تقييم كفاءة بكتريا الـ *Lactobacillus plantarum* في أختزال سمية سم الزيرالينون داخل وخارج جسم الكائن الحي

سامي عبد الرضا الجميلي[1] **نور الهدى عبد المنعم العبودي[2]**

أستاذ **طالبة ماجستير**

[1]قسم التحليلات المرضية/كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء

[2]قسم وقاية النبات/كلية الزراعة/ جامعة كربلاء

البريد الإلكتروني:nnoor4518@gmail.com

المستخلص:

نفذت هذه الدراسة في مختبر السموم التابع لقسم التحليلات المرضية في كلية العلوم الطبية التطبيقية– جامعة كربلاء اذ هدفت هذه الدراسة الى تقييم كفاءة بكتريا *Lactobacillus plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون. أوضحت نتائج العزل والتشخيص ظهور الفطر *Fusarium* spp. بنسبة ظهور بلغت 32% ونسبة تردد بلغت 5.33%. بينت نتائج أختبار قابلية عزلات الفطر *Fusarium* spp. على انتاج سم الزيرالينون باستعمال تقانة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (TLC) وجود 13 عزلة منتجة من أصل 18 عزلة اي بنسبة 72.22% وأظهرت نتائج الدراسة فعالية بكتريا *L. plantarum* في أختزال سمية سم الزيرالينون خارجياً (*In vitro*) اذ اختفى تألق بقعة سم الزيرالينون المعالج بالبكتريا من لوحة Thin layer chromatography عند تعريضها الى الأشعة فوق البنفسجية عند طول موجي 360 نانومتر وعززت هذه النتيجة نتائج الأختبارات الحيوية داخل جسم حيوانات الجرذ الأبيض والمعاملة بالبكتريا *L. plantarum* متبوعاً بسم الزيرالينون اذ كانت معايير الدم الفسيولوجية سليمة تماماً. في حين ظهرت تغايرات مرضية واضحة في معايير الدم الفسيولوجية لدى الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون فقط. اذ بلغت أعداد كريات الدم الحمراء في معاملة البكتريا والسم 6.66×10^{6}كرية/ملم^{3} كما بلغت في معاملة السم فقط 4.81×10^{6}كرية/ملم^{3} وكانت اعداد كريات الدم البيض في معاملة البكتريا والسم 13.18×10^{3} ملم^{3} اما معاملة السم فقط 14.56×10^{3} ملم^{3} وبلغت كمية مكداس الدم في معاملة البكتريا والسم 62.76% أما معاملة السم فقط فكانت 42.5%.

كلمات مفتاحية: سم الزيرالينون، بكتريا الـ *Lactobacillus plantarum*، *Fusarium verticilliodes*

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Evaluation of *Lactobacillus plantarum* efficincey and zearalenone Toxicity reducing *In vitro* and *In vivo*

Sami A. Al-jumaili[1] **Noor Alhuda A. Al-aboudy[2]**
Professor
[1]Department of Pathological analysis, College of Sciences, University of Karbala.
[2]Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Karbala.
E-mail address: nnoor4518@gmail.com

Abstract:

This study was carried out in the toxines Laboratory of pathological analysis-in the College Sciences as The Evlution efficiency of *Lactobacillus plantarum* in decrease of Zearalenone to toxicity The aim of this study was to evalute the efficiency of *Lactobacillus plantarum* bacterium detoxificated of zearalenone toxin.The results and diagnose showed *Fusarium* spp. Fungus appearance and frequency was 32% and 5.33% respectively**.** Also results of *Fusarium* spp.test on the production of zearalenone toxin Thin layer chromatography(TLC) showed 13 isolated produced to toxin out of 18 isolation in the rate 72.22% The study results showed the effectiveness of the bacteria *L. plantarum* in reducing the toxicity of zearalenone externally(*In vitro*) since disappeared shin spot poison zearalenone treatment with bacteria from plate Thin layer chromatography when exposed UV at a 360 nm wavelength . reinforced this result vital tests that took place inside the body of animals albino Rat and the transaction of zearalenone pre-treatment bacterium *L. plantarum* the physiological blood parameters were completely intact and showed clear variances in the physiological blood parameters in animals treated to zearalenone only. The count of red blood cells in the treatmet bacteria and toxin $6.66x10^6$ cell/mm^3 as treated in poison treatment only $4.81x10^6$ cell/mm^3 and count of white blood cells in the treatment of bacteria and poison $13.18x10^3$ mm^3 while the treatment of poison only $14.56x10^3$ mm^3 the quantity of PCV of bacteria and poison 62.76% and the treatment of poison only 42.5%.

Key word: Toxin zearalenone, Bacteria Lactobacillus plantarum ,Fusarium verticilliodes

المقدمة:

أشارت الدراسات ان تلوث محاصيل الغذاء العالمي بمستويات مختلفة من السموم الفطرية وصل الى 25% سنويا حسب تقرير منظمة الغذاء والزراعة الدولية (24). اذ يعتبر الفطر *Fusarium* من الفطريات القاطنة في التربة ويصيب جميع أجزاء نبات الذرة الصفراء ومنها البذور(46). تنبت البذور المصابة بالفطر بصورة عادية وتنتج بادرات سليمة او قد تؤدي في حالات أخرى الى الإصابة بمرض سقوط البادرات أو يسبب تعفناً للجذور والسيقان والعرانيص والحبوب في النباتات الكاملة(57). وبعض أنواع الفطر تصيب الأوعية الناقلة وتؤدي الى ذبول النبات وموته (3). كما انه يصيب الذرة الصفراء في الحقل ويسبب تعفن العرنوص (Ear rot) وتستمر معها عند الخزن ولاسيما اذا كانت هناك رطوبة تساعد على انتشار الفطر في المخازن مما يؤدي الى تلوث الحبوب بالأفرازات السامة للفطر(59). والفطر *Fusarium* ليس مسبباً مرضياً يسبب خسائر كبيرة في المحاصيل الأقتصادية وإنما يتعداه الى تسببه في حالات مرضية للأنسان وحيواناته عند تناول أغذية وأعلاف

