhen Lvshiyuan Biotechnology. Co.,Ltd** اتبعت التعليمات المرفقة مع العدة القاسية اذ اضيف الى حفر طبق اليزا، المغلفة بالأجسام المضادة للافلاتوكسين B1، 50 مايكرولتر من مستخلص السم للمعاملات المختلفة والسم القياسي للتراكيز0 ، 1 ، 3 ، 9 ، 27 ، 81 جزء بالبليون كل على حده. اضيف 50 مايكروليتر من المصل المضاد للسم القياسي المعلم بالأنزيم لكل حفرة وترك الطبق مدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ، سكبت محتويات الحفر وغسلت اربع مرات بمحلول الغسل المجهز من الشركة. اضيف 100 مايكروليتر من Substrate لكل حفرة وترك الطبق 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة بعدها اضيف محلول ايقاف التفاعل وقدر امتصاص وسط التفاعل في الحفر على الطول الموجي 450 نانوميتر باستخدام قارئ الاليزا ELISA reader المجهز من شركة Biotek الامريكية وحسبت التراكيز برسم المنحنى القياسي للسم.

النتائج والمناقشة

فعالية البكتيريا والزيت الطيار في تثبيط انتاج الافلاتوكسين B1 وتحطيمه في الوسط السائل

اظهرت النتائج في جدول (1) ان اضافة البكتيريا *L. rhamnosus* GG الى الوسط الزراعي السائل بحجم لقاح 2 ، 3، 5 مل/لتر من مزرعة للبكتيريا تحوي 16 × 10^{21} وحدة تكوين مستعمرة /مل والزيت الطيار لنبات *Boswellia* spp. بالتراكيز 6، 7، 8 مل/لتر ثم تلقيح الوسط بالفطر *A. flavus* ، ادى الى اختزال معنوي في انتاج الافلاتوكسين B1 قياساً بمعاملة المقارنة ، اذ بلغ تركيز السم في الوسط 73.7 ، 73.3 ، 53.3 ميكروغرام / لتر للتراكيز الثلاثة من البكتيريا على التوالي، وبلغ 130 ، 120 ، 90 ميكروغرام/لتر للتراكيز الثلاثة من الزيت الطيار على التوالي قياساً بـ 256.7 ميكروغرام /لتر في المقارنة.

وأدى إضافة البكتيريا بحجم لقاح 2 ، 3 ، 5 مل/لتر من البكتيريا، والزيت الطيار بالتراكيز 7، 8 مل/لتر الى الوسط السائل بعد 14 يوماً من تلقيحه بالفطر بدرجة 25 ± 2ْ م الى خفض معنوي في تركيز السم في الوسط، إذ بلغ التركيز 150، 140، 106.7 ميكروغرام/لتر للتراكيز الثلاثة من البكتيريا على التوالي وبلغ 160 ، 146.7 ميكروغرام/ لتر للتركيزين 7، 8 مل/لتر من الزيت الطيار على التوالي قياساً بـ 255.7 ميكروغرام/لتر في المقارنة. ولم يكن للتركيز 6 مل/لتر من الزيت الطيار تأثيراً معنوياً في خفض تركيز السم (240 ميكروغرام/لتر) جدول 2.

جدول **1** :تأثير الزيت الطيار لنبات ***Boswellia* spp.** ، والبكتريا ***L. rhamnosus*** في تثبيط انتاج سم **AFB1** في الوسط السائل

المعاملات	تركيز السم **AFB1** (ميكروغرام / لتر)
البكتريا ***L. rhamnosus* GG** 16×10^{21} **cfu**	
2 مل / لتر	**73.7**
3 مل / لتر	**73.3**
5 مل / لتر	**53.3**
الزيت الطيار ***Boswellia* spp.**	
6 مل / لتر	**130**
7 مل / لتر	**120**
8 مل / لتر	**90**
المقارنة	**256.7**
L.S.D 0.05	**19.86**

