

دراسة الفعالية التثبيطية لعزلات بكتريا *Lactobacillus spp.* تجاه الفطريات وسموم الأفلاتوكسين B1

قيثار رشيد مجيد⁽¹⁾ وآمال كاظم غضبان⁽¹⁾ وفالح مهدي صالح^{(1)*}

(1). قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، جامعة البصرة، البصرة، العراق.

(*للمراسلة: د. فالح مهدي صالح. البريد الإلكتروني: husienforever1@gmail.com).

تاريخ القبول: 2017/08/18

تاريخ الاستلام: 2017/07/27

الملخص

أجريت هذه الدراسة في الفترة الواقعة بين شهري نيسان/أبريل من العام 2015 وأب/أغسطس من العام 2016 من أجل دراسة القابلية التثبيطية لبكتريا *Lactobacillus spp.* ضد الفطريات وسموم الأفلاتوكسين مخبرياً باستعمال العزلات المحليّة (AKF1) *L. casei* و (AKF2) *L. plantarum* و (AKF3) *L. casei* و (AKF4) *L. plantarum* و (AKF5) *L. Jonsonii*. بيّنت نتائج التحليل الإحصائي أنّ أعلى نسبة تثبيط عند مستوى احتمالية (P≤0.05) للعزلة AKF4 وذلك باستعمال البكتريا الحية والمقتولة حرارياً ومركباتها الأيضية (97 و 62.33 و 97% على التوالي)، مقارنةً مع العزلة AKF3 التي أعطت أقل نسبة تثبيط للفطريات باستعمال البكتريا الحية والمقتولة حرارياً ومركباتها الأيضية (59 و 14.33 و 59% على التوالي). وتم ربط الأفلاتوكسين مخبرياً من قبل العزلات (AKF1,2,3,4,5) وذلك في الوسط السائل MRS المضاف له سمّ الأفلاتوكسين B1 بتركيز 200 جزء بالبلليون. وجد أنّ أعلى نسبة ربط لسموم الأفلاتوكسين قد وصلت حتى 99.9% للعزلة AKF4 وبتركيز لفاح 1×10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل عندما تكون البكتريا حية ولمدة 48 ساعة. كما أنّ تركيز الخلايا المقتولة حرارياً 500 جزء بالبلليون للعزلات (AKF1,2,5) ولمدة 48 ساعة وعند درجة حرارة 37 °م ورقم هيدروجيني 6.5 أعطى نسبة ربط 100%. في حين AKF4 أعطت فعالية ربط عالية عند التحضين لمدة 24 ساعة و 48 ساعة وتحت الظروف نفسها. أظهرت النتائج كفاءة الربط للخلايا المقتولة حرارياً بنسبة 100%، أمّا خلايا العزلات الحية فكانت نسبة الربط تتراوح بين 99.87 إلى 100% عند الغسل بالماء ومركّب الاسيتونايترل Acetonitrile ومحلّول الفوسفات الملحي الدارر Phosphate buffer saline.

الكلمات المفتاحية: القمح، بكتريا حامض اللاكتيك، ربط الأفلاتوكسين B1، تثبيط نمو الفطريات.

المقدمة

تعدّ الفطريات *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* و *Aspergillus nomius* المسؤول الرئيس عن إفراز الأفلاتوكسين و 19 مركب من المركبات السامة المختلفة الأخرى (IARC, 1993). أوضح (Bennett et al., 2010) أنّ فطر *A. flavus* هو المسؤول الأوّل عن إنتاج الأفلاتوكسين، وهو يتواجد على الأسطح الصلبة والسائلة، وفي ظلّ ظروف الرطوبة المناسبة للنمو. كما أنّه قادرٌ على الانتشار في الهواء ويتزايد في كلّ مكان طالما مصادر الغذاء والمياه مناسبة للنمو. وقد بدأ الإهتمام العالمي بهذه السموم منتصف العام 1960 مع موت حوالي 100.000 ديك رومي في بريطانيا بسبب تلوث الأعلاف بسموم الأفلاتوكسين (Fountain et al., 2014). تعتمد الفطريات *A. flavus* و *A. parasiticus* و *A. carbonarius* على مدّ خيوطها Mycelium داخل الأنسجة النباتية أثناء وبعد الحصاد، ولكونها طفيلية وتسبب الأمراض والسموم لاسيما الفطر *A. flavus* المسؤول الرئيس عن إنتاج الأفلاتوكسين B1 (Shu et al., 2015). تُنتج هذه الفطريات سموم الأفلاتوكسين بصورة أكثر من مرحلة ما بعد الحصاد

