International Journal of Innovation and Applied Studies
ISSN 2028-9324 Vol. 25 No. 4 Mar. 2019, pp. 1225-1234
© 2019 Innovative Space of Scientific Research Journals
http://www.ijias.issr-journals.org/

تقييم كفاءة المنتوج الحيوي المنتوج العراقي وخميرة بولاردي في ازالة السم الفطري الزيرالينون داخل جسم الكائن الحي

[Evaluation the efficiency of Probiotic Iraqi Product and Saccharomyces boulardii in Detoxification of Zearalenone In vivo]

شذى علي شفيق، مشتاق طالب كريم

الجامعه المستنصرية-كلية العلوم / قسم علوم الحياة- بغداد- العراق

Shatha Ali Shafiq and Mushaq Talib Kareem

Mustansiriyah University, College of Science, Department of Biology, Baghdad, Iraq

Copyright © 2019 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the ***Creative Commons Attribution License***, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The present study was conducted to investigate the biological degradation of Zearalenone using by Iraqi probiotic 2% (w/v) and yeast filtrate of Saccharomyces boulardii using one of the mammalian system (white mouse) which had an active influence in removing or reduction of toxic effects of mycotoxin Zearalenone on liver and kidney tissues of males white mice that extracted from fungal isolate Fusarium graminearum produced Zearalenone at concentration (2 mg / kg body weight) . As observed a clear improvement in liver and kidney tissues for group of mice that fed contaminated diet by Fusarium graminearum produced Zearalenone with Iraqi probiotic and yeast filtrate compared with positive control (group of mice fed contaminated diet by Fusarium graminearum produced Zearalenone) that caused the histological changes in liver and kidney tissues, which represented by congestion vascular with necrosis and degeneration in hepatic cells in addition to reduction in glycoprotein granules. While, the histological changes in kidney tissue included congestion vascular and degeneration in distal and proximal tubules.

The results of liver enzymes showed significant differences in positive group for three enzymes ALS , ALT and ALP reached (15.66, 14.66, 25.66) IU/ L respectively, compared with negative control (group of mice did not fed contaminated diet by Fusarium graminearum produced Zearalenone) which reached for three enzymes ALS , ALT and ALP (15.66,22.00,13.33) IU/ L respectively. However, the results of the interaction between mice fed contaminated diet by Fusarium graminearum produced Zearalenone with Iraqi probiotic and yeast filtrate were shown significant increasing for ALS, ALT, ALP enzymes in addition to urea concentrations in kidney tissue compared with positive control.

KEYWORDS: *Saccharomyces boulardii*, Detoxification, Zearalenone, Iraqi probiotic product.

ملخص: هدفت الدراسة الحالية دراسة التحطيم الاحيائي لسم الزيرالينون بواسطة المعزز الحيوي المنتتوج العراقي بتركيز (2%) وزن/حجم وراشح خميرة بولاردي داخل جسم الكائن الحي باستخدام احد انظمة اللبائن (الفأر الابيض) واللذان كان لهما الاثر الفـــعال والمعـــنوي في ازالة او اختزال التاثيرا السمية لسم الزيرالينون في نسيجي الكبد والكلى، اذ لوحـــظ تحسن واضح في خـــلايا نسيج الكبد والكلى لمجموعة الفئران التي تم تغذيتـــها عـــلى العـــليقة المـــلوثة بالفـــطر فيوزاريوم جرامينياريوم المنتج لسم الزيرالينون وبتركيز(2)ملغم/كغم مع المعزز الحيوي وراشح الخميرة مقارنة مع ما احـــدثته السيطرة الموجبة والمتمثلة بمجموعة الفئران التي تغذ على العليقة الملوثة بفـــطر فيوزاريوم جرامينياريوم المنتج لسم الزيرالينون من تغيرا نسيجية في نسيجي الكبد والكلى تمـــثلت باحتقان في الاوعية الدموية مع تنخر وتنكس في الخلايا الكـــبدية وقلة حبيـــبا الكلايكوبروتين، بينما تضمنت التغيرا النسيجية في نسيج الكلى باحـــتقان دموي في الاوعية الدموية مع وجود تنكسا في الخلايا المبطنة الدانية والقاصـــية .

كما هر نتائج التحليل الاحصائي لانزيما الكبد في معاملة السيطرة الموجبة فروقا معنوية واضحة عند مستوى احتمالية (P<0.01) بلغت قيـــم الفعالية النوعية للانزيما AST (Aspartate Aminotransferase) وALT(Alanine Aminotransferase) و ALP (Alkaline Phosphatase) (25.66,14.66,15.66) وحـــدة دولية لكل لـــترعلى الترتيب مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة (مجموعة الفئران التي تغذ على عليـــقة غير ملوثة بالفـــطر

Corresponding Author: شذى علي شفيق

فيوزاريوم جرامينياريوم المنتج لـــسم الزيرالينون) اذ بلغت قيـــم الفعالية للانزيما الثلاثة (13.33,22.00,15.66) وحـــدة دولية لكل لـــتر على الترتيب،و بينت نتائج تداخل تغذية ذكور الفئران لعــليقة ملوثة بفطر *فيوزاريوم جرامينياريوم* المنتجة لسم الزيرالينون مع المعزز الحيوي وراشح خميرة بولاردي زيادة معنوية في قيم الفـــعالية النوعية لانـــزيما الكبد الثـــلاثة في مجانس نسيج الكبد وقـــيمة تركـــيز اليـــوريا في مجانس نسيج الكلى مقارنة مع معاملة السيطرة الموجبة.

كلمات دلالية: خميرة بولاردي، إزالة السموم، زيرالينون، منتج بروبيوتيك عراقي.