جدول **2**: تأثير الزيت الطيار لنبات ***Boswellia* spp.**، والبكتريا ***L. rhamnosus* GG** في تحطيم السم **AFB1** في راشح الفطر ***A. flavus***

المعاملات	تركيز السم **AFB1** (ميكروغرام / لتر)
البكتريا ***L. rhamnosus* GG** 16×10^{21} **cfu**	
2 مل / لتر	**150**
3 مل / لتر	**140**
5 مل / لتر	**106.7**
الزيت الطيار ***Boswellia* spp.**	
6 مل / لتر	**240**
7 مل / لتر	**160**
8 مل / لتر	**146.7**
المقارنة	**255.7**
L.S.D 0.05	**77.47**

فعالية البكتيريا والزيت الطيار في تثبيط انتاج الافلاتوكسين **B1** وتحطيمه في حبوب الذرة الصفراء

أدت إضافة البكتيريا ***L. rhamnosus*** لحبوب الذرة الصفراء بحجم لقاح **30**، **40**، **50** مل/**500** غم من مزرعة للبكتيريا تحوي 16×10^{21} وحدة تكوين مستعمرة / مل والزيت الطيار لـ ***Boswellia*** الزيت الطيار تركيز **8** مل/ كغم ثم تلويث الحبوب بلقاح الفطر ***A. flavus*** الى اختزال معنوي في انتاج السم قياساً بمعاملة المقارنة، اذ بلغ تركيز الافلاتوكسين **B1** في الحبوب **70**، **73**، **74** ميكروغرام/ كغم للتراكيز الثلاثة من البكتيريا على التوالي، وبلغ **147** ميكروغرام/ كغم لمعاملة الزيت الطيار قياساً بـ **267** ميكروغرام / كغم في المقارنة بعد **30** يوماً من المعاملة. ولم يكن للتركيزين **6** ، **7** مل/ كغم من الزيت تأثيراً معنوياً في تثبيط إنتاج السم (**267** ، **267** ميكروغرام / كغم)، (جدول **3**).

جدول 3: كفاءة الزيت الطيار لنبات *Boswellia* spp. والبكتريا *L. rhamnosus* GG في تثبيط نمو الفطر *A. flavus* على حبوب الذرة الصفراء المخزنة ، وأثرها في انتاج السم AFB1

المعاملات	تركيز السم AFB1 (ميكروغرام / لتر)
البكتريا *L. rhamnosus* GG 16 × 10^{21} cfu	
30 مل / 500 غم	70
40 مل / 500 غم	73
50 مل / 500 غم	74
الزيت الطيار *Boswellia* spp.	
6 مل/ كغم	267
7 مل/ كغم	267
8 مل/ كغم	147
المقارنة	267
L.S.D 0.05	65.2

وأدت معاملة حبوب الذرة الصفراء الملوثة بالفطر والمحضنة بدرجة 25 ± 2° م مدة 21 يوماً في حاويات بلاستيكية بـ 30، 40، 50 مل/500 غم من مزرعة للبكتريا *L. rhamnosus* تحوي 16 × 10^{21} وحدة تكوين مستعمرة/مل، والزيت الطيار لل *Boswellia* بتركيز 8 مل / كغم الى خفض معنوي في تركيز الافلاتوكسين B1 قياساً بمعاملة المقارنة (فطر فقط) جدول (4)، اذ بلغ تركيز السم في حبوب الذرة المعاملة 86 ، 47 ، 28 ميكروغرام/ كغم للتراكيز الثلاثة من البكتيريا على الترتيب ، وبلغ التركيز 150 ميكروغرام / كغم التركيز 8 مل / كغم من الزيت الطيار قياساً بـ 267.0 ميكروغرام / كغم في المقارنة. ولم يكن للتركيزين 6 و7 مل/ كغم من الزيت الطيار تأثيراً معنوياً في خفض تركيز السم (253، 213 ميكروغرام/ كغم).