بعد انخفاض النشاط المائي وذلك نتيجة التنافس مع باقي الفطريات التي تُصيب المحاصيل (Georgianna and Payne, 2009). الأفلاتوكسينات هي مركبات الأيض الثانويّة الشديدة السميّة والمسرطنة التي تنتجها الفطريات، ويُعدّ التلوّث بالسّموم الفطريّة من المشاكل الخطيرة على مستوى العالم لذلك فإنّ الزراعة الحديثة تدعو إلى نظمٍ حديثة لاستعمالها في إنتاج أعلاف خالية من السّموم الفطريّة (Gerbaldo et al., 2012). يمتاز الأفلاتوكسين بامتلاكه 17 مشابه (أيزومر) منها B1, B2, G1, G2, M1, M2 ويُعدّ الأفلاتوكسين B1 هو الأخطر إذ يُعدّ عامل مسرطن قويّ بالنسبة للأنواع الأخرى، وإنّ الإنتاج الأمثل لهذا السّم يتمّ تحت الظروف المثلى من درجات حرارة ورطوبة في المواد الحاروية على الكربوهيدرات، مثل الفول السوداني والذرة والقمح (Iram et al., 2016). وقد أظهرت الدراسات السابقة أنّ الدواجن حساسة جداً للأفلاتوكسين AFB1 وهذا يُسفر عن خسائر اقتصادية تُقدّر بملايين الدولارات سنويّاً لمربيّ الدواجن، بسبب تأثيرات سموم الأفلاتوكسين المسببة لضعف النمو، وانخفاض إنتاج البيض وزيادة الإصابة بالأمراض وغير ذلك من الآثار الضارة (Wan et al., 2013; Jakhar and Sadana, 2004). وتُقت دراسات مستفيضة أنّ الأفلاتوكسين، لا سيما النوع المتجانس وهو الأفلاتوكسين B1 (AFB1) هو الأقوى، يمكن أن يتأيض داخل الكبد ويسبب سميّة كبدية حادة تُدعى المناعة السميّة، وبالتالي يثبّط المناعة ويحثّ على الطفرات في الحامض النووي DNA (Wogan et al., 2012; Qian et al., 2014). تُعدّ مكافحة الكيمياء الحيويّة للفطريات والسّموم التي تنتجها ذات تأثير في السلامة الصحيّة والبيئيّة، فضلاً عن التكاليف الاقتصادية الكبيرة، مما أدى إلى توجّه إهتمام العالم نحو مكافحة الحيويّة منذ العام 1930 من خلال قدرة بعض الأحياء المجهرية النافعة على تثبيط نمو الفطريات والسّموم المنتجة من قبلها والتي أصبحت في الوقت الحاضر تُستعمل تجارياً. وتشمل الطرائق الحيويّة لتثبيط الأفلاتوكسين، استعمال البكتيريا والخمائر والطحالب والفطريات، فضلاً عن استعمال بكتيريا بروبيوتيك (البكتيريا العلاجية) لامتصاصها السّموم الفطريّة في الجهاز الهضمي قبل أن يتمّ امتصاصها في الأمعاء (Cawoy et al., 2011). تمّ العثور على الكثير من أنواع البكتيريا المثبطة لنمو الفطر *Aspergillus* وإنتاج الأفلاتوكسين، ومن هذه البكتيريا هي *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas spp.* و *Ralstonia spp.* و *Lactobacilli spp.* (Mejía-Teniente et al., 2011; Rajani et al., 2012). ومن التوجّهات الحديثة للتقانات الإحيائية في مجال حفظ الأغذية هي استعمال الخلايا الحية والخلايا المقتولة حراريّاً لبكتيريا حامض اللاكتيك، إذ بيّنت الدراسات أنّ الخلايا المقتولة حراريّاً تفوقت في فعاليتها التثبيطية تجاه الأعفان والسّموم الفطريّة (Oluwafemi and Da-Silva, 2009). وأشار (Tropcheva et al., 2014) الذي شخّص أربع عزلات تعود إلى بكتيريا حامض اللاكتيك هي KR3 و KR4 و KR51 و KR53 إذ أثبتت مقدرتها على تثبيط الفطريات *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Trichoderma* المتسببة في تلف المواد الغذائية بشكلٍ نهائيّ. تُعدّ بكتيريا حامض اللاكتيك مهمة في الحفظ الحيوي للغذاء والأعلاف والسبب يعود إلى إنتاجها مضادات الفطريات مثل الأحماض العضوية كحامض اللاكتيك وحامض الخليك وكذلك بيروكسيد الهيدروجين وغيرها من المركبات المضادة للفطريات كالبكتريوسينات Bacteriocins (Prachyakij et al., 2007). أشار (El-Nezami et al., 1998) أنّه تمّ إزالة 80% من الأفلاتوكسين بواسطة عزلتين من بكتيريا حامض اللاكتيك Rhamnosus LC-705 و Rhamnosus GG بعملية سريعة جداً لربط سموم الأفلاتوكسين AFB1 ومن خلال ما ذكر ارتأينا إجراء هذه الدراسة بهدف معرفة القابلية التثبيطية لبكتيريا *Lactobacillus spp.* ضد الفطريات وسموم الأفلاتوكسين مخبرياً باستعمال العزلات المحليّة (AKF1) *L. casei* و (AKF2) *L. plantarum* و (AKF3) *L. casei* و (AKF4) *L. plantarum* و (AKF5) *L. Jonsonii* وإيجاد أنواع من البكتيريا النافعة لتثبيط الفطريات وتحطيم السّموم المنتجة من قبلها لتكون الهدف الواعد لحلّ مشاكل السّموم الفطريّة.