ملوثة بسموم هذا الفطر ومن السموم التي تفرزها الأنواع المختلفة للجنس *Fusarium* هي Fusaric acid و Moniliformine و Zearalenone و Trichothecens التي تمثل مجموعة من المركبات السامة(54). وتكمن أخطار السموم الفطرية في كونها ذات اوزان جزيئية واطئة تستحث الجهاز المناعي و لاتتحطم بدرجات الحرارة العالية اي مقاومة للحرارة(56). والزيرالينون هو مركب سام ذو طبيعة فينولية إذ ينتج من قبل العديد من الأنواع العائدة للجنس *Fusarium* أهمها *F.culmorum* و *F.graminearum* و*F.verticilliodes* و*F.moniliforme* و*F.equiseti*. والزيرالينون مجموعة تضم عدد من مشتقاته ومنها α–Zearalenone و ß–Zearalenone التي قد تزيد أو تقل درجة أنصهارها عن 178م°الى 180م°(14). ويشبه سم الزيرالينون الى حد كبير تركيب هرمون 17ß–estradiolالبشري وبذلك يستطيع الأرتباط مع مستقبلات هرمون الأستروجين(36) حيث يعمل على تأخير الحمل وحصول حالات اجهاض ومشاكل في الأنجاب وضعف المقاومة ضد الأمراض كما أنه يؤثر على معايير الدم الفسلجية(19,43) فضلا عن حدوث حالات سرطان وتحسس في الجلد (10). أستعملت الطرق الفيزيائية والكيميائية في حماية الأغذية من التلوث بالسموم الفطرية ولكن هذه الطرق لها مخاطر جانبية محتملة وكلفتها عالية نسبياً وعليه إتجهت البحوث العلمية حول إستعمال الطرق الحيوية والتي يستعمل فيها أنواع البكتريا والخمائر أو استعمال أنظمة إنزيمية متخصصة تعمل على إبطال فعالية السم الفطري من خلال عملية التحولات الحيوية التي تؤدي الى تحطيم جزء من تركيبة السم و بالتالي الى فقدان سميته وفعاليته أو يحدث أدمصاص للسم على الجدار الخلوي أو احد مكوناتها وهذا يؤدي الي تقييد جزيئات السم وابطال مفعوله(12). وعليه تم أقتراح هذا البحث والذي يتضمن أختبار فعالية بكتريا الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون داخلياً و خارجياً.

المواد وطرائق العمل:

عزل الفطر .*Fusarium* spp وتشخيصه

أتبعت طريقة(37) لعزل فطر الـ *Fusarium* من حبوب الذرة الصفراء اذ أخذت 100 حبة من كل عينة عشوائياً من العينات التي تم جمعها من الأسواق المحلية لمحافظة كربلاء و واسط وبابل. اذ عقمت باستخدام هايبوكلورات الصوديوم تركيز 2% لمدة دقيقتين ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات وجففت بورق ترشيح معقم. ونقلت بواسطة ملقط معقم الى أطباق بتري قطر 9 سم حاوية على 20 سم^3 من الوسط الزرعي PDA بواقع 5 حبات لكل طبق و 5 أطباق لكل عينة بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 25±2م° لمدة أسبوع. بعد ذلك تم تنقية عزلات الفطر *Fusarium* وزرعت على نفس الوسط الزرعي PDA وحضنت تحت درجة حرارة 25±2 م° لمدة أسبوع ومن ثم تم تشخيص العزلات الفطرية بالأعتماد على المفاتيح التصنيفية لكل من(49،13).

عزل وتشخيص بكتريا *Lactobacillus plantarum*

جمعت عينات من اللبن الموجود في الأسواق المحلية وعملت سلسلة من التخافيف لكل عينة من العينات قيد الدراسة اذ تم التخفيف بواسطة محلول ملحي فسلجي وتراوحت التخافيف (10^{-1} – 10^{-6}) بعد ذلك حضر

الوسط Nutrient agar وصب في أطباق وتركت لتتصلب ثم أخذ من التخفيف الـ 10^{-6} كمية بمقدار 0.1 مل ونشر على سطح الطبق بواسطة ناشر زجاجي معقم وتم عمل أربع مكررات للتخفيف بعدها حُضنت الأطباق تحت درجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة في وعاء زجاجي خالي من الأوكسجين (16).

تشخيص البكتريا *L.plantarum*

تم تشخيص نوع وجنس البكتريا بالإعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية والأختبارات الكيموحيوية بحسب ما جاء به كل من (39 ، 44) وكما يأتي:

1.الصفات المظهرية

لُقحت أطباق بتري حاوية على N.A بمستعمرة بكتيرية نقية مفردة و حضنت لمدة 24 ساعة تحت درجة حرارة 37 م° بعدها تم دراسة الصفات المظهرية للمستعمرات النامية من حيث شكل وقوام ولون المستعمرة.

2. الصفات المجهرية

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

3. الإختبارات البايوكيميائية

شخصت البكتريا وفقا للأختبارات التالية:

1. **أختبار الليسيثينيز Lecithinase Test** كما ذكر من قبل(40).
2. **أختبار تحلل الدم Blood Hemolysis test** كما ذكر من قبل(16).
3. **إختبار التحري عن إنزيم الكاتاليز Catalase Enzyme test** كما ذكر من قبل(40).
4. **إختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation test** كما ذكر من قبل(40).
5. **إختبار الأندول Indol test** كما ذكر من قبل(40).
6. **إختبار تحلل النشأ Starch hydrolysis test** كما ذكر من قبل(53).
7. **إختبار التحري عن إنزيم اليوريز Urease enzyme test** كما ذكر من قبل(26).
8. **إختبار استهلاك السترات Citrate utilization test** كما ذكر من قبل(16).
9. **إختبار فعالية إنزيم الأوكسيديز Oxidase test** كما ذكر من قبل(40).

4. الإختبارات الفسيولوجية

شخصت البكتريا وفقا للأختبارات التالية:

1. **إختبار الحركة Motility test** كما ذكر من قبل(16).
2. **إختبار تحمل الملوحة** كما ذكر من قبل(16).

وعلى ضوء ماتقدم تم تشخيص بكتريا الـ *L. plantarum*

5. تحضير لقاح البكتريا *L. plantarum*

بعد تشخيص بكتريا الـ *L. plantarum* تم اكثارها على وسط N.B (وسط المرق المغذي) المعقم في دوارق زجاجية سعة 500 مل وبعد التعقيم ترك ليبرد ثم لقح بالبكتريا *L. plantarum* من مزرعة بكتيرية عمرها 24 ساعة نامية على وسط N.A وحضنت الدوارق لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 28±1م°[30].

قابلية عزلات الفطر .*Fusarium* spp على أنتاج سم الزيرالينون في وسط الرز

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

1.تنمية الفطر .*Fusarium* spp على وسط الرز

اتبعت طريقة(31) بتنمية عزلات الفطر *Fusarium* واستخلاص سم الزيرالينون وكما يلي:

حُضر الوسط بأتباع طريقة(1) المحورة من قبل(23)، بأخذ 200غم من حبوب الرز ثم أُضيف له 125مل من الماء المقطر المعقم في أطباق زجاجية قطر 20سم وأرتفاع 5 سم وتركت الأطباق لمدة ساعتين. بعد ذلك عقمت بجهاز التعقيم البخاري بدرجة حرارة 121م° وضغط 15 باوند.انج$^{-2}$ لمدة21 دقيقة ولوث الوسط بعد تبريده بأقراص العزلات الفطرية النقية وكان قطر القرص الواحد 1سم من طرف العزلة النقية التي تم تنميتها على وسط الـ PDA بواسطة ثاقب فليني وعملت ثلاث مكررات لكل عزلة مع التحريك المستمر للأطباق لضمان توزيع متجانس لأبواغ الفطر ثم وضعت الأطباق في الحاضنة تحت درجة حرارة 25±2 م° لمدة أسبوعين بعدها خفضت درجة الحرارة الى 13±2 م° لمدة أسبوعين أيضاً لتحفيز الفطر على إنتاج السم. بعد أنتهاء مدة الحضن جفف وسط الرز في الفرن تحت درجة حرارة 45م°.