تشير نتائج هذه الدراسة الى كفاءة عالية لبكتيريا حامض اللاكتيك (LAB)والزيت الطيار لنبات *Boswellia* spp. في تثبيط نمو الفطر *A.flavus* وايقاف انتاجه للافلاتوكسين B1 او اختزاله في الوسط السائل وفي حبوب الذرة الصفراء المخزنة. وان كمية الافلاتوكسين المختزلة تعتمد على حجم اللقاح البكتيري وتركيز الزيت الطيار المضاف الى المعاملات. يلاحظ ايضاً ان اضافة البكتيريا والزيت قبل التلويث بالفطر كان اكثر كفاءة في منع انتاج السم او اختزاله. وقد اشارت دراسات عديدة الى كفاءة بكتيريا *L. rhamnosus* في تثبيط الفطر *A. flavus* ومنعه من انتاج الافلاتوكسين او التقليل من انتاجه كما بينت دراسات Blagojev وجماعته (11)، El-Nezami وجماعته (22) و Khanafari وجماعته (29) والى كفاءة الزيوت الطيارة كمضادات للفطريات (18، 30، 37، 39).

ان ألية تثبيط الفطر *A. flavus* بواسطة البكتيريا (LAB) ربما يعود لما تفرزه البكتيريا من مركبات ايض ثانوية اثناء نموها تمتلك فعالية تضادية للفطر في الوسط واعاقة إنتاجه للافلاتوكسين . وقد أعزت الكثير من الدراسات مقدرة بكتيريا حامض اللاكتيك في تثبيط الفطريات من خلال انتاجها العديد من الحوامض العضوية مثل حامض اللاكتيك ، وحامض الاستيك ، وحامض الربيونك ، وحامض فينل لاكتيك ، التي تمتلك فعالية تضادية ضد الفطريات ، فضلاً عن ان بعضها ينتج مركب Reuterin الذي يمتلك كفاءة تضادية ضد الكثير من الاحياء المجهرية من ضمنها الفطريات اذ بينت دراسة Blagojev وجماعته (11)، Gerez وجماعته (23) وMandal وجماعته (34) من عزل مركبات فينولية من وسط النمو لـ LAB تمتلك صفة تضادية ضد الكثير من الفطريات من ضمنها تلك الفارزة للسموم ، وتعود كفاءة الزيت الطيار لـ *Boswellia* لما يحويه من مركبات تمتلك فعالية تضادية للفطر *A. flavus* . وقد اشارت

دراسات عديدة الى إحتواء الزيت الطيار على مركبات مثبطة لنمو الفطريات منها حامض **Triterpenic** ومنعها من إنتاج السم (**13**، **40**).

جدول **4**: تأثير الزيت الطيار لنبات ***Boswellia* spp.**، والبكتريا ***L. rhamnosus* GG** في تحطيم سم **AFB1** في حبوب الذرة الصفراء الملوثة المخزنة

المعاملات	تركيز السم **AFB1** (ميكروغرام / لتر)
البكتريا ***L. rhamnosus* GG** 16×10^{21} **cfu**	
30 مل/**500** غم	**86**
40 مل/**500** غم	**47**
50 مل/**500** غم	**28**
الزيت الطيار ***Boswellia* spp.**	
6 مل/كغم	**253**
7 مل/كغم	**213**
8 مل/كغم	**150**
المقارنة	**267**
L.S.D 0.05	**54.3**

تشير النتائج ايضاً الى كفاءة كل من بكتيريا حامض اللاكتيك والزيت الطيار الى اختزال كمية الافلاتوكسين بعد انتاجه في الوسط. وتعزى كفاءة بكتيريا حامض اللاكتيك في إزالتها للافلاتوكسين من الوسط الى ربط الافلاتوكسين بالجدار الخلوي البكتيري وبالتحديد مع مكوناته من **Polysaccharides** و **Peptidoglycan** ،إذ وجد ان معاملة البكتيريا ببعض الانزيمات او تجفيفها ادى الى فقدان البكتيريا مقدرتها على ربط الافلاتوكسين (**9**، **12**، **26**). ولا يستبعد ان يكون لمركبات الايض الثانوية التي تنتجها البكتيريا اثناء نموها دوراً في ازالة السم او تحطيمه او تحويله الى مركبات اخرى اقل سمية. وقد اشير الى ان **LAB** لها المقدرة على تحويل الافلاتوكسين **B1** في الحليب المتخمر الى **aflatoxicol** و **aflatoxin B2** (**35**).