المقدمة

من اهم مشاكل انتاج محاصيل الحبوب في العالم و التي تستخدم كغذاء مباشر للأنسان او علف لحيواناته هي تعرضها للأصابه بالفطريات حيث تعد محاصيل الحنطه ، الشعير ، الذره و فول الصويا وسطا مثاليا لنمو الفطريات (Bunnet and klich،2003) .تهاجم الفطريات النباتات في الحقل او اثناء فتره الخزن ، بعض هذه الممرضات تنتج سموم فطريه Mycotoxins و هي متأيضات ثانويه (secondary metabolites) تنتجها الفطريات لا تستخدم في بناء جسم الفطر اذ يتم انتاجها من قبل الفطر لاسباب غير معروفه تماما (Rechard،2000) تنتج هذه السموم تحت ظروف ملائمه من قبل بعض الفطريات الخيطيه التابعه لأجناس *Fusarium* spp و *Aspergilllus* spp. و *Pencillium* spp. و *Alternaria* و *Stachybotrys* (Trung،2008) ورغم ان عدد السموم الفطرية المشخصة في الوقت الحاضر تتجاوز الخمسمائه نوع (اسماعيل ، 2014) غير ان سموم الافلاتوكسينات Aflatoxins والفيومونيزينات Fumonisins والترايكوثسينات Trichothecens ومن ضمنها الزيرالينون ، تمثل اكثر السموم الفطرية خطوره وانتشارا بتاثيراتها البايولوجية في الانسان والحيوانات . الزيرالينون هو سم استروجيني Estrogenic Toxin غير ستروييدي وزنه الجزيئي 318.36 دالتون يتم تخليقه حيويا عن طريق مسار Polyketide Pathway و ينتج من قبل بعض انواع من جنس *Fusarium* التي تلوث الذرة والقمح والشعير والشوفان وغيرها من الحبوب،مثل *Fusarium cerealis*، *F.culmorum* و *F.equiseti* و *F.graminearum* و طوره الجنسي *(Gibberella zeae)* و *F.semitectum* . والزيرالينون مجموعة تضم عدد من مشتقاته اهمها α-Zearalenol و ß-Zearalenol وقد ثبت انه مسرطن Carcinogenic ومسؤول عن تورم الاعضاء التناسلية Estrogenism والعقم Infertility ويؤثر سلبا في هرمونات الغدة النخامية (FSH و LH) في اللبائن، ويسبب ضعفا للمقاومة ضد الامراض، و يؤدي الى تشوهات خلقية بالاجنة و حالات اجهاض ومما يزيد من خطورته امكانية انتقاله عبر حليب الماشية، مما دفع دولاً من اوربا وامريكا اللاتينية واسيا وافريقيا الى وضع حدود سماح لسم الزيرالينون تتراوح من 50 – 1000 مايكروغرام / كغم في الذرة الصفراء والحبوب الاخرى كما امكن تواجد سم الزيرالينون في المياه السطحية والجوفية مسببا مخاطر على البيئة والصحة (Gromadzka *et al.*،2012).

يسبب سم الزيرالينون الكثير من الاضطرابات في الجهاز التناسلي والهضمي للحيوانات (Zindine *et al.*،2007) .كما يسبب سم الزيرالينون عدة اختلافات في الفحوصات البايوكيميائية والنسيجية عند تجريعه للفئران والتي تقود الى سمية الكبد والتقليل من عملية تخثر الدم (Maaroufi *et al.*،1996) ويسبب سم الزيرالينون ارتشاح لمفاوي وتنخر وتقرحات في خلايا نسيجي الكبد والكلية عند تجريعه للفئران (Abbes *et al.*،2006).

ونظرا للتركيب الكيميائي الاستروجيني لسم الزيرالينون فان له القدرة على الارتباط مع مستقبلات هرمون الاستروجين Estrogine Receptor (ER) مما يؤدي الى تحوير في التعبير الجيني للهرمون (Jakimiuk *et al.*،2009).ان الية تاثير سم الزيرالينون غير معروفة بصورة كاملة الى حد ما،لكنه اعتبر مؤخرا من السموم الفطرية عالية التاكسد (El Golli-Bennour & Bacha،2012).وعلى الرغم من توصيات المنظمات الزراعية، لتقليل من مستويات السموم الفطرية خلال نمو المحاصيل ، الحصاد والخزن، إلا أن مشكلة تلوثها ما زالت قائمة، لذلك أجريت العديد من الدراسات لإزالة السموم الفطرية(Detoxification)أوتثبيطها(Inactivation) أو تحطيمها (Degradation) باستخدام طرائق كيميائية وفيزيائية وإحيائية).

ولندرة الدراسات حول هذا السم وامكانية ازالة سميته احيائيا باستخدام مجموعة من الاحياء المجهرية بحيث تكون مفيدة للكائن الحي المعتمد عليه في الدراسة الحالية باستخدام احد انظمة اللبائن (نظام الفار الابيض).

المواد وطرائق العمل

الاحياء المجهرية المستخدمة

الفطر *FUSARIUM GRAMINEARUM*

تم الحصول على عزلة منتجة لسم الزيرالينون المعزولة من عليقة الدواجن،من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية،زرعت في اطباق بتري معقمة حاوية على اكار مستخلص البطاطا والدكستروز(PDA)مع اضافة المضاد الحيوي كلورامفينيكول 100مايكروغرام/لتر لمنع نمو البكتريا.حضنت الاطباق في درجة حرارة 25±2م° لمدة (4-5)ايام،بعد انتهاء مدة الحضن تم التاكد من تشخيصها. وبالاعتماد على المفاتيح التصنيفيه للفطريات Booth ، Booth، 1977 ; ، 1997) من خلال تنميتها على الوسط الزرعي Potato Dextrose Agar (PDA) لمده 5- 7 ايام وبالاعتماد على الفحص الزرعي المتمثل بلون المستعمره مستعمرات قطنيه بيضاء على السطح العلوي للطبق وذات لون اصفر فاتح على السطح السفلي للطبق وافرازها لصبغه ورديه اللون ، مجهريا من خلال ملاحظه الكونيدات الكبيرة Macroconidia الهلالية .

تم تاكيد عن قابليه هذه العزلة على انتاج سم الزيرالينون بتنميتها على وسط مستخلص الخميره و السكروز Yeast Extract Sucrose(YES) (20 غم مستخلص الخميره و 200 غم سكروز للتر الواحد ووضع المستخلص المجهز في دوارق زجاجية سعة 250 مل بواقع 100 مل لكل دورق و بعدها عقمت الدوارق في جهاز الموصده بدرجة حرارة 120 م و ضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 20 دقيقه ثم لقحت الدوارق بالعزلة النقيه باستعمال ثاقب فليني بقطر 7 ملم و بواقع ثلاث مكررات و حضنت الدوارق في درجة حرارة 25 ± 2 م لمدة اسبوعين في حاضنه هزازه (Stsncic *et al.*،2009) . اجريت عملية استخلاص سم الزيرالينون من الوسط الغذائي السائل YES اعتمادا على الطريقه الموصوفه من قبل (Liao *et al.*، 2009) مع اجراء بعض التحويرات من قبلنا لغرض فصل السم الفطري (الزيرالينون) من مزارعها على وسط YES على النحو التالي :

- رشحت المزارع الفطريه لفصل الكتله الحيويه للنمو الفطري عن راشح مزارع الفطر باستخدام ورقة ترشيح Whatmman No:1 و قمع بخنر
- وزع الراشح لكل عينه عى ثلاث دوارق زجاجيه سعة 50مل و حفظت بدرجة حراره 4 م° لحين اجراء الكشف او استخدامه مباشرة لغرض اجراء الكشف عن السم باستخدام جهاز HPLC.
- اضيف 1.5 مل من الراشح الفطري في 7.5 مل من محلول الاستخلاص (10مل ماء مقطر و 90 مل اسيتونيتريل اي بنسبة 90:10 حجم:حجم).
- نقل الخليط الى انبوبة انتباذ سعة 10مل و اخضعت لعملية النبذ في جهاز النبذ المركزي لمدة 5 دقائق و بسرعة 4000 دورة\دقيقه .
- مرر الرائق عبر اوراق ترشيح Millipore filters بقطر 0.22 مايكرومتر و جمع الناتج في انبوبه صغيره خاصه بجهاز HPLC.
- حقن 0.2 مايكروليتر من الراشح الناتج في جهاز HPLC و المجهز بحاسبة شخصية PC لاستلام النتائج .
- اجريت عملية الفصل بدرجة حراره °25 و بسرعة جريان ثابته مقدارها 0.5 مل/ دقيقه و كشف عن الزيرالينون باستعمال كاشف الاشعه الفوق بنفسجيه و على الطول الموجي مقدار 218 نانومتر. وتم حساب تركيز سم الزيرالينون من خلال مقارنة مساحة المنحنى للعينات مع نظيره في المحلول القياسي و من خلال المعادله التالية:

تركيز النموذج = تركيز المحلول القياسي × $\frac{\text{مساحة النموذج}}{\text{مساحة المحلول القياسي}}$ (EEC ،1992) .