مواد البحث وطرائقه:

1- المصادر المحليّة لعزل الفطريات:

استُعملت عينات من القمح المحليّة المزروعة في المحافظات المشمولة بالموسم الزراعي 2015.

2- المصادر المحليّة لعزل البكتيريا:

حليب الأبقار وحليب الجاموس وجبن الطفائر والجبن الأبيض الطري المحلي واللبن المحلي والمخلّلات.

3- عزل الفطريات الخارجية المرافقة للحظنة المحليّة:

استُعمل وسط مستخلص البطاطا والدكستروز الصلب (PDA) وحُضنت الأطباق عند درجة حرارة 25 °م لمدة (5-7) أيام ثم نُقيت العزلات وفُحصت تحت المجهر وشخّصت الأجناس الشائعة اعتماداً على الأبواغ والتراكيب الجنسية واللاجنسية.

4- تشخيص العزلات البكتيرية باستعمال API₅₀ CHL System:

شخصت أنواع بكتريا *Lactobacillus* باستعمال عدّة العمل API₅₀ medium and Strips المجهّزة من شركة بايوميركس الفرنسية Biomerieux/ France وتتكوّن عدّة العمل المستعملة من 49 سكر لغرض التشخيص، وقد أُجري هذا الفحص حسب التّعليمات الموجودة على الغلاف والموصى بها من قبل الشركة المصنّعة.

5- حفظ العزلات البكتيرية:

تمّ تلقيح العزلات في وسط MRS السائل ثمّ حُضنت عند درجة حرارة 37 °م ولمدة 24 ساعة، حُفظت بعدها في الثلاجة لحين الاستعمال مع تجديد المزارع كل شهر (Aneja, 2002).

6- قتل البكتريا حرارياً:

حُضنت بكتريا *Lactobacillus* في وسط MRS السائل عند درجة حرارة 37 °م ولمدة (24 و28) ساعة، وفي ظروف لاهوائية بعد ذلك أُجري النّبذ المركزي للمزرعة البكتيريّة بسرعة 3500 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة 4 °م ثمّ عُزل الرّائق عن الرّاسب، غُسل الرّاسب مرتين باستعمال محلول الفوسفات الملحي الدائري (PBS)، والذي يتوقع فيه عدد الخلايا (10⁶-10⁸) وحدة تكوين مستعمرة/ مل. سُخّن معلق الخلايا البكتيريّة على درجة حرارة 95 م لمدة ساعة واحدة. بعدها غُسلت الخلايا بالمحلول الدائري نفسه، ثمّ نُبذت مركزياً بسرعة 3500 دورة لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 4 °م. وضع الرّاسب (الخلايا المقتولة حرارياً) في 100 مل من المحلول الدائري نفسه لمدة 20 دقيقة ثمّ عوملت بجهاز Ultrasonic بماء بارد لمدة دقيقة واحدة عند درجة 4 °م، وجُففت بعدها باستعمال جهاز التجفيف (Landersjo et al., 2002).

7- اختبار الفعاليّة التثبيطيّة لبكتريا *Lactobacillus* الحيّة ضد الفطريات:

تمّ الكشف عن تثبيط الفطريات من قبل بكتريا *Lactobacillus* من خلال تنمية البكتريا على أطباق بتري حاوية على وسط MRS agar التي حُضنت على درجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة في ظروف لاهوائية باستعمال أكياس Gas bag، بعد الحضان نُشرت كميّة من وسط PDA المذاب على شكل طبقة خفيفة فوق وسط MRS agar الذي تمّت تنمية بكتريا *Lactobacillus* عليه ثمّ نُشر المعلق الفطري فوق طبقة PDA بعد تصلبها وبتركيز 10⁴ بوغ/ مل بصورة متجانسة (Asurmendi et al., 2014).