ان ميكانيكية الزيت الطيار في اختزال السم في الوسط الحاوي عليه ربما يكون عن طريق ارتباط المركبات الفعالة فيه مع المجاميع الفعالة في الافلاتوكسين **B1** ثم ابطال سميته او تحويله الى مركبات اخرى اقل سمية ، فقد اشير الى احتواء الزيت الطيار على مركبات **Terpeniod** ومركبات فينولية ذات فعالية للارتباط بمجاميع فعالة في الغشاء البلازمي للمسبب المرضي وتؤدي الى تحوير عمله او تحطيمه (**31**). ولا يستبعد ان يحدث تفاعلاً مماثلاً للزيت الطيار مع الافلاتوكسين ويؤدي الى تحطيمه او تحويله الى صيغ اخرى. يستخلص الى ان بكتيريا حامض اللاكتك **LAB** والزيت الطيار ربما تمثل طريقة واعدة في السيطرة على السموم الفطرية في الاغذية والمحاصيل الزراعية لأنها امينة وغير مكلفة وسهلة التطبيق.

المصادر

1-العبيدي، غسان فتحي (**1998**). كفاءة الفحم المنشط والحامض الاميني الميثيونين في خفض سمية الافلاتوكسين في افراخ فروج اللحم. رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل – نينوى، العراق.

2-العادل، خالد محمد ومولود كامل عبد (**1979**). المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات. مؤسسة دار الكتب والنشر، جامعة الموصل– نينوى، العراق.

3- الورشان، سالم حسين (2006). مقارنة بعض المعززات الحياتية وممتزين خفض الاثار السلبية للسم افلا B1 وتحسين الاداء الانتاجي لفروج اللحم. اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد– 145 ص، العراق.

4- حسين، حليمة زغير (2000). استعمال اليوريا في مقاومة فطريات ما بعد الجني وسمومها على الذرة الصفراء المخزونة . اطروحة دكتوراه– كلية الزراعة– جامعة بغداد– 77ص، العراق.

5-مغلس، محمود احمد عبدالقادر (2004).الكشف عن الفيومونيزين B1 وامكانية ازالة سميته في حبوب الذرة الصفراء وتأثيراته الحيوية في الطيور الداجنة.اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد– 84 ص، العراق.

6-Abbas, H. K. (2005).Aflatoxin and Food Safety, Taylor and Francis, London, New York, USA, pp.217.

7-Alpsoy, L. (2010). Inhibitory effect of essential on aflatoxin activities. Afr. J. Biotech.,9(17):2474-2481.

8-Anuja, D.; D. Chander and C. Aruna (1998). Aflatoxin. A cause of concern for human and animal health, Indian Dairyman, 50(6):23-30.

9-Azab, R. M.; W. M. Tawakkol; A. M. Hamad; M. K. Abou-elmagd; H. M. El-Agrab and M. K. Refai (2005). Detection and estimation of aflatoxin B1 in feeds and its biodegradation by bacteria and fungi. Egyptian J. of Natural Toxins., 2:39-56.

10- Balzer,I.; C. Boddanic and S. Pepljujak (1978). Rapid thin layer Chrmatographic method for determining Aflatoxin B Ochratoxin A, and Zearalenon in Corn . J . Assoc . off. Anal . chem.61:584.

11-Blagojev, N.; M. Skrinjar; S. Veskovic–Moracanin and V. Soso (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by latic acid bacteria metabolites. Romanian biotechnological letters.,17(3):7219-7226.

12-Bovo, F.; L.T. Franco; R. E. Rosim; C. S. F. Trinadade and C. A. F. De Oliveira (2014). The ability of *Lactobacillus rhamnosus* in solution, spray-dried or Lyophilized to bind aflatoxin B1. J. of Food Res., 3(2):35-42.