خميرة SACCHAROMYCES BOULARDII

استخدمت خميرة *S.boulardi* كعامل احيائي في ازالة سمية الزيرالينون Detoxifying agent قيد الدراسة،وحصلت على عزلة نقية ومشخصة مسبقا من قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية، تم تنميتها على وسط اكار سابروويد دكستروز (SDA) بدرجة حرار37م° لمدة (48) ساعة.

المعزز الحيوي PROBIOTIC

حصل على المعزز الحيوي العراقي المطروح في الاسواق تحت الاسم التجاري (Iraqi probiotic) المنتج محليا في كلية الزراعة / جامعة بغداد والذي يحوي الغرام الواحد منه على الاحياء المجهرية الاتية

Lactobacillus acidophilus (10^8) وحدة تكوين مستعمرة

Bacillus subtilis (10^9) وحدة تكوين مستعمرة

Lactobacillus spp. (10^8) وحدة تكوين مستعمرة

Saccharomyces cervisiae (10^9) وحدة تكوين مستعمرة

واستخدم المعزز الحيوي كعامل احيائي في ازالة سمية الزيرالينون قيد الدراسة.

الفأر الابيض

استخدم في هذه الدراسة الحيوانات المختبرية وهي ذكور الفئران المختبرية البيض من نوع *Musculus mus* الضرب balb/c وبمعدل اعمار يتراوح بين (6-8) اسابيع وبوزن (20-25) غم والتي جهزت من قبل دائرة الرقابة الدوائية/وزارة الصحة، حيث وزعت على اقفاص لدائنية ووضعت الفئران في درجة حرارة الغرفة -25) (21م° وضوء (12) ساعة وظلام (12) ساعة بهيأة مجاميع وحسب حاجة التجربة وقد تم اعطاء الماء والعليقة المتكاملة والمصنعة محلياً ومكونأتها كألاتي: مجروش الشعير (24.5)%، مجروش الحنطة (30)%، مجروش الذرة الصفراء(22.5)% ، فول الصوديا (15.2)%، ملح الطعام (0.45)%، حجر الكلس (0.2)% وبروتين حيواني (7.15)%. وتم التاكد من خلو العليقة غير ملوثة بأبواغ الفطر المنتج لسم الزيرالينون *Fusarium graminearum* المتمثلة بالسيطرة السالبة مقارنه بالعليقه الملوثة بأبواغ الفطر المنتج لسم الزيرالينون المتمثلة بالسيطرة الموجبه واتبعت طريقة (*Liao et al.*، 2009)

1. طحنت عينات عليقة الفئران جيدا في الخلاط الكهربائي و اخذ 10 غم من المسحوق المطحون و اضيف له 2 غم من كلوريد الكالسيوم KCL
2. تم الاستخلاص باضافة 25 مل من محلول الاستخلاص (حضر 100 مل من المحلول بخلط 10 مل ماء مقطر و 90 مل من الاسيتونايتريل NCN اي بنسبة 90:10 حجم:حجم ووضعت في دورق زجاجي حجم 100مل مع الرج .
3. نقل الخليط الى انبوبة انتباذ سعة 10مل و اخضعت لعملية النبذ في جهاز النبذ المركزي لمدة 5 دقائق و بسرعة 4000 دورة\دقيقه .
4. مرر الرائق عبر مرشح دقيق Millipore filters بقطر 0.22 مايكرومتر و جمع الناتج في انبوبه صغيره خاصه بجهاز HPLC.
5. حقن 0.2 مايكرولتر من الراشح الناتج في جهاز HPLC .
6. اجريت عملية الفصل بدرجة حراره °25 و بسرعة جريان ثابته مقدارها 0.5 مل/دقيقه و كشف عن الزيرالينون باستعمال كاشف الاشعه الفوق بنفسجيه (Ultraviolet (UV و على طول موجي مقدار 218 نانومتر ووقت الاحتجاز RT (Retention Time) 7دقائق و الزمن الكلي للتحليل 20 دقيقه .
7. تم حساب تركيز سم الزيرالينون من خلال مقارنة مساحة المنحنى للعينات مع نظيره في المحلول القياسي و من خلال المعادله التاليه حسب (EEC،1992) :

$$\text{تركيز النموذج} = \text{تركيز المحلول القياسي} \times \frac{\text{مساحة النموذج}}{\text{مساحة المحلول القياسي}} \quad (\text{EEC,1992})$$

ازالة سمية الزيرالينون

استخدم كل من المعزز الحيوي العراقي Iraqi Probiotic بتركيز(2%)وزن/حجم وراشح خميرة *Saccharomyces boulardii* كطرائق احيائية في ازالة سمية الزيرالينون من عليقة ملوثة بعزلة فطرية *Fusarium graminearum* المنتجة لسم الزيرالينون داخل جسم الكائن الحي الفار الابيض،وضمت كل مجموعة خمسة فئران وعلى النحو الاتي:

السيطرة السالبة (ve-). فئران تغذت على عليقة غير ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتج لسم الزيرالينون ولمدة اسبوعين.

السيطرة الموجبة (ve+). فئران تغذت على عليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتج لسم الزيرالينون ولمدة اسبوعين.

المعاملة الاولى. فئران تغذت على عليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتج لسم الزيرالينون مع اضافة المعزز الحيوي العراقي بتركيز (2%) وزن/حجم في ماء الشرب ولمدة اسبوعين.

المعاملة الثانية. فئران تغذت على عليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتج لسم الزيرالينون مع راشح خميرة *Sacchromyces boullardi* ولمدة اسبوعين.