8- اختبار الفعاليّة التثبيطيّة لبكتريا *Lactobacillus* المقتولة حرارياً ضد الفطريات:

تمّ الكشف عن تثبيط الفطريات من قبل بكتريا *Lactobacillus* المقتولة حرارياً من خلال خلط 250 و500 نانو غرام من الخلايا المقتولة حرارياً/ مل مع وسط PDA وبصورة معقمة، ثمّ صبّ في أطباق بتري وبعد تصلبها نُشر المعلق البوغوي بتركيز 10⁴ بوغ/ مل، ثمّ التحضين عند درجة حرارة 37 °م لمدة 7 أيام (Oluwafemi and Da-Silva., 2009).

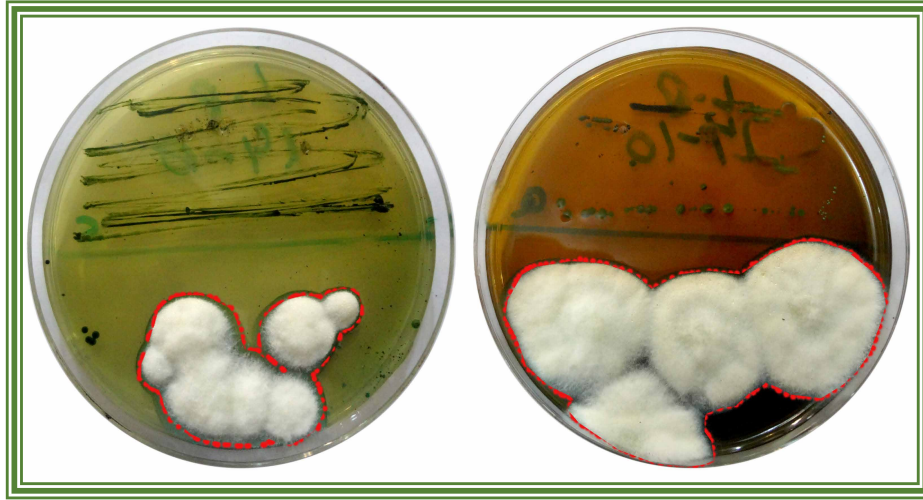
9- اختبار الفعاليّة التثبيطيّة للمركبات الأيضية لبكتريا *Lactobacillus* ضد الفطريات:

تمّ الكشف عن تثبيط الفطريات من قبل المركبات الأيضية لبكتريا حامض اللاكتيك من خلال خلط تركيزين 0.1 - 0.2 مل من المنتج الأيضي/ مل من الوسط PDA الصّلب وبصورة معقمة، ثمّ صبّها في أطباق بتري، وبعد تصلب الوسط نُشر المعلق البوغوي بتركيز 10⁴ بوغ/ مل بصورة متجانسة، ثمّ حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 37 °م لمدة 7 أيام (Asurmendi et al., 2014).

10- قياس تثبيط النمو:

صوّرت الأطباق باستعمال كاميرا رقمية CASIO EXILIM EX-Z80 على شكل JPEG، وقيست باستعمال البرمجيات الحرّة التي وضعتها جامعة تكساس مركز العلوم الصحيّة University of Texas Health Science Center وتُدعى الطريقة بـ San Antonio called UTHSCSA Image Tool, v. 2.0 إذ تحدد منطقة النمو بسهولة عن طريق أداة التحديد كما في الشكل (1)، ثمّ تمّ حساب منطقة نمو الفطريات تلقائياً من قبل البرنامج من خلال وضع وحدات القياس وفقاً للطول الظاهري والمعروف في الصورة مثل طبق بتري أو أي كائن ظاهر في الصورة (Barguil et al., 2005; Montini et al., 2006; Campos et al., 2008; Dušica et al., 2012; Al-Saad, 2015) وتمّ حساب النسبة المئوية للتثبيط حسب طريقة Abbott, (1925) من خلال المعادلة التالية:

النسبة المئوية للتشيط % = $\frac{\text{نمو الفطريات في عينة السيطرة}}{\text{نمو الفطريات عينة المعاملة}} \times 100$



الشكل 1. تحديد منطقة نمو الفطر *A.flavus* بواسطة أداة التحديد في برنامج ImageTool, v. 2.0

11- تثبيط سموم الأفلاتوكسين B1 بفعل خلايا بكتيريا *Lactobacillus* الحية في الوسط السائل:

خُطت سموم AFB1 مع 10 مل من وسط MRS المعقم وبتركيز 200 نانو غرام/مل، ثم لُقح الوسط ببكتيريا *Lactobacillus* المعزولة والمشخصة وبحجم 1 x 10⁶ و 1 x 10⁸ وحدة تكوين مستعمرة/ مل وبعمر 24 ساعة وحُضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 و 48 ساعة. تم الكشف عن سموم الأفلاتوكسين B1 باستعمال جهاز HPLC (Zuo et al., 2012).