13-Buchele, B.; W. Zugmaier and T. Simmet (2003). Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related pharmaceucals by high performance liquid chromatography. Indentification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene. Journal of chromatography B.,791:21-30.

14-Cary, P. Mu.(2003).Cultural genetic, Approaches to managing mycotoxins in maize. Annu. Rev. Phytopathology, 41:99-116.

15-CAST, Council for Agriutal Science and Technology (2003). Mycotoxins : risks in plant , animal , and human systems. Task force report No. 139. Ames, Iowa, USA, pp.217.

16-Chao, S. C.; D. G. Young and C. J. Oberg(2000).Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essen. Oil. Res., 12:639-649.

17-Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage: A review food additives and contaminants, 27(5):651-657.

18-Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiological Reviews, 12(4):564-582.

19-Doster, M. A. ; T.J. Michailides and D. P. Morgan (1996) . *Aspergillus* species and mycotoxins in figs from *California orchards* . Plant Dis.80:484-489.

20-El-Arch, M.; B. Satrani; A. Farsh and D. Boriky (2003).Chemical composition antimicrobial and insecticide activities of the essential oil in *Mentha rotundifolia* Morocco. Acta. Bot. Galli., 150(3):267-274.

21-Eliana, N. C. T.; E. S. P. Caradoso; D. R. Ledoux; E. George and C.A. Oliveria (2010).Effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on blood biochemical parameters in Broilers. Toxins, 2(4):453-460.

22-El-Nezami, H.; P. Kankaanpaa; S. Salminen and J. Ahokas (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food and chemical Toxicology., 63(4):321-326.

23-Gerez, C. L.; M. I. Torino; G. Rollan and G.F. de Valdez (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. Food Control.,20:144-148.

24-Gratz , S.; H. Mykkanean; A. C. Ouwehand; R. Juvonen; S. Salminen and H. El-Nezami (2004). Intestinal mucus alters the ability of probiotic bacteria to Aflatoxin B1 In vitro. Appli. Envi. Microbi. 70(10):6306-6308.

25-Haskard, C. A.; H. S. El-Nezami; P. E. Kankaanpaa; S. Salminen and J. Ahokas (2001).Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria Appl. Environ. Microbiology., 67(7):3086-3091.

26-Haskard, C.; C. Binnion and J. Ahokas (2000).Factors affecting the sequestration of aflatoxin by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. Chem Biol. Interact.,128:39-49.

27-Ho, W.C. ; H. J. Su ; J.W. Li and W.H. Ko (2006). Effect of extracts of Chinese medicinal herbs on spore germination of *Alternaria brassicicola* and nature of an inhibitory substance from gallnuts of Chinese sumac (*Rhus chinensis*). Can. J. Plantpathol., 28:519-525.

28-Jones , B . D .(1972) . Methods of Aflatoxin analysis . Tropical Products Institute Rep . (G70).

29-Khanafari, A.; H. Soudi and M. Miraboulfathi (2007).Biocontrol of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1 production in corn. Iran. J. Environ. Health Sci. Eng.,4(3):163-168.

30-Kumar, R.; N. K. dubey; O. P. Tieari ; Y. B. Tripathi and K. K. Sinha (2007). Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored food commodities from fungal infestation. J. Sci. Food Agric., 87(9):1734-1743.

31- Lambert, R. J. W.; P. N. skandamis; P. J. Coote; G. J. E. Nychas (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil. Thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91:453-562.

32-Lauren, D. R.; W. A. Smith and M. E. Dimenna (2010). Influence of harvest dats and hybrid on the mycotoxin content of maize (*Zea mays*) grain grown in New Zealand. Journal of Crop and Horticultural Sci.,35(3) :331-340.

33-Lee, Y. K.; H. El-Nezami C. A. Haskard; S. Gratz; K. Y. Phong; S. Salminen and H. Mykkanen (2003). Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and non-viable bacteria. J. Food Prot.,66(3):426-430.