الدراسة النسيجية

شرحت الفئران المختبرية بعد قتل الحيوان بتحطيم الفقرات العنقية Cervical dislocation،وبعد التشريح تمت ملاحظة التغيرات الحاصلة في مظهر مجموعة من الاحشاء الداخلية المتمثلة بالكبد والكلى من حيث التغير في الحجم واللون وثم استأصالهما كلا على حدة ووزنها. وحفظت نماذج الكبد والكلى في محلول الفورمالين الدارئ المتعادل 10% تم بعدها أجراء سلسلة التمريرات باستخدام الكحول الأثيلي والزايلول وشمع البارافين ثم الصب في قوالب شمعية والتقطيع بجهاز المشراح (Microtome) وصبغت الشرائح باستخدام صبغة الآيوسين والهيماتوكسيلينHematoxylin وEosing . وتم بعدها فحص الشرائح بالمجهر الضوئي تحت قوة تكبير X400وتصويرها باستخدام كاميرا المجهر (Pousty & Adibmoradi 2007) .

الفحوصات البايوكيميائية

تحضير مستخلص مجانس الكبد والكلى

بعد تشريح الفئران تم استخراج الكبد والكلى ليحفظ في انابيب حاوية على المحلول الملحي متعادل تركيزه(0.9) % ووضعت الانابيب في المجمدة في درجة حرارة (-20)م° لحين الاستعمال .

تم مجانسة الكبد والكلى باستخدام المجانس الزجاجي Glass Homogenizer على ان تتم هذه العملية والعمليات اللاحقة في وسط بارد وذلك بأستخدام كمية من الثلج للحيلولة دون تلف الانزيمات وذلك بأستخدام محلول منظم (50 mM) ذي pH=8 ونسبة 3:1 (وزن /حجم) . تستمر عملية المجانسة الى ان يصبح مزيجا" متجانسا" ، بعد ذلك تم نقل المجانس النسيجي الى جهاز الطرد المركزي المبرد نوع Hettich ونبذ بسرعة (3700) دورة /دقيقة ولمدة (10) دقائق وعند درجة حرارة (صفر)٥م ، كررت هذه العملية ثلاث مرات وفي كل مرة يهمل الراشح ويؤخذ الراسب ، أضيف الى الراسب (1) مل من محلول دأرئ الفوسفات ونقل الى جهاز الطرد المركزي المبرد ونبذه بسرعة (15000) دورة /دقيقة ولمدة (10)دقائق ثم أخذ الراشح ووضع في أنابيب خاصة وحفظ في المجمدة بدرجة حرارة (-20)٥م لحين أستعماله في قياس فعالية الانزيمات Morten)،(1954.

تقدير انزيمات الكبد

تقدير فعالية انزيم AST

تم تقدير فعالية انزيم الـ AST في مجانس خلايا الكبد بأستخدام الطريقة اللونية Enzymatic Colorimetric من خلال استخدام عدة Kit جاهزة من شركة Randox البريطانية ووفقا" لطريقة (Reitman & Frankel، 1957) وذلك بحساب كمية Oxaloacetate المتحررة من المادة الاساس وعلى وفق التفاعل الاتي -:

$$\text{a - oxogutarate + L-aspartate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{L-gluamte + Oxaloacetate}$$

يتم قراءة طيف الامتصاص عند الطول الموجي (546) نانوميتر بأستخدام جهاز المطياف نوع (Spectromic - 20) .

تقدير فعالية أنزيم ALT

تم تقدير هذا الانزيم في مجانس خلايا الكبد بأستخدام الطريقة اللونية ، وذلك بأستخدام عدة جاهزة من أنتاج شركة Randox البريطانية ووفقا" لطريقة (Reitman & Frankel، 1957) وذلك بحساب كمية Pyruvate المتحررة من المادة الاساس وعلى وفق التفاعل الاتي :-

a- oxogutarate + L-alanine $\xrightarrow{\text{ALT}}$ L-gluamte + Pyruvate

يتم قرأءة طيف الامتصاص عند طول موجي 546 نانوميتر بأستخدام جهاز مطيف نوع (Spectromic - 20)

تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP)

تم تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في مجانس خلايا الكبد باستخدام الطريقة اللونية من خلال استخدام عدة Kit جاهزة من انتاج شركة Bioreievx الفرنسية وطبقا" لطريقة Kind&King)،(1954 وذلك بحساب كمية الفينول المتحررة من المادة الاساس وعلى وفق

التفاعل الاتي:-

Phenyl phosphate $\xrightarrow[\text{pH 10}]{\text{ALP}}$ Phenel + phosphate

وقراءة اللون عند طول موجي قدره510 نانوميتر بأستخدام جهاز مطياف من نوع(Spectromic - 20)

تقدير تركيز الكرياتينين

تم تقدير تركيز الكرياتنين في مستخلص خلايا الكلى للفئران باستخدام عدة جاهزة من شركة (Randox) الانكليزية و بطريقة لونية بقياس طيف امتصاصها عند طول موجي (520) نانوميتر اذ يتفاعل الكرياتنين مع مادة Picrate في الوسط القاعدي لتكوين معقد ملون Cheesbrough)،(1981 .

تقدير تركيز اليوريا

تم قياس تركيز اليوريا في مستخلص خلايا الكلى باستخدام عدة خاصة مجهزة من شركةHuman اذ تمتاز اليوريا بقابليتها على التحلل بالماء وبأنزيم Urease وأنتاج الأمونيا وثنائي أوكسيد الكاربون . تتفاعل الأمونيا مع الهايبوكلورايت Hypochlorite و الSalicylate لتكوين مركب ذي صبغة خضراء عند الطول الموجي (590)نانوميتر.Bolleter *et al* ،(1961).