2. أستخلاص سم الزيرالينون

تم أستخلاص سم الزيرالينون من وسط الرز وذلك بأخذ 50غم من الرز المنمى عليه الفطر *Fusarium* ووضع في دورق زجاجي. وأُضيف له مزيج من 25 مل ماء مقطر و 250 مل كلوروفورم ورج الخليط بعد ذلك لمدة 30 دقيقة بجهاز الهزاز الكهربائي، ثم رشح الخليط من خلال ورق ترشيح Watman No.2 و جمع الراشح في دورق زجاجي لغرض تنقيته و كررت هذه العملية على عزلات الرز المنماة عليها عزلات الفطر *Fusarium*.

3. تنقية سم الزيرالينون

أتبعت طريقة(48) لتنقية سم الزيرالينون وكما يلي:

1. أستعمل عمود كروماتوغرافي طوله 75سم وقطر 1.4سم وضع في أسفله قليل من الصوف الزجاجي.
2. أُضيف له 5 غم من كبريتات الصوديوم اللامائية (Na_2SO_4) لتكون قاعدة لأستقرار السليكا.
3. أخذ 10 غم من السيليكا (60G) ونشط بدرجة حرارة 110م°ولمدة 10 دقائق بعدها أضيف 5مل من الكلوروفورم رج المزيج ثم مرر عبر العمود.
4. بعدها أضيف15غم من كبريتات الصوديوم اللامائية وبهذا أصبح عمود الفصل جاهز للأستعمال.
5. بعد ذلك أُضيف للعمود السابق بعد تجهيزه 50مل من مستخلص الرز المنمى عليه عزلة الفطر *Fusarium*.

6. أمرر عبر العمود 150 مل هكسان n–Hexane ثم 150مل من بنزين وأهمل راشح الهكسان والبنزين.
7. بعدها مرر 250مل من خليط بنزين – أسيتون(9–1).
جمع الراشح الأخير بدورق زجاجي وركز الى 2مل وحفظ في المجمدة لحين اجراء الكشف.

السم القياسي

تم الحصول على السم القياسي لسم الزيرالينون من مختبر السموم الفطرية في كلية العلوم الطبية التطبيقية وبتركيز 250 مايكروغرام.مل$^{-1}$.

الكشف عن سم الزيرالينون

أستعملت في هذه الدراسة صفائح السيليكا جل Thin Layer Chromatograpy (TLC) ذات أبعاد 20x20 وبسمك 0.25 ملم تم تنشيط هذه الصفائح في فرن كهربائي على درجة حرارة 110 م° لمدة ساعة واحدة. عمل خط مستقيم خفيف على صفيحة الـ TLC يبعد بمسافة 2 سم من من الأعلى والأسفل وتركت مسافة 1.5 سم من كل جانب أيضا ، بعد ذلك أستخدم السم القياسي الذي حضر كما في الفقرة 7.3 للمقارنة مع المستخلص من ناحية شدة التألق وقيمة نسبة الجريان RF حيث وضع 10مايكروليتر بواسطة أنبوبة شعرية ثم أُضيف مستخلص كل عينة من العينات المراد الكشف عن السم فيها. بعد ذلك تركت الصفيحة لحين جفاف البقع عليها ثم وضعت في حوض فصل زجاجي يحوي نظام الفصل بنزين – أسيتون(90–10) مل والذي تم تحضيره مسبقاً. تركت الصفيحة في الحوض لحين وصول مزيج نظام الفصل الى ماقبل 2سم من الحافة العليا للصفيحة، تم أستخراج الصفيحة من الحوض بعد أكتمال الفصل وتركت لتجف تحت ظروف المختبر بعدها فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 365 نانوميتر وبعد ذلك تم مقارنة لون التألق ومعامل الترحيل للسم القياسي مع العينات وتم تحديد العينات المنتجة للسم. حسبت نسبة الجريان (معامل التظهير) (Rate of Flow Rf) حسب المعادلة التالية:

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

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

تم تهيئة وسط N.B ووزع على أربعة أنابيب إختبار بواقع 5مل لكل إنبوبة إختبار لقح إنبوبان من الانابيب الأربعة بخمس مستعمرات من بكتريا *L.plantarum* لكل إنبوبة بعدها أضيف 500مايكروغرام من سم الزيرالينون لكل انبوبة إختبار وحضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37م° لمدة 27ساعة بعدها تم إستخلاص سم الزيرالينون بإضافة 5مل من الكلوروفورم لكل انبوبة ثم رجت كل انبوبة بصورة جيدة بعدها تركت لمدة ثلاثين دقيقة، اذ تم أخذ الطبقة العليا(طبقة الكلوروفورم) ثم ركزت الى 1مل بوضع الأنابيب في فرن كهربائي بدرجة 40 م° ثم عملت بقع على لوحة الـ TLC حيث وضعت بقعة للسم القياسي وبقعة للمحلول الذي تم إذابته بالكلوروفورم وبكميات متساوية وتم الترحيل والكشف عن توهج سم الزيرالينون وبعد ذلك تم مقارنة شدة التوهج مع السم القياسي، إذ ان قلة شدة التوهج تدل على فعالية البكتريا في تحطيم أو تغيير في تركيبه.

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

1. تهيئة الحيوانات

تم تهيئة(16) ذكر من الجرذ الأبيض بعمر (8–10) أسابيع وبأوزان تراوحت(200–250)غم وقسمت الى أربع مجاميع ضمت كل مجموعة(4) حيوانات.

2. معاملة الحيوانات

تمت معاملة الحيوانات وفقا لما مبين في أدناه:

1.معاملة لقاح البكتريا + سم الزيرالينون: جرعت الحيوانات في اليوم الأول بلقاح البكتريا بجرعة 1 مل.كغم$^{-1}$ (5×10^6) بعمر 48ساعة ثم جرعت بعد 24ساعة بسم الزيرالينون 100ملغرام.كغم$^{-1}$ من وزن الحيوان.

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

3.معاملة سم الزيرالينون فقط: جرعت الحيوانات بسم الزيرالينون وبجرعة مقدارها 100 ملغرام.كغم$^{-1}$ من وزن الحيوانات.

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

كررت عملية التجريع بواقع سبع مرات ولمدة أربعة عشر يوم مع متابعة الأعراض السريرية التي يمكن أن تظهر على الحيوانات المعاملة أثناء فترة التجريع، ثم تركت لمدة أربع أيام بعدها خُدرت الحيوانات بمادة الكلوروفورم وتم سحب عينات الدم بطريقة طعنة القلب ووضعت في أنابيب أختبار حاوية على الـ(EDTA)لأجراء فحوصات الدم الفسيولوجية.