34-Mandal , V.; S. K. Sen and N.C. Mandal (2007). Detection, isolation and partial characterization of antifungal compounds produced by *Pediococcus acidilactici* LAB5. Natural Product Commurications, 2:671-674.

35-Megalla, S. E. and M. A. Mohran (1984).Fate of Aflatoxin B1 in Fermented products. Mycopathologia, 88:27-29.

36-Pacin, A. M.; H. H. L. Gonzalez; M. Etcheverry; S. L. Resnik; L. Vivas and S. Espin (2005). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador Mycopathologia,156(2):87-92.

37-Pandey, R. K. (2008). Physiological and pathological studies of certain fungi. D. Phil Thesis . University of Allahabad, Allahabad.

38-Pitt, J. I. and D. H. Ailsa (2009).Fungi and Food Spoilage.Third Edition. Springer Dordrecht Heidelberg, London , New York., 518.

39-Shukla, A .C.; S. K. Shahi and A. Dikshit (2000). Epicarp of *Citrus sinensis* : A Potential source of natural pesticide . Indian Phytopathol, 53 (3) :318-322.

40-Singh, S.; A. Khajura; S. C. Taneja; R. K. Johri; J. Singh and G.N. Qazi (2008). Boswellia acids: a leukotriene inhibitor also effective through topical application in inflammatory disorders. Phytomedicine. 15: 400-407.

41-Wambngu, P.W.; P. Mathenge; E.O. Aumu and H. A. Van Rheeuea (2009). Efficacy of traditional maize (*Zea mays* L.) seed storage methods in western Kenya African J. of Food Agric., 9(4):1110-112.

Iraqi J. Agric. Res. Vol.21 No.1 pp.125-136 June/2016

BIO: DEGRADATION AND INHIBITION OF AFLATOXIN B1 PRODUCTION IN CORN GRAINS

A. H. Hussien* **O. N. Matny****

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the efficiency of *Lactobacillus rhamnosus* and *Boswellia* volatile oil to inhibit growth of toxigenic isolate of *Aspergillus flavus* and reduce aflatoxin B1production and its detoxification. The results showed that addition the bacteria at 2,3,5 ml/ L from bacterial culture containing 16 x 10^{21} CFU/ ml and the volatile oil at 6, 7, 8 ml/L into the yeast extract sucrose liquid medium (YSE) , then inoculated with *A. flavus* induced significant reduction in aflatoxin production, 73.7, 73.3, 53.3 µg/L for the three tested concentrations of bacteria respectively, 130, 120, 90 µg/L for the concentration of volatile oil respectively compared with 256.7 µg/L in control. The addition of the bacterium at 2, 3, 5 ml/L and volatile oil at 7, 8, ml/L into liquid medium after 21days of inoculation with *A. flavus* and incubation at 25 ± 2°C induced significant reduction in aflatoxin concentration, 150, 140,106.7 µg/L for the three tested concentrations of bacterium respectively, 160, 146.7µg/L for the concentrations, 7 and 8 ml/L in control. Treated corn grains with bacteria at 30, 40, 50 ml/500 g and the volatile oil at 8 ml/kg, then inoculated the grains with *A. flavus*, induced significant reduction in aflatoxin production, 70, 73, 74 µg/kg for the three concentrations of bacterium respectively, 147.0 µg/kg for volatile oil at 8 ml / kg compared with 267.0 µg/ kg in control after 30 days of treatment. The treatment of corn grains with the bacterium at 30, 40, 50 ml/500 g and with *Boswellia* volatile oil at 8 ml/kg after 21 days of inoculation with *A. flavus* and incubation at 25 ± 2°C induced significant reduction in aflatoxin concentrations, 80, 47, 28 µg/kg for the three concentrations of the bacterium respectively, 150 µg/ kg for the volatile oil at 8 ml/kg compared with 267.0 µg/kg in control.

Part of M.Sc. thesis for the first author.

*** College of Agric., -Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.**

****Mesopotamia Company- Ministry of Agric.- Baghdad, Iraq.**