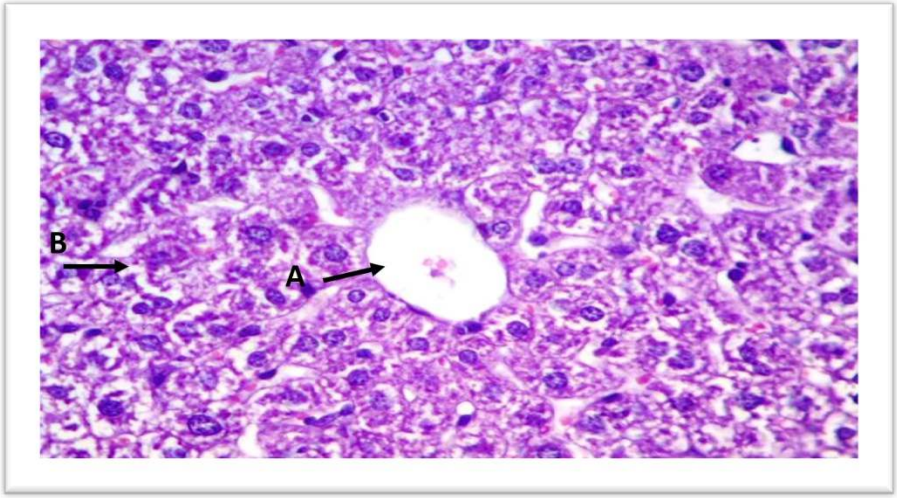
النتائج والمناقشة

تقدير الكمي والنوعي لسم الزيرالينون

اعتمد على جهاز ال HPLC في دائرة البحوث الزراعيه / وزارة العلوم والتكنلوجيه بمواصفاته الشركه Shimizu japan حيث اجريت عملية الفصل بدرجه حرارة 25 م وبسرعة جريان ثابته مقدارها 0.5 مل / دقيقة وكشف عن الزيرالينون باستعمال كاشف الاشعة الفوق بنفسجية Ultra Violet (UV) على ول موجي مقداره 218نانوميتر ووقت الاحتجاز Retention Time RT 7 دقائق ووالزمن الكلي للتحليل 20 دقيقة .بلغ تركيز السم الزيرالينون في العليقه (السـيطره الموجبه) والمقـدرة ب 2 ملغم / كغم باسـتخدام جهاز كروموتـــوغرافي السائل ذو الاداء العـــالي HPLC في تقدير كمية سم الزيرالينون في عزلة الفطر *Fusarium graminearum* المنتجة لسم الزيرالينون ومن خلال المقارنه بين معاملة السيطرة السالبه (التي تمثل فئران تغذت على غذاء غير ملوث بابواغ الفطر المنتج لسم الزيرالينون وتم تاكد من خلو الغذاء من السم باستخدام جهاز HPLC وتعقيمه بالمؤصده لمدة نصف ساعه قبل اعطاءه للفئران .

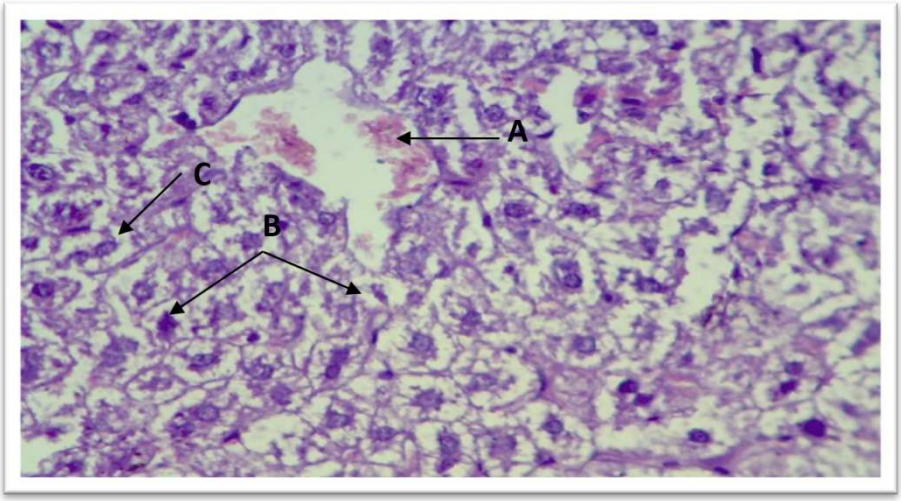
ازالة سمية الزيرالينون

استخدم في هذه الدراسة نوعان من الطرائق الاحيائية في ازالة سمية الزيرالينون داخل جسم الكائن الحي *in vivo*،المعزز الحيوي (Iraqi probiotic) والذي هو عـبارة عن منتوج محلي ذكرت محتوياته في طرائق العمل و راشح خميرة *Saccharomyces boulardii* اذ اظهرت الفحوصات النسيجية لمقاطع نسيجي الكبد والكلى تغيرات واضحة في السيطرة الموجبة المتمثلة (ذكور فئران تغذت على عليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* لمدة اسبوعين) مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة المتمثلة (ذكور فئران تغذت على عليقة غير ملوثة بالفطر *F.graminearum*) . صورة (1) تظهر نسيج الكبد في معاملة السيطرة السالبة مقارنة مع الصورة (2) لنسيج الكبد اذ تظهر تغييرات نسيجيه متمثلة بتنـخر وتنكس ونقصان في الحبيبات البروتينية مع ظهور احتقان دمـوي داخل الوريد الوسطي،بينما اظهرت الصورة (3) نسيج الكلية في معاملة السيطرة السالبة مقارنة مع نسيج الكلية في معاملة السيطرة الموجبة اذ تظهر تغييرات نسيجية واضحه متمثلة بوجود احتقان دموي واسع داخل النبيبات مع وجود تنكس وتنخر في الخلايا اما الكبيبة الكلوية فلم يظهر عليها اي تاثير.



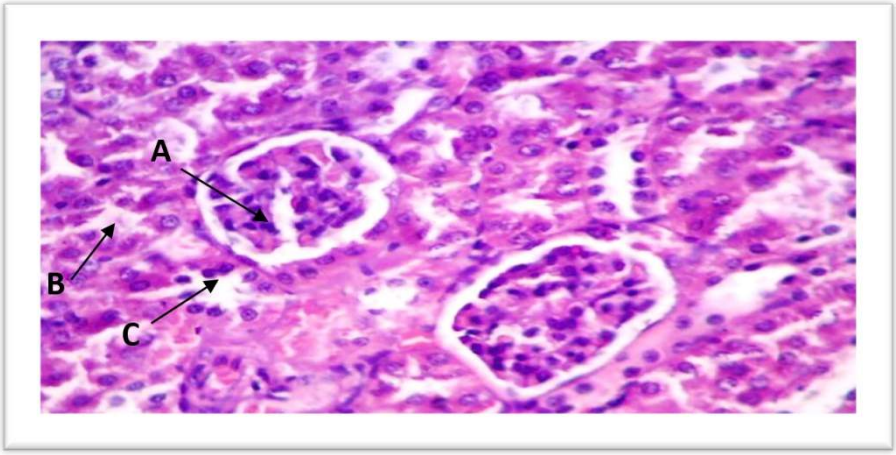
صور(1) نسيج الكبد لمعاملة السيطرة السالبة

A.الوريد الوسطي B.الحبيبات البروتينية



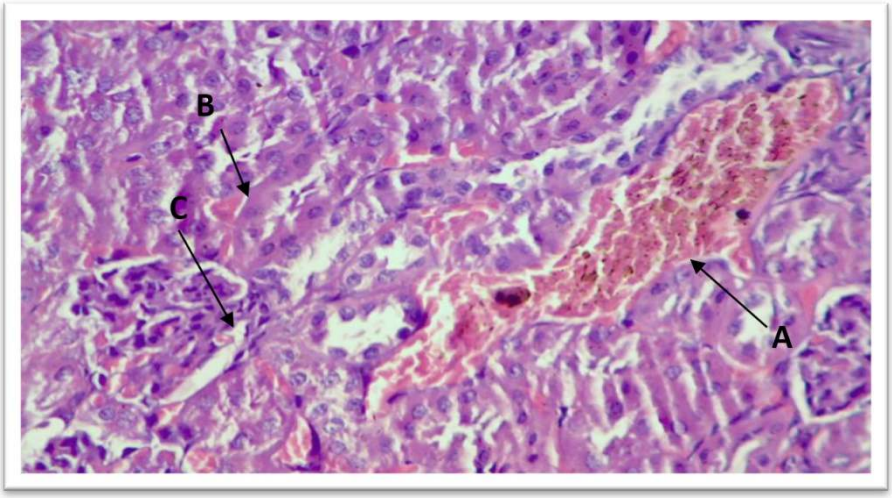
صورة(2) نسيج الكبد لمعاملة السيطرة الموجبة