12- تثبيط سموم الأفلاتوكسين B1 بفعل خلايا بكتيريا *Lactobacillus* المقتولة حرارياً في الوسط السائل:

خُطت سموم الأفلاتوكسين مع 10 مل من وسط MRS المعقم وبتركيز 200 نانو غرام/مل، ثم أُضيف عالق من خلايا بكتيريا *Lactobacillus* المقتولة حرارياً وبتركيز 250 و 500 نانو غرام/مل إلى الوسط وحُضنت عند درجة حرارة 37 °م لمدة 24 و 48 ساعة. تم الكشف عن السموم باستعمال جهاز HPLC (Zuo et al., 2012).

13- التقدير النوعي والكمي لسموم الأفلاتوكسين B1 بواسطة تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC

وتتلخص هذه التقنية باستعمال عمود الطور المعكوس C₁₈ ODS₂ ذي الأبعاد 250 × 4.6 ملم ونوع العمود المستعمل 3000 PWXL-CP الخاص بالأحماض العضوية، وكان حجم النموذج المحقون 5 ميكرو لتر وعلى طول موجي 365 نانومتر. وأجري الفصل باستعمال الطور المتحرك المتكوّن من (ماء: ميثانول: أسيتونايتزل) بالنسب (10:50:40)، (حجم: حجم) على التوالي لجهاز HPLC، وتم إجراء الفصل عند درجة حرارة الغرفة وبسرعة جريان 0.7 مل/دقيقة. وقُدّرت سموم الأفلاتوكسين B1 حسب الطريقة المشار إليها من قبل (Cataldi et al., 2000).

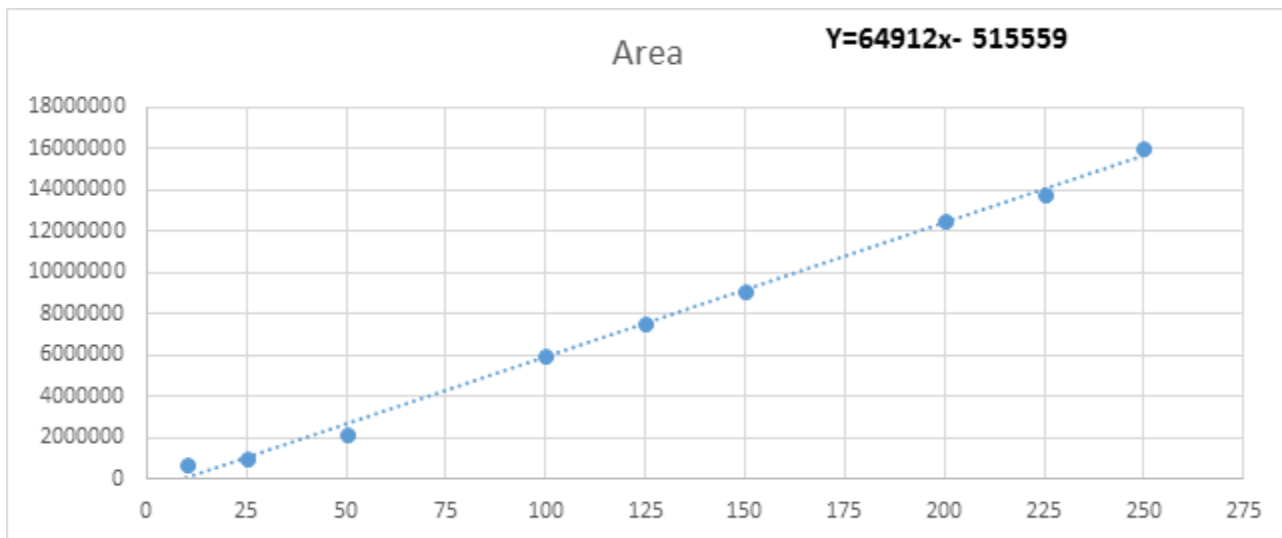
14- الكشف عن سموم الأفلاتوكسين بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