3. قياس المعايير الفسلجية

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

معدل التعداد الكلي لخلايا الدم الحمر (RBCs)

معدل التعداد الكلي لكريات الدم البيض (WBCs)

حساب معدل الهيموكلوبين الكلي (Hb)

حساب معدل الخلايا الليمفاوية Lymphocyte

حساب عدد الصفائح الدموية Platelets

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

النتائج والمناقشة:

عزل وتشخيص الفطر *Fusarium verticilloides* من حبوب الذرة الصفراء

أظهرت نتائج العزل والتشخيص للفطر *Fusarium verticilloides* من حبوب الذرة الصفراء والتي تم عزلها من 25 عينة شملت محافظات كربلاء و واسط و بابل حيث كانت نسبة ظهور الفطر *Fusarium verticilloides* 32% ونسبة تردد بلغت 5.33% وهذه النتائج مقاربة لما وجده(52 و7).

تشخيص البكتريا *L.plantarum*

1.دراسة الصفات المظهرية

عند تنمية عزلة البكتريا المنقاة على وسط N.A ظهرت مستعمرات دائرية محدبة وغير مدببة ومتوسطة الحجم كما ان لون المستعمرة ابيض أو كريمي أو اصفر فاتح (30 و28).

2. الصفات المجهرية

اوضحت نتائج الفحص المجهري للشرائح الزجاجية الحاوية على الغشاء البكتيري المثبت والمصبغ بصبغة كرام ان اشكال الخلايا البكتيرية كانت بيضوية الى عصوية قصيرة نهاياتها ممستديرة وغير متحركة، موجبة لصبغة كرام فردية او في ازواج او سلاسل قصيرة وهذا يتفق مع ما ذكره (30 و28).

3. الأختبارات البايوكيميائية

بينت نتائج هذه الإختبارات ان العزلة البكتيرية عائدة للنوع *L.plantarum* كما في الجدول التالي وهذا يتفق مع ما جاء به كل من (40 و28).

جدول نتائج الأختبارات البايوكيميائية لبكتريا *L.plantarum*

ت	الإختبار		النتيجة
1	Licethenase		–
2	Blood Hemolysis		–
3	Catalase Enzyme		–
4	Oxidase		–
5	Sugars Fermentation	Mannitol	+
		Lactose	+
		Maltose	+
		Ribose	+
		Glucose	+
6	Motility		–
7	Indol		–

8	Urease	+
9	Starch	–
10	Peptone	–
11	Simon Utilization	–
12	NaCl %6.5	–

أختبار قابلية عزلات فطر *Fusarium verticilloides* على إنتاج سم الزيرالينون

بينت نتائج التحليل الكيميائي والكشف عن سم الزيرالينون بأستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة(TLC) ان 13عزلة من أصل 18 عزلة من العزلات التي تم اختبارها كانت قادرة على انتاج سم الزيرالينون وبلغت نسبة العزلات المنتجة للسم 72.22%. وكانت هذه النتيجة مقاربة لما وجده(52) اذ وجد 9عزلات من اصل 13عزلة من فطر *Fusarium* والتي عزلت من حبوب الذرة الصفراء منتجة لسم الزيرالينون وبنسبة 69.2% وجاءت مقاربة لما وجده(6) اذ وجد 8عزلات من أصل 13عزلة تم عزلها من حبوب الذرة الصفراء منتجة للسم اي بنسبة 66.6% كما تقاربت النتائج مع ما وجده (7) اذ وجد 10عزلات من أصل 12عزلة من عزلات الفطر *Fusarium* تم عزلها من حبوب الذرة الصفراء منتجة لسم الزيرالينون وكانت النسبة 83.3%. أن الفطر *Fusarium* يصيب نباتات الذرة الصفراء في الحقل وتتطور الأصابة بالحبوب في المخزن بسبب تخزين الحبوب خلال موسم سقوط المطر حيث تصل رطوبة الهواء فيه الى 90%حيث يؤدي الى استمرار فعالية الأبواغ فترة اطول وبالتالي حدوث تلوث اكبر للحبوب المخزونة(25).

إختيار عزلات من بكتريا *L.plantarum* المعزولة من الالبان في تحطيم سم الزيرالينون خارجياً (*In vitro*)

أثبتت نتائج الأختبار كفاءة عزلة الـ *L.plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون بطريقة الأختبار الخارجي بإستعمال تقنية الصفائح الرقيقة(TLC) وذلك من خلال الأعتماد على درجة التألق اللوني للمادة السامة المعامة بالبكتريا *L.plantarum* المذابة بمادة الكلوروفورم والمادة السامة غير المذابة مقارنة مع التألق اللوني لمادة السم القياسي، وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه[60]. حيث أثبت قابلية ثلاث سلالات من بكتريا الـ *L.plantarum* قادرة على أختزال كمية سم الزيرالينون في الأوساط السائلة بنسب 38.06% و 39.50% و 47.80%. كما أظهرت العديد من سلالات الـ *L.plantarum* قابليتها على إزالة سموم الأفلاتوكسين B1[21][34][61]. بالأضافة الى قدرتها على تحطيم سم الباتولين و الأوكراتوكسين A[27][29]. كما بين كل من[11][62] على أختزال كمية وإزالة سمية سم الـ DON. وكانت هناك دراسة أخرى حول قدرة سلالتين من بكتريا الـ *Lactobacillus rhamnosus* في تحطيم وازالة سم الزيرالينون وأحدى مشتقاته α–Zearalenol خارجياً حيث تمت إزالة 58–60% في درجة حرارة 25–37%من كمية السم الكلي كما وأظهرت نفس السلالات قدرتها على ربط الأفلاتوكسين والتراكوشين[19][20][47]. كما وبين[4] قدرة بكتريا الـ *Lactococcus lactis* على إختزال سم الأفلاتوكسين، كما وأثبت[45][50]. قدرة بكتريا الـ *Lactococcus lactis* وبكتريا *Lactobaillus plantarum* في تقليل كمية سم الأفلاتوكسين في الأوساط السائلة بنسبة بلغت 27 و46% على التوالي وذلك

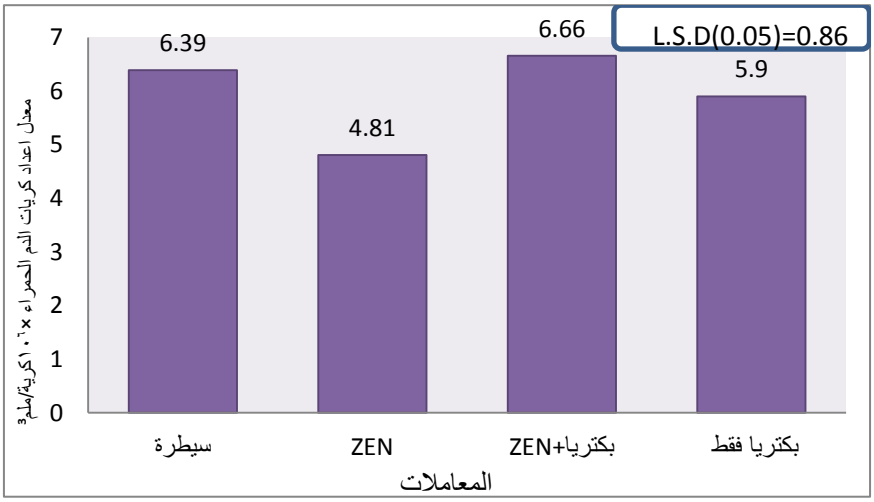
بأستخدام تقنية إختبار اليزا ELISA Test. إن تقليل كمية السم بواسطة الأحياء الدقيقة يكون عن طريق ربط أو(تقييد) المادة السامة على مكونات الجدار الخارجي أو عن طريق الأنزيمات المحللة كـ α–amylase و lipaseA و dextranase و phosoholipase التي تفرزها البكتريا[17][19].