A . احتقان دموي، B. تنخر في الخلايا ،C .نقص في حبيبات الكلايكوبروتين



صورة (3) نسيج الكلية لمعاملة السيطرة السالبة

A.الكبيبة الكلوية B.الانبوب الكلوي الداني C.الانبوب الكلوي القاصي



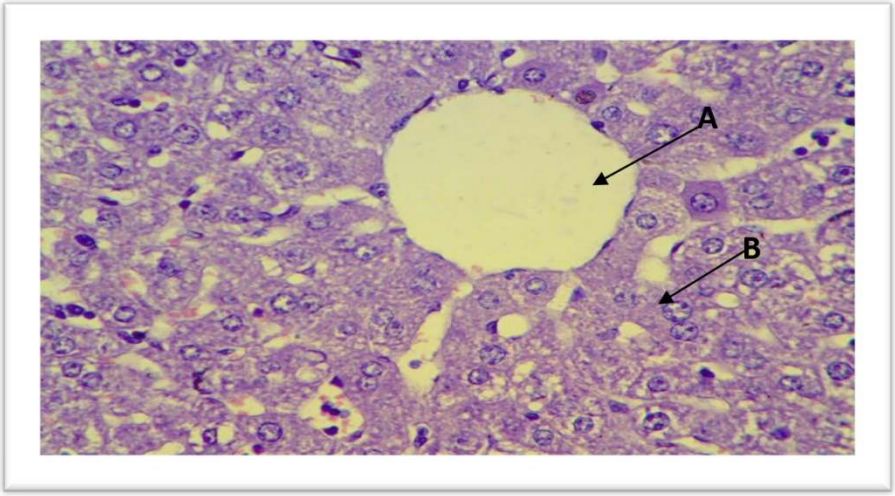
صورة(4) نسيج الكلية لمعاملة السيطرة الموجبة

A. احتقان دموي واسع ، B. تنخر في النبيبات ، C. الكبيبة طبيعية

ان للعليقة الملوثة بفطر *F.graminearum* تاثير فعال وقوي اكثر من سم الزيرالينون وقد يعزى السبب في ذلك كون ان الفطر *F.graminearum* فضلا عن قابليته على انتاج سم الزيرالينون فان له القدرة على انتاج سموم اخرى مثل سموم (DON)DeoxynivalenolوNivalenol و ان لهذه السموم تاثيرات سلبية في انسجة وانزيمات الكائن الحي (Dodman & Blanet،2002)، كما بين Kouadio *et al*. (2013) عند تجريعه لذكور فئران بسمي الزيرالينون و DON وبتركيز(50 و 45) مايكروغرام/كغم على الترتيب الى احداث تاثيرات فعالة وقوية على انزيمات الكبد والكلى اكبر من تاثيرات سم الزيرالينون منفردا.

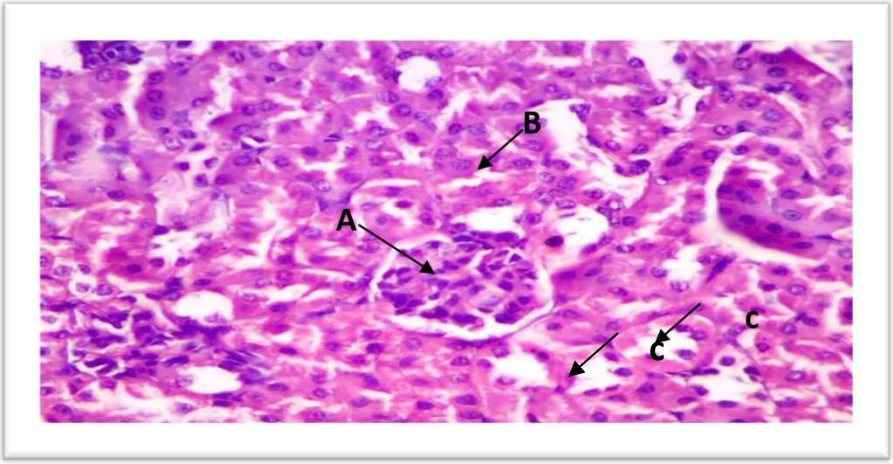
اما نتائج التحليل الاحصائي لانزيمات الكبد في السيطرة الموجبة فقد اظهرت فروقات معنوية واضحة عند مستوى احتمالية (P<0.01)مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة كما هو مبين في الجدول(4.4)،اذ بلغت قيم الفعالية النوعية للانزيمات ASTوALTوALP (15.66،14.66،25.66) وحدة دولية لكل لتر مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة (20.33،22.00،13.33) وحدة دولية لكل لترعلى الترتيب فضلا عن عدم وجود اي فروقات معنوية في تركيز الكرياتينين المستخلص من مجانس الكلية مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة ، اذ بلغت قيمة تركيز الكرياتينين للسيطرة الموجبة (1.93)ملغم/لتر ولمعاملة السيطرة السالبة (2.1)ملغم/لتر، وفيما يخص تقدير تركيز اليوريا المستخلص من مجانس الكلية فقد ظهرت فروقات معنوية،اذ بلغت قيمة تركيز اليوريا للسيطرة الموجبة (22.33)ملغم/لتر مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة والبالغة (27.16)ملغم/لتر.

اظهرت نتائج الفحوصات النسيجية للكبد والكلى لذكور الفئران المتغذية بعليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتجة لسم الزيرالينون مع راشح خميرة *S.boulardii* قدرتها على توفير الحماية الجيدة لنسيجي الكبد والكلى من التغيرات المرضية الحاصلة في تلك الانسجة من جراء سم الزيرالينون، اذ ادت معاملة التداخل بين السم والخميرة دورا كبيرا في تخفيف تلك الاعراض او ازالتها تماما،ان قدرة هذه الخميرة على توفير الحماية لتلك الانسجة غير معروفة بدقة لحد الان وذلك لعدم وجود دراسات مسبقة كما موضح في الصوره (5) و (6).



صورة(5) نسيج الكبد والمعامل براشح الخميرة *S.boulardii*

A.الوريد الوسطي، B.الحبيبات كلايكوبروتين



صورة(6) نسيج الكليه والمعاملة براشح خميرة *S.boulardii*

A. الكبيبة الكلوية ، B. الانبوب الداني ، C. الانبوب القاصي

كما اظهرت نتائج تداخل تغذية ذكور الفئران بعليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتجة لسم الزيرالينون مع راشح خميرة *S.boulardii* زيادة واضحة في انزيمات الكبد والكلية وعدم ظهور اي فروقات معنوية مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة كما هو مبين في الجدول(3).