أُتبعَت تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC باستعمال صفائح هلام السليكا (20×20) سم وبسُمك 0.25 ملم والمجهزة من شركة Merck لتشخيص السموم الفطرية الأفلاتوكسين B1، حيث حُقن حجم 5 ميكرو لتر من عينة الأفلاتوكسين B1 القياسي على شكل بقع Spots على بعد 1 سم من الحافة السفلى للصفحة وأعيد وضع العيّات المستحصل عليها من الفطريات والقمح ثلاث مرات بقصد تركيزها، وثُركت حتى تجف بعد كل مرة. نُقلت الصفحة إلى الحوض الزجاجي الحاوي على المذيب المكوّن من الميثانول والكلوروفورم بنسبة (2: 98) (حجم: حجم) تبعاً لطريقة (Goldblatt, 1969) وذلك بوضع الصفحة بحيث تكون حافتها السفلى ملامسة لسطح نظام المذيب، وثُرِك المذيب لينتشر في الصفحة ويتحرك نحو الأعلى 16 سم. رُفعت الصفحة من الحوض وجُففت بوضعها في فرن حراري على درجة حرارة 50 °م لمدة نصف

ساعة قبل فحصها تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية على طول موجي 365 نانومتر، ويُعتبر ظهور اللون الأزرق للبقع المفصولة دلالة على إنتاج سموم الأفلاتوكسين.

15- حساب كمية الأفلاتوكسين المربوط:

بعد الانتهاء من عملية حضن البكتريا الحية أو المقتولة حرارياً التي وضعت في أنابيب اختبار تحتوي على وسط MRS السائل والذي يحتوي على AFB1 بتركيز 200 جزء بالليون، وبعد الحضان لمدة 24 إلى 48 ساعة أُجري الطرد المركزي على سرعة 300 g x 10-15 دقيقة، عند درجة حرارة 15 °م ثم أخذ الراسب وهو عبارة عن الخلايا البكتيرية، التي تم غسلها مرتين بالمذيب (الكوروفورم)، وجمعت مع المذيب، ثم وضع الخليط في الحمام المائي على درجة حرارة 50 °م ليتبخّر المذيب تاركاً AFB1، ثم أُذيب السّم بالقليل من الكوروفورم بغرض اختباره على صفائح هلام السليكا بتقنية TLC لتشخيصه، وبعدها فُحصت بتقنية HPLC لغرض معرفة تركيزه (El-Nezami et al., 1998). والشكل (2) يوضّح المنحنى القياسي لسّم AFB1



$$R^2 = 0.9965 \quad Y = 64912x - 515559$$

الشكل 2. المنحنى القياسي لسّم الأفلاتوكسين B1 لتقدير تركيز السّم بتقنية HPLC

16- حساب كفاءة الربط لسّم AFB1 بالخلايا البكتيرية:

تمّ غسل الخلايا البكتيرية المستعملة في ربط الأفلاتوكسين باستعمال 1.5 مل من المحلول دارئ الفوسفات الملحي pH 7.2 ووضع الخلايا مع المحلول الدارئ عند درجة حرارة 37 °م لمدة 10 دقائق، أُعيدت العملية ثلاث مرات متتالية، بعدها جُمع المذيب وتمّ تبخيره على حرارة 50 °م وتمّ قياس تركيز AFB1 بتقنية HPLC بعد إذابته بالكوروفورم مرةً أخرى (Peltonen et al., 2001).

التحليل الإحصائي:

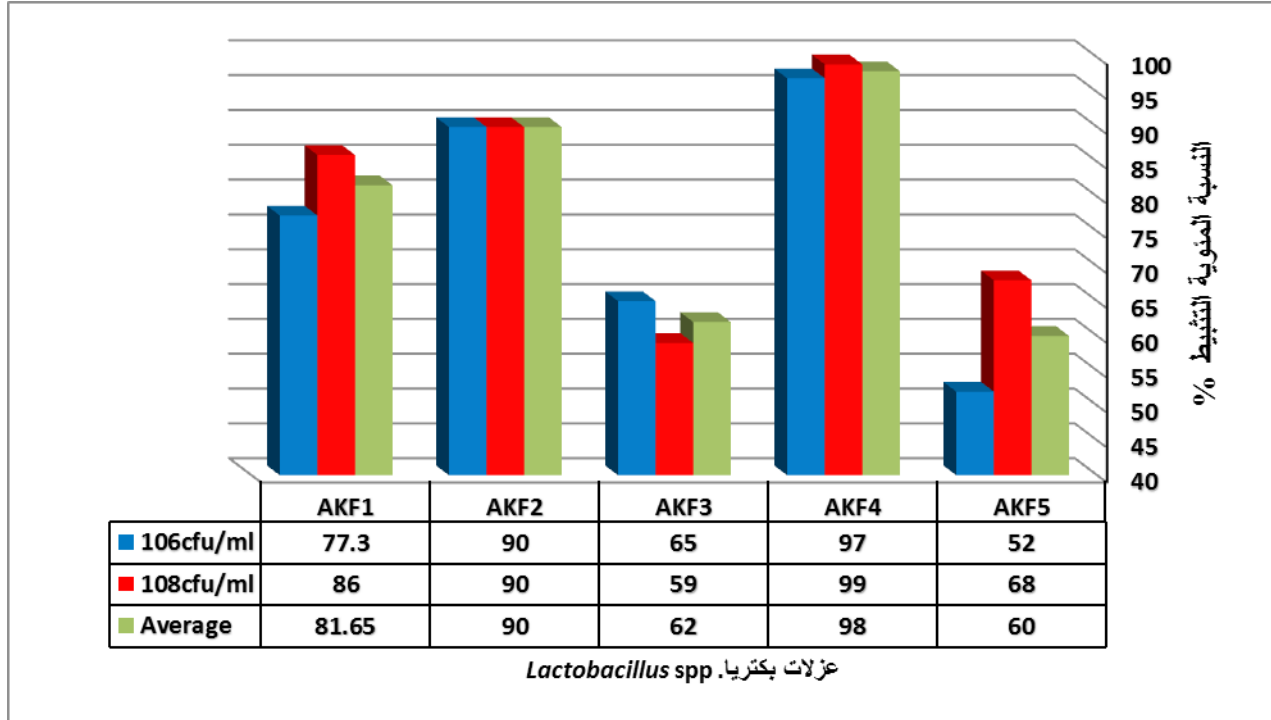
نُفذت التجربة وفق تصميم القطع التامة العشوائية (CRD) العاملية، وأجري التحليل الإحصائي باستعمال برنامج SPSS v22، وتمت المقارنة بين متوسطات المعاملات باستعمال اختبار أقل فرق معنوي LSD المعدّل عند مستوى معنوية 0.05.

النتائج والمناقشة:

1- تثبيط الفطريات باستعمال العزلات المحلية لجنس *Lactobacillus* spp.

من أجل معرفة قابلية عزلات *Lactobacillus* على تثبيط الفطريات تمّ انتخاب خمس عزلات لأنواع مختلفة من بكتريا *Lactobacillus* من مجموع العزلات التي تمّ الحصول عليها، توضّح الأشكال (3، 4 و 5) القدرة التثبيطية لخلايا بكتريا AKF1 و AKF2 و AKF3 و AKF4 و AKF5 الحية والمقتولة حرارياً والمنتجات الايضية للعزلات المحلية المنتخبة ضد

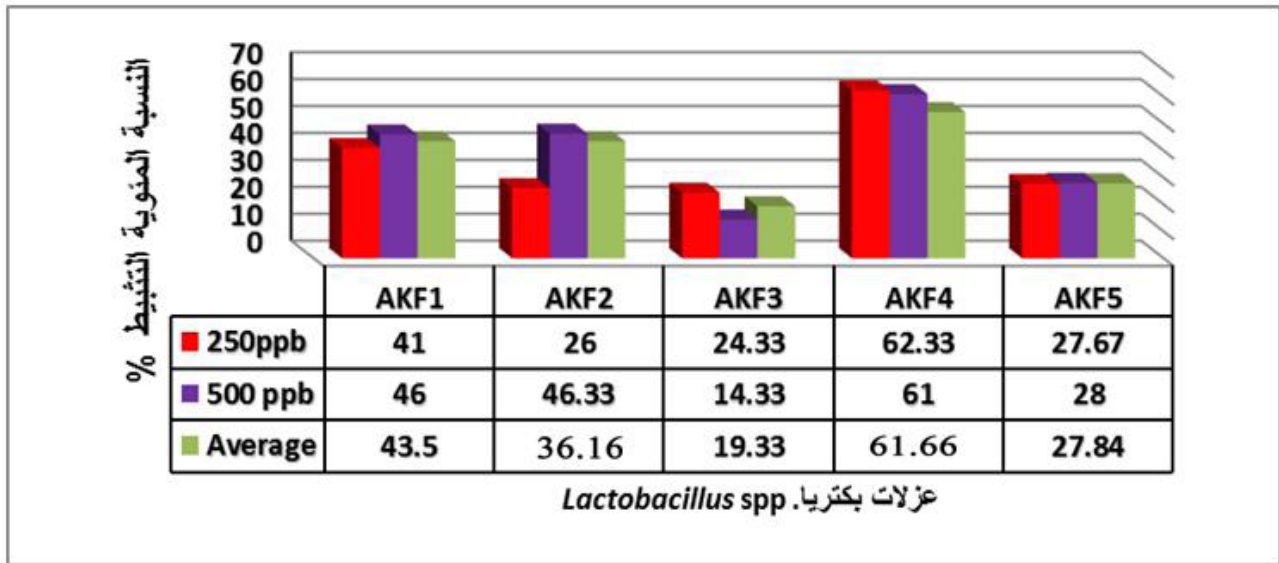
الفطريات باستعمال أعداد للخلايا الحية (10⁶ و 10⁸) وحدة تكوين مستعمرة/ مل وتركيزين للخلايا المقتولة حرارياً 250 و 500 جزء بالبليون وتركيزين للمنتجات الايضية 0.1 و 0.2 مل لكل مل من الوسط. وقد أظهرت النتائج قدرة الخلايا الحية على تثبيط الفطريات معنوياً عند مستوى احتمالية $P < 0.05$ تفوقت فيها العزلات المحلية (AKF1,2,3,4,5) على باقي العزلات المحلية الأربع عشرة، إذ بلغت (77.30 و 90 و 65 و 97 و 52) عند حجم اللقاح 10⁶ وحدة تكوين مستعمرة/ مل على التوالي، أما حجم اللقاح 10⁸ وحدة تكوين مستعمرة/ مل فكانت نسبته التثبيطية (86 و 90 و 59 و 99 و 68) للعزلات نفسها على التوالي كما في الشكل (3).