تقييم فعالية بكتريا الـ *Lactobacillus plantarum* في تحطيم سم الزيرالينون داخل الجسم الحي (*In vivo*) وبشكل وقائي

الفحوصات الفسلجية لبعض معايير الدم

1. اعداد كرات الدم الحمراء RBCs

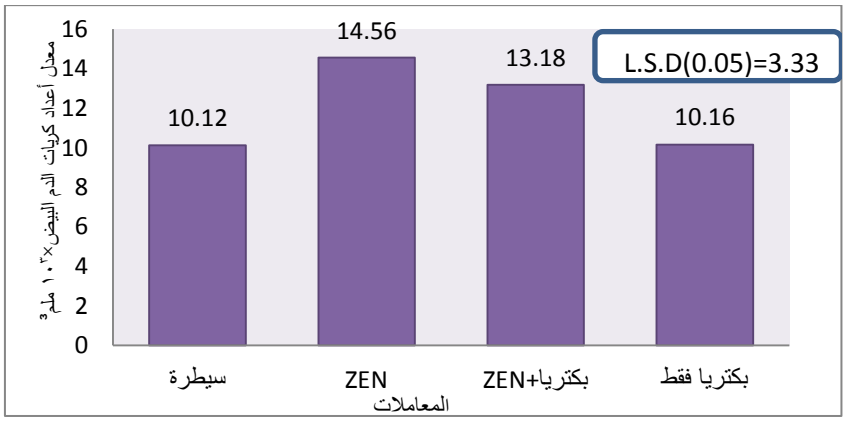
أظهرت نتائج التحليل الإحصائي عن وجود فروق معنوية$P < 0.05$ بين المعاملات إذ قلت اعداد كريات الدم الحمر في دم الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون الى 10^6X4.81 كرية.ملم$^{-3}$ عن معاملة السيطرة والبالغة 10^6X6.39 كرية.ملم$^{-3}$ وبلغت في معاملة البكتريا والسم 6.66 x 10^6كرية.ملم$^{-3}$ شكل(1) والتي أختلفت معنوياً عن معاملة السم فقط. وذلك مطابق لما توصل اليه كل من[4][8]. إن سم الزيرالينون عمل على تثبيط مادة الـ Glutathione والتي وظيفتها حماية كريات الدم الحمراء من تأثير المواد السامة وبالتالي تصبح الكريات الحمراء أكثر حساسية للمادة السامة ويؤدي ذلك الى تقليل اعدادها وقصر عمرها وبالتالي حصول فقر الدم(Anemia) (18). كما أن انخفاض كريات الدم الحمراء قد يعود الى أرتباط السم ببروتين الدم α-Globin و ß– Globin او ان نقصان كريات الدم الحمر كان بسبب امتصاص الأمعاء لعنصر الحديد نتيجة تأثير السموم الفطرية عليها وبالتالي حصول نقص في كمية الهيموغلوبين(38). أما قدرة البكتريا *L.plantarum* على رفع معدل اعداد كريات الدم الحمر يعود الى قدرة البكتريا على ربط واختزال سم الزيرالينون حيث تعمل البكتريا كمرشحات في الأمعاء من خلال ربطها بالجدر الخلوية للبكتريا وبالتالي تمنع وصولها الى الأمعاء الدقيقة والكلى والكبد(15).



شكل 1: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم الحمر لذكور الجرذ الأبيض.

2. اعداد كريات الدم البيض WBCs

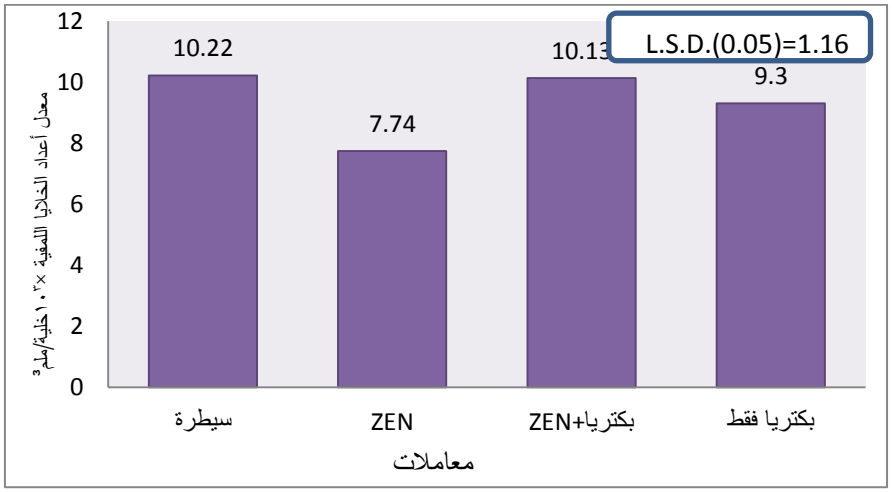
أظهرت النتائج وجود تباين في اعداد كريات الدم البيض في دم الحيوانات المعاملة اذ بلغت في معاملة السم 10³X14.56ملم³ اذ أختلفت معنوياً عن معاملة السيطرة والتي بلغ 10³X10.12ملم³ اما معاملة البكتريا مع السم فقد بلغت 10³X13.18ملم³ شكل(2) اذ لم تختلف معنويا مع معاملة السيطرة وباقي المعاملات ويعود سبب الأرتفاع الى قدرة السموم الفطرية على رفع اعداد كريات الدم البيض الحامضية التي تعمل على ازالة السموم المختلفة من الجسم(42). كما وبين(32) أن أزدياد أعداد كريات الدم البيض كان بسبب تحفيز الجهاز المناعي بسبب دخول جسم غريب وقيام هذه الكريات بواجبها الدفاعي. وهذا يتطابق مع ما ذكره (7و22). عند تجريع الفئران لسم الزيرالينون وكذلك يتفق مع ما وجده (6) عن تغذية طيور السمان بعلائق ملوثة بسم الزيرالينون .



شكل 2: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد كريات الدم البيض لذكور الجرذ الأبيض.