جدول(3) تركيز انزيمات الكبد واليوريا والكرياتينين في الكلى باستخدام راشح خميرة S.boulardii

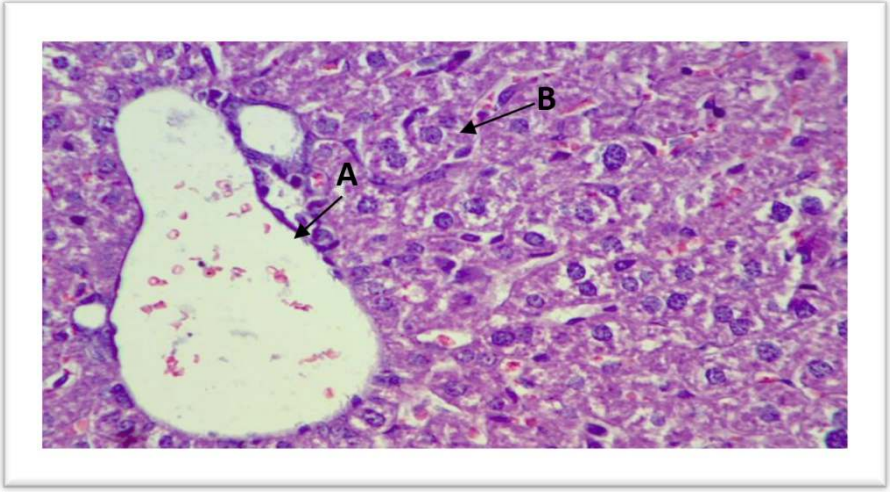
Creatinine	Urea	ALP	ALT	AST	نوع الانزيم / نوع المعامله
0.70	27.16	13.33	22.00	20.33	السيطرة السالبة
0.64	22.33*	25.66*	14.66*	15.66*	السيطرة الموجبة
0.72	25.33	14.33	20.00	19.33	معاملة *S.boulardii*
0.118	3.807	3.175	3.936	3.024	L.S.D

* معنوي عند مستوى احتمالية (P<0.01)

ويمكن تفسير قدرة معاملة راشح خميرة *S.boulardii* المتداخلة مع سم الزيرالينون على تحسين مستوى انسجة وانزيمات الكبد والكلى الى مكونات الخميرة التي تعمل على وقاية الكبد من الاضرار الناتجة عن السموم المايكروبية بصورة عامة والسموم الفطرية بصورة خاصة،كما بين EL-Desoky *et al.*،(2014) ان البيتا كلوكان B-glucan وهو المكون الاساسي لجدار خلية الخميرة مما يسهل من عملية ادمصاص الزيرالينون.

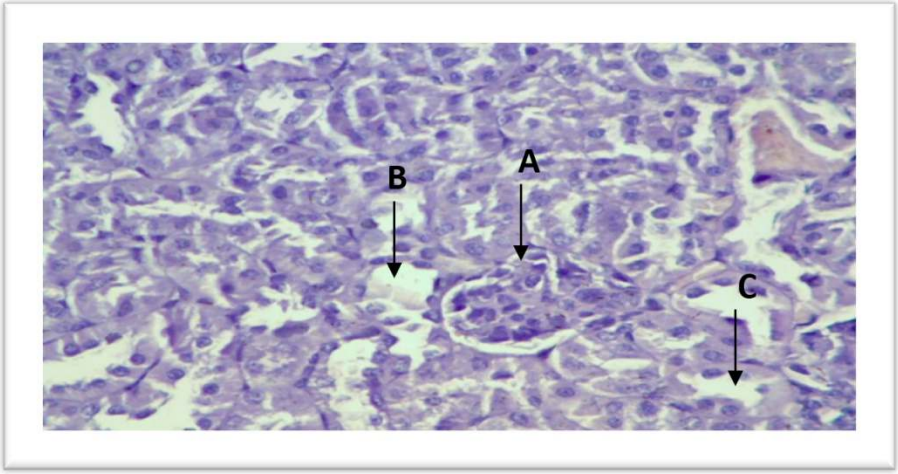
كما بينت دراسات اخرى (Buts *et al.*،2009; Guandalini،2008) ان الية عمل خميرة ال S.*boulardii* كبروبايتك غير معروفة بدقة، ولكنها يمكن ان تحسن قابلية المضيف في تثبيط البكتريا المرضية وكذلك تعزيز الجهاز المناعي، اضافة لما تفرزه هذه الخميرة من انزيمات بروتينية تتضمن انزيم (protease) والذي يعمل على تحطيم سم بكتريا *Clostridium difficile* ، وكذلك انزيم (phosphatase) الذي يعمل على تثبيط نشاط السموم الداخلية (endotoxins) مثل (lipopolysacchride) الذي ينتج من قبل بكتريا E.*coli*.وبين (Hasan *et al.*،(2014 ان لخميرة *S.boulardii* عدة تاثيرات على العوامل المسببة للامراض البكتيريا والحفاظ على سلامة الطبقة المبطنة للامعاء وكذلك لها تاثيرات مضادة للالتهابات وتحسن الاستجابة المناعية للجسم ولها اثار سريرية للوقاية من الاسهال.وفي دراسة اجراها (Vetvicka،(2014 داخل وخارج الجسم الحي بين ان جدار خلية خميرة *Saccharomyces cerevisiae*والمكون من الكلوكان بصورة اساسية،بامكانه امتصاص (50)% من سم الزيرالينون،كما يمنح الكلوكان حماية لنخاع العظم ضد التاثيرات السمية والشعاعية،وان الية عمل الكلوكان غير واضحة بدقة لكنه ممكن ان ينشط الجهاز المناعي المتعرض للسموم بصورة عامة.

اما المعزز الحيوي والذي هو عبارة عن مجموعة من الاحياء المجهرية الحية المفيدة والتي لها تاثيرات جيدة على الكائن الحي من خلال تحسين الفلورا المعوية وتوازنها ، اذ استخدم المعزز الحيوي المنتوج محليا بتركيز(2)% وزن/حجم عند دراسة تداخله مع تغذية الفئران البيضاء بعليقة ملوثة بفطر *F.graminearum* المنتجة لسم الزيرالينون ولمدة اسبوعين . فقد اظهرت الفحوصات النسيجية للكبد والكلى عدم وجود تغيرات نسيجية مؤثرة،وبدت الانسجة سليمة او شبه سليمة مقارنة مع المقاطع النسيجية للكبد في معاملة السيطرة السالبة كما مبين في الصوره (7)والصوره (8).



صورة(7) نسيج الكبد والمعاملة بالمعزز الحيوي

A.الوريد الوسطي ، B. حبيبات الكلايكوبروتين



صورة (8) نسيج الكلية والمعاملة بالمعزز الحيوي

A.الكبيبة الكلوية، B.الانبوب القاصي ، C.الانبوب الداني

كما اظهرت الفحوصات الانزيمية لانزيمات الكبد والكلية عدم ظهور فروقات معنوية مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة كما موضح في الجدول(4).

جدول(4) تركيز انزيمات الكبد واليوريا والكرياتينين في الكلى باستخدام المعزز الحيوي

Creatinine	Urea	ALP	ALT	AST	نوع الانزيم / نوع المعاملة
0.700	27.166	13.333	22.000	20.333	السيطرة السالبة
0.643*	23.666*	25.666*	*14.666	*15.666	السيطرة الموجبة
0.730	25.500	14.666	20.333	19.333	معاملة بالمعزز الحيوي
0.126	2.850	3.024	4.426	1.745	L.S.D

* معنوي عند مستوى احتمالية (P<0.01)

وقد يعزى السبب في قدرة المعزز الحيوي في معالجة التغييرات النسيجية والانزيمية التي يحدثها سم الزيرالينون في انزيمات نسيجي الكبد والكلى الى افرازات الاحياء المجهرية الداخلة في تركيب المعزز الحيوي العراقي من مركبات مثبطة لها القدرة على اختزال او ازالة سم الزيرالينون الذي ينتجه الفطر *F.graminearum* ،كما جائت في دراسة خارج الجسم الحي (Shafiq 2015a)، في قابلية المعزز الحيوي العراقي Iraqi Probiotic على اختزال سم الزيرالينون المنتج من قبل الفطر *F.graminearum* وبنسبة اختزال بلغت (100%) عند التركيزين (1.5،2.0)% وزن/حجم، بالاضافة الى التثبيط التام للنمو الفطري في الوسط السائل YES،بالاضافة

الى التنوع الاحياء المجهرية التي يضمها المعزز الحيوي وتركيز الاحياء المجهرية الموجودة ، وكلما كان هناك تنوع في الاحياء المجهرية وحتى داخل الجنس الواحد سوف يؤدي هذا الى ابراز اكثر لدور المعزز الحيوي ،وهناك دراسات حديثة اشارت الى اهمية استعمال المعزز الحيوي كعوامل احيائية في ازالة او تحطيم السم الفطري افلاتوكسين (الورشان وجماعته،2010) وسم الفطري Patulin (Shafiq،2015b).

المراجع العربية

- اسماعيل ، عدي نجم.2014.السموم الفطرية/النظرية والمفهوم العام. 284 ص.
- الورشان ، سالم حسن. 2006. مقارنة بعض المعززا الحياتية وممتزين في خفض الاثار السلبية للسم افلا B1 وتحسين الاداء الانتاجي لفروج اللحم. اطروحة دكتوراه. كلية الزراعة ، جامعة بغداد.

REFERENCES

[1] Abbe`s, S.; Ouanes, Z., Salah-Abbe`s, J.B; Houas, Z., Oueslati, R.;Bacha, H.and Othman, O. 2006. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by Zearalenone in mice. Toxicolo. 47: 567-574.

[2] Bolleter, W.G.; Bushman, C.J.; and Tidwell, P.W. 1961. Spectrophotometric determination of ammonias lndophenol.Anal.Chem.,33:592-594.

[3] Booth, C., 1971. The Genus Fusarium. New. Surrey, England: commonwealth mycological Institute.

[4] Booth, C. (1977). Fusarium Laboratory Guide to The Identification of The Meijer Species. Common Wealth Mycological Institute, Kew. Surgery, England.

[5] Bunnett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. Clin. Microbiol. Rev 6497– 516.

[6] Buts, J.P. (2009) Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. Dig. Dis. Sci., 54:15–18.

[7] Chessbrough, M. 1981: Medical laboratory manual for tropical countries. (WHO). Geneva : 365-381.

[8] El-Desouky, T.A.; Amer, M. May; Naguib, K. 2014. Effects of pan bread making on Zearalenone levels in artificial contaminated wheat flour, Journal of Agroalimentary Processes and Technologies., 20(3): 269-274.

[9] El Golli-Bennour, E. and Bacha, H. 2012. Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. Toxicology., 287: 1-7.

[10] Gromadzka, K.; Lenc, L.; Sadowski, Cz.; Baturo-Cieśniewska, A.; Chełkowski, J.; Goliński, P.; Bocianowski, J. 2012. Effects of fungicidal protection programs on the development of Fusarium head blight and the accumulation of mycotoxins in winter wheat Cereal., Research Communications., 40: 518–531.

[11] Guandalini, S. 2008. Probiotics for children with diarrhea: an update. J. Clin. Gastroenterol., Vol (42):553-557.

[12] Hasan, M. N.; Sultan M. Z.; and Mar-E-Um, M. 2014.Significance of Fermented Food in Nutrition and Food Science, J. Sci. Res., 6 (2), 373-386.

[13] Jakimiuk, E.; Gajęcka, M., Jana, B.; Brzuzan, P.; Zielonka, Ł.; Skorska-Wyszyńska, E. and Gajęcki, M. 2009. Factors determining sensitivity of prepubertal gilts to hormonal influence of Zearalenone, Pol. J. Vet. Sci., Vol (12): 149-158.

[14] Maaroufi, K.; Chekir, L.; Creppy, E.E.; Ellouz, F. and Bacha, H. 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. Toxicology., 34: 535-540.

[15] Morten, R.K. 1954. The purification of alkaline phosphate of animal tissue, Biochem. J., Vol.(57):595-603.

[16] Pousty, I. and Adibmoradi, M. 2007. Histo technique. 1st(ed.) University of Tahran Press.,5:34-61.

[17] Richard, J.L. (2000). Mycotoxins- An Overview. Romer Labs Guide to Mycotoxins 1:1-48.

[18] Shafiq, Sh.A.2015a.Antagonistic activity of probiotic and sea weed extract against vegetative growth for some fungi and Zearalenone production.,World Journal of Pharmaceutical Research.,4 (1):1577-1585.

[19] Shafiq, Sh.A.2015b. - Using of Iraqi probiotic to detoxify Patulin in albino mice. 2015.International J. Innovation and Applied studies , Vol. 11 No. 2 : pp. 282-290 .

[20] Trung, T.S., C. Tabuc, S. Bailly, A. Querin, P. Guerre and I.D. Bailly. 2008. Fungal mycoflora and contamination of maize from Vietnam with Aflatoxin B1 and Fumonisin B1. World Myco. J., 1(1): 87-94.

[21] Vetvicka V. 2014.Effects of β-glucan on some environmental toxins: An overview. Biomed Pap Med Fac. Univ.P alacky Olomouc Czech Repub. 158(1):1-4.

[22] Zinedine, A.; Soriano, J.M.; Molto, J.C. and Mafres, J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food Chem. Toxicol. 45: 1-18.