3. معدل اعداد الخلايا اللمفية Lymphocyte

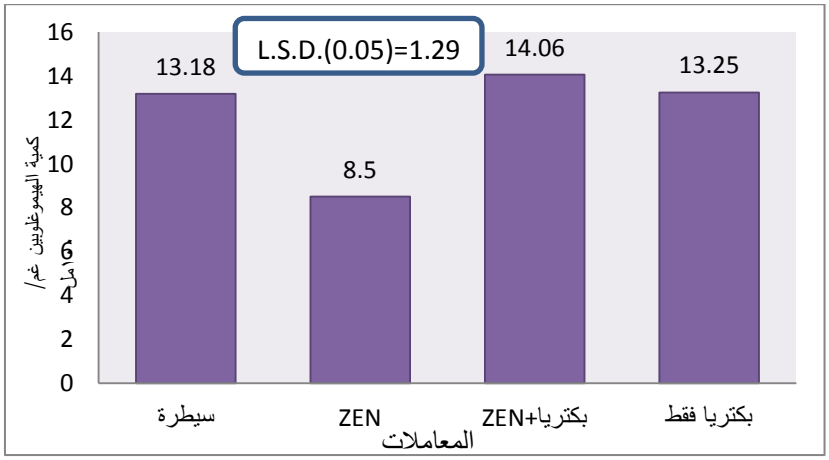
ان معاملة الحيوانات بسم الزيرالينون ادى الى حدوث انخفاض معنوي في الخلايا اللمفية دون الحد الطبيعي حيث بلغت 10³x7.74 خلية.ملم⁻³ مقارنة مع معاملة السيطرة والتي بلغت 10³x10.22 خلية.ملم⁻³ كما لم تختلف معاملة البكتريا والسم معنويا عن معاملة السيطرة حيث بلغت قيمة المعاملة 10³x10.13 خلية.ملم⁻³ شكل(3) وقد يعود سبب انخفاض الخلايا اللمفية الى حدوث اجهاد لدى الحيوانات المعاملة وزيادة افراز الأدرينالين والتي تؤدي الى تقلص الطحال والذي يتسبب باضعاف جهاز المناعة[58] وقد يحدث النقص في الخلايا اللمفية بسبب تأكسد الخلايا نتيجة السم الموجود في الدم(55). او بسبب موت الخلايا نتيجة التعرض للسم كما ذكر[51] عن معاملة الفئران بسم الـ T-2 وكانت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه(4). عند معاملة الجرذان بسم الـ FB1 كما قلت نسبة الخلايا اللمفية عند معاملة أصبعيات الأسماك بسم الـ FB1 من قبل(42) وبين حصول تغاير واختلاف في النسب بحسب الجرعة ومدة التعرض.



شكل 3: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الخلايا اللمفية لذكور الجرذ الأبيض.

4. قياس الهيموغلوبين (Hb)

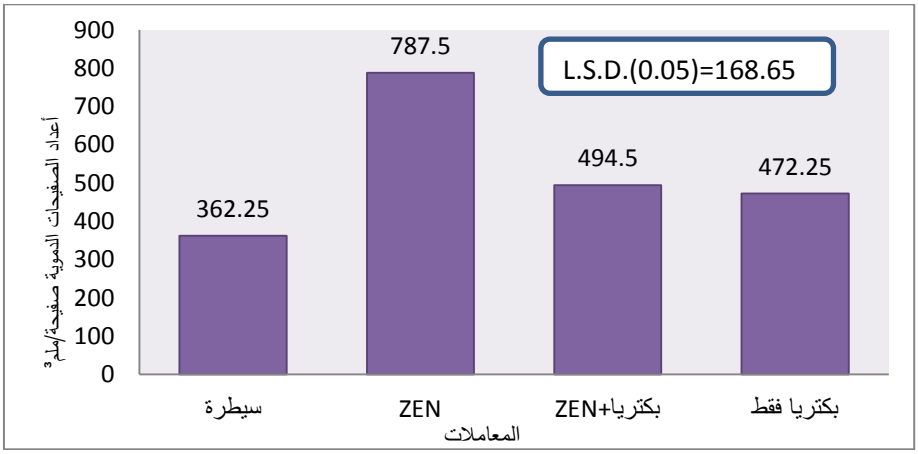
أظهرت نتائج المعاملات المختلفة انخفاض كمية هيموغلوبين الدم في معاملة السم اذ بلغت 8.5 غم.100 مل$^{-1}$ وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة و التي كانت 13.18 غم.100مل$^{-1}$ و كان دور البكتريا مع السم دور ايجابي في رفع مستوى هيموغلوبين الدم اذ بلغت 14.06غم.100 مل$^{-1}$ ولم تختلف معاملة البكتريا فقط عن معاملة السيطرة اذ بلغت 13.25 غم.100مل$^{-1}$ شكل(4). وسبب الإنخفاض في كمية الهيموغلوبين في معاملة سم الزيرالينون قد يعود الى ارتباط السم مع بروتينات الدم المسؤولة عن تخليق الهيموغلوبين(Hb) مثل الألبومين التي وظيفتها تخليق كريات الدم الحمراء وبالتالي قلة كميتها في الدم، التي تؤدي الى الإخلال بمكونات الدم وانخفاض نسبة الهيموغلوبين وحصول فقر الدم(35) وذكر(2) سبب نقص كمية الهيموغلوبين نتيجة ضرر الأكسدة بسبب نشاط السموم الفطرية والتي أدت الى زيادة معدل اكسدة الاوكسجين في الهيموغلوبين بالإضافة الى إنحلال الدم. كما ان منتجات الايض الفطرية ترتبط مع بروتينات جدار الخلية وبالتالي التأثير على امدادات الطاقة(ATP) لخلايا الدم الحمراء، كما انها تعمل على نقل السكريات الى الخلايا والتي تؤدي بالنهاية الى قصر عمر الخلية وموتها(15). وكانت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه(5 ،7 ،8 و22).



شكل 4: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية هيموغلوبين الدم لذكور الجرذ الأبيض.

5. اعداد الصفيحات الدموية platelets

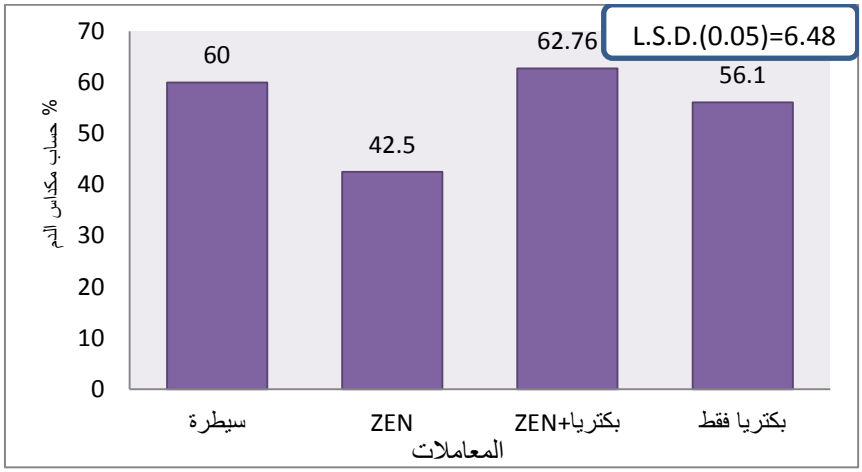
تسبب سم الزيرالينون في رفع اعداد الصفيحات الدموية في دم الحيونات المختبرية المعاملة بهذا السم اذ بلغت 10^3x787.5 صفيحة.مل$^{-1}$ بينما كانت أعدادها في معاملة السيطرة 10^3x362.25 صفيحة.مل$^{-1}$ اما معاملات البكتريا مع سم الزيرالينون فقد انخفضت فيها اعداد الصفيحات الدموية معنوياً عن معاملة السم اذ بلغت 494.5×10^{-1} صفيحة.مل$^{-1}$ شكل (5) وتقاربت هذه النتائج مع ما ذكره (4) اذ كانت اعداد الصفيحات الدموية في معاملة سم الـFB1 1194.5 ×10^{-1} صفيحة.مل$^{-1}$ بينما كانت في معاملة السيطرة 10^3x422.5 صفيحة.مل$^{-1}$ وقد رجح سبب الزيادة الحاصلة الى حالات النزيف الحاصلة في الأنسجة بسبب تأثير السم والذي يعد من اسباب تحفيز وزيادة اعداد الصفائح الدموية. وكانت النتيجة مقاربة لما توصل اليه (5) عند معاملة الجرذان بسم الزيرالينون حيث كانت نسبة معاملة السم 10^3X1400 صفيحة.مل$^{-1}$ ومعاملة السيطرة 10^3X883 صفيحة.مل$^{-1}$.



شكل 5: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في معدل أعداد الصفيحات الدموية لذكور الجرذ الأبيض.

6. حساب مكداس الدم (PCV)(HTC)

أثر سم الزيرالينون سلباً في حجم الخلايا المرصوصة(PCV) في دم الحيوانات المعاملة بسم الزيرالينون فقط اذ انخفض الحجم الى42.5% في حين كان في دم حيوانات السيطرة (لم تعامل بالسم)60%اما معاملة الكتريا مع السم فقد بلغت 62.76% شكل(6) وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه(22،7) اذ وجدوا انخفاض مكداس الدم عند معاملة الجرذان بسم الزيرالينون وان سبب النقص يكون طردياً مع كريات الدم الحمر والهيموغلوبين او بسبب تثبيط السم لأنزيمات التخليق الحيوي للهيموغلوبين أو بسبب تدمير اماكن تصنيع كريات الدم الحمراء في الأعضاء المكونة للدم(33،9).



شكل 6: تأثير بكتريا *L.plantarum* وتداخلها مع سم الزيرالينون في كمية مكداس الدم لذكور الجرذ الأبيض.

References:

1. **Abbas, H.K.; Mirocha, C.J. and Thomas, S.(1984)** Mycotoxin produced from fungi isolated from foodstuff and rat feeding test . *Applied And environ Microbiol*, 48: 654-661.
2. **Abdel-Wahhab K. G.; Mannaa, F. A. and Abdel-Wahhab, M.A.(2014)** Panax ginseng C.A. Meyer Extract Protects Rat Erythrocyte from the Oxidative Damage Induced by the Synergistic Effects of Subchronic Treatment with Aflatoxin B1 and Fumonisin. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 4(9): 1883-1901.
3. **Ahmad,Y.; Hameed, A.; Aslam, M. and Ghaffar,A . (1997)** Estimation of yield losses in corn due to stalk rot pathogens. *Journal Botany*, 29(2): 229-234.
4. **Al-Hashemi, H.A.A. (2014)** Bioremediation for Aflatoxin B1 ana bifenthrin pesticide by Using Some Species of Bacteria. A thesis The college of education for pure science,Biology. University of karbala, 169pp.
5. **Ali, S. A.;Ibrahim, H. J.; Ali,M. N.; Ali, K. M.;Shahad,H. H.; Rusul,N.K.; Zahraa, J. R. and Meyameen,H. M. (2015)** Bioremediation of Zearalenone by using *Lactobacillus acidophilus* in albino rats bodies (*in vivo*). *Applied Medical Science*, 1(1): 21-25.
6. **AL-Kaise, E.A.A.(2010)** Using of some powder and chemical plants and Biological agents to reduce of feeds contamination with zearalenone toxin and AflatoxinB1 in Quail birds. Master of Science. Plant protection. college of Agriculture. University of Baghdad, 109pp.
7. **Al-Khafaji, M.F.H.(2014)** The Investigation of Zearalenone toxin in some strategically grains varities and posibility of Biorredation its. Master of Science. The college of education for pure science,Biology. University of karbala, 92pp.
8. **AL-Saadi, T.A.S.J.(2014)** Integrated Control of Fungi *A.niger* and *A.parasitcus* producing mycotoxins and contaminated apples and pears. Master of Science. Plant protection. college of Agriculture. University of karbala, 117 pp.

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

10. Bennett, J.W.;Klich,M.(2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*,16: 497-516.

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

12. Blanc, P. J.; Loret, M. O. and Goma, G. (1995) Production of citrinin by various species ofMonascus. Biotechnology Letters, 17(3), 291-294.

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

14. Christensen, K.R. (1966) Stalk rot of corn. Monogr.No.3. American Phytopathological . Society.St. paul. Mn, 59 pp.

15. Clohrty, E.K.;Livine, K.B. and Carruthers, A.(2001) The Red Blood Cell glucose transporter presents multiple, nucleotide sensitive sugar exit sites. *Biochemistry*, 40: 15549-15561.

16. Collee, J.G.; Fraser, A.G.; Marmion, B.P. and Simmons, A.(1996) Practical Medical Microbiology. Mackie and Macarthey pearson professional limited. 14th ed.

17. Diaz,R.J; Sanchez,R.M.R.;Desmazeaud, M.; Barba,J.L.R. and Piard,J.C. (1993) Plantaricins S and T,Two New Bacteriocins Produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 Isolated from a Green Olive Fermentation. *Applied and Environ Micro*biology, 59(5):1416-1424.

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

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

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

21. El-Nezami, H.; MYKKÄNEN, H.; KANKAANPÄÄ, P.; Salminen, S. and Ahokas, J. (2000). Ability of Lactobacillus and Propionibacterium strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of food protection*, *63*(4), 549-552.

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

23. **EL-Warshan, S.H.S.(1999)** Using of some chemical absorption to reduce of feed domestica contamination with Aflatoxin. Master of Science. Plant protection. college of Agriculture. University of Baghdad, 89pp.
24. **F.A.O.(2004).World Wide regulation for mycotoxin. (2003)**. Acompendium fao food and nutrition paper. Rome, Italy. Cited from (EFSA, 2004) .
25. **Fandohan, P., K. Hell, W. F. O. Marasas, and M.J.Wingfield.(2003**). Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in africa. African *Journal Biotechnochol*, 2(12): 570-579.
26. **Forbes, B.A.; D.F. Sahm and A.S. Weissfeld.(2007).** Baily and Scott's Diagnosis Microbiology. 12th ed. Mosby Elsevier company, USA.
27. **Fuchs, S.; Sontag, G.;Stidl, R.; Ehrlich, V.; Kundi, M. and Knasmu,S. (2008)** Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4) : 1398-1407.
28. **Govindasamy,T.; Vidya, S.; Vinola, J.S.; Babu, V.; Shanthi, V.; Kathiresan, k (2014)** Identification of Lactobacilli Isolated from Mangrove Biotopes of East Coast of India, 2(2): 33-37.
29. **Hawar, S.; Vevers, W.;Kanieb, S.; Ali, B. K ;Billington, R. and Beal, J. (2013)** Biotransformation of patulin to hydroscladiol by *Lactobacillus plantarum. Food Control*, 34(2) : 502-508.
30. **Holt,J.G.;Krieg, N.R.;Staley, J.T. and Williams,S.T.(1994).** Bergeys manual of determinative acteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Baltimors. Maryland. USA, 787 pp.
31. **Ishii, K.; Sawano, M.; Ueno, Y. and Tsnnoda, H.(1974).** Distribution of zearalenone-producing *Fusarium* spp. In Japan. *Applied Microbiol*, 27: 625-628.
32. **Jawetz, E.; Melink, J.L; Adeberg, E.A.; Book, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2004)** Medical Microbiology 24 th. ed. Appleten and lang New York. Connectical, 45-60pp.
33. **Jenkins,F. and Smith,J.(2003**) Effect of sublethal concentrations of endosulfan on hematological and serum biochemical parameters in the carp, Cyprinus carpio. Bulletin Environ Contamination *Toxicol*ogy, 70: 947-993.
34. **Khanafari, A.; Soudi, H.; Miraboulfathi, M., and Karamei Osboo, R. (2007)** An *in vitro* investigation of aflatoxin B1 *biological Sciences*, 10(15): 2553-2556.
35. **Kubena, L.F.; Harvey, R.B.; Corrier, D.E. and Huff, W.E.(1987)** Effects of feeding deoxynivalenol(DON,vomitoxin)-contaminated wheat to female white leghorn chickens from day old through egg production. *Poultry Science*, 66(10): 1612-1618. doi: http://dx.doi.org/10.3382/ps.0661612 PMID:3432188 .
36. **Kuiper-Goodman, T.; Scott, P.M. and Watanabe,H.Risk .(1987)** assessment of the mycotoxin zearalenone. Regulatory *Toxicology Pharmacol*ogy, 7: 253-306 .

37. **Lacey, J.;Bateman, G.L. and Mirocha, G.J.(1999)** Effects of infection time and moisture on development of ear blight and Deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. In wheat. *Anneal Applied Biotechnechol*, 134: 277-281 .
38. **Lanza, G.M. ; wash burn, W.and Wxatt, R.D.(1980)** Stroin Variation in Hematological response science. *biological Sciences*, 9(5): 2686-2691.
39. **Lortal, F.; Valence, C. ; Bizet, J. and Maubois,L. (1997)** Electrophoretic pattern of peptidoglycan hydrolases, a new tool for bacterial species identification: Application to 10 *Lactobacillus* species. *Research Microbiology*, 148(6): 461-474 .
40. **Macfaddin, J.F.(2000)** Biochemical tests for identification of medical bacteria.(3 rd.ed.). Williams and Willkins CO.USA. 912 pp.
41. **Mahfouz ,M.; Sherif,E.; Ahmed H.(2015)** A multiparameter investigation into adverse effects of aflatoxin on Oreochromis niloticus health status .*The Journal of Basic & Applied Zoology* , 71: 48-59.
42. **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, humoral and cellular immune responses in wealing piglets exposed to low doses of aflatoxin . *Journal Animal Science*, 80: 1250-1257.
43. **Mirocha,C.J.;Pathre,S.V.;Sachauerhamer,B.and Christensen,C. M.(1976)** Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feed stuffs. *Applied Environ Microbiol* , 32:533-545.
44. **Nour,M.(1998)**16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence,secondary structure and comparative analysis. *Research Microbiol*, 149: 433-448.
45. **Orris, J.R.R.; Berkeleg, C.W.; Logan, N.A. and Donnel, A. G. (1981**) The general *Bacillus* and *Lactobacillus* in the prokaryotes starr M.P, stop J. Tuber HG Balows A. And schelgel, HG eds springer verlag co. Berlin Heidelbrg. New York, 2: 1772-1774.
46. **Palumbo, J.,D.; Teresa,L.; O'Keeffe, L. ; and Abbas, H.,K.(2007)** Isolation of Whitlow, L.W., and W.M.Hager.1999.Research presented at the 36th Florida Dairy Production Conference. May(4-5)1999.
47. **Pieridis, M.; El-Nezami, H.; Peltonen, K.; Salminen, S. and Ahokas, J.T. (2000)** Ability of dairy strains lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal Food Protection*, 63: 645-650.
48. **Scott, P.M.; Lau, P.Y. and Kanhere, S.R.(1981)** Gas Chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of Deoxynivalenol in wheat and other grains. *Journal Association* of *Official Analytical Chemistry*, 64: 1364-1371.
49. **Seifert, K.(1996)** Fus key (*Fusarium* interactive key) Agriculture and Agrifood Canada Cat.No.A42-66/1996E-IN, ISBN 0-662-24111-8.

50. Sezer, G.; Abamuslum, G.;Nebahat, B.O. and Leyla, V.(2013) Detoxification of aflatoxin B1 by bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *Turkish Journal of veterinary and Animal Sciences*, 37: 594-601.

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

52. Slomy, A.K. (2007) The Detection of Zearalenone Toxin in Maize and its Detoxification. Master of Science. Plant protection. College of Agriculture. University of Baghdad . 84pp.

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

54. Tamura,M.; **Mochizuki, N. ; Nagatoni, Y. ; Harayama, K.; Toriba, A. and Hayakawa, K. (2015)** A Method for Simultaneous Determination of 20 *Fusarium* Toxins in Cereals by High-Resolution Liquid Chromatography - Orbitrap Mass Spectrometry with a Pentafluorophyenyl Column. *Journal Toxins*, 7:1664-1682.

55. 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 Univercity Veteriner Fakultesi Dergisi*,16(2): 337-341.

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

57. Whitlow, L. W. and W. M. Hager .(1999) Research presented at the 36th Florida Dairy Production Conference. May(4-5)1999.

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

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

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

61. Zinedine, A.; Faid, M. and Benlemlih, M.(2005) *In vitro* reduction of aflatoxin B1by strains of lactic acid bacteria isolated frommoro can sourdough bread. *International Journal of Agriculture & Biology*, 7(1): 67-70.

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