الشكل 3. القدرة التثبيطية للخلايا الحية لعزلات بكتريا *Lactobacillus* AKF1 و AKF2 و AKF3 و AKF4 و AKF5 ضد الفطريات النامية على وسط PDA باستعمال حجم اللقاح (10⁶، 10⁸) وحدة تكوين مستعمرة/ مل ودرجة حرارة 28 °م لمدة 7 أيام

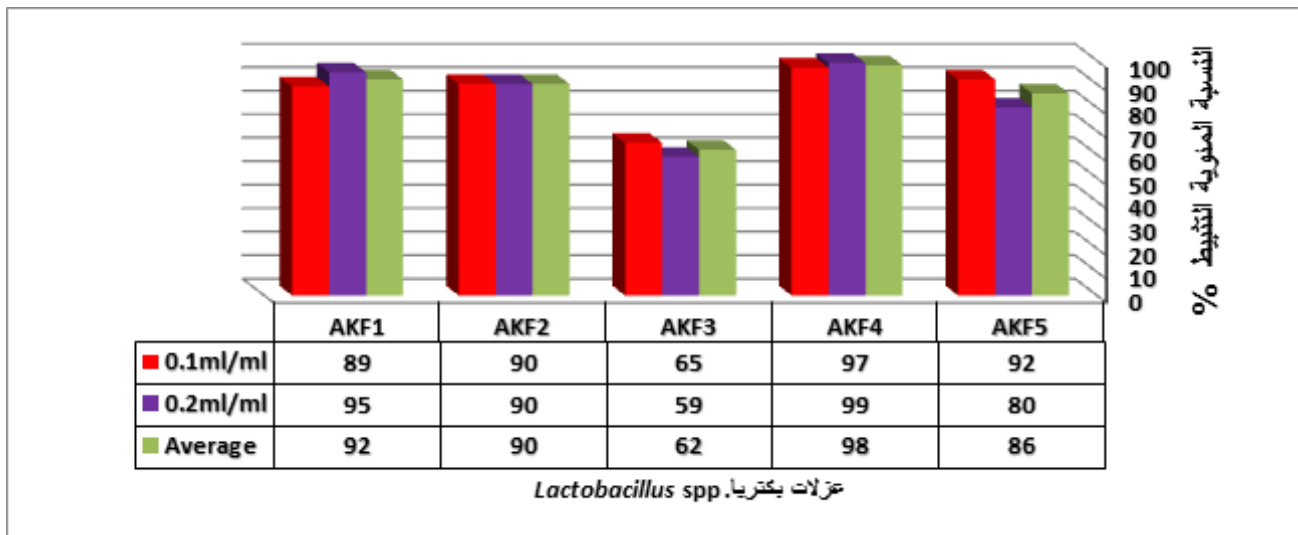
RLSD للعزلة=3.80 عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

أما العزلات المحلية المقتولة حرارياً فقد أعطت قدرة تثبيطية عالية مقارنة مع باقي العزلات التي تم الحصول عليها وبالغلة 14 عزلة، إذ أعطت قدرة تثبيطية عند التركيزين لخلاياها المقتولة حرارياً 250 و 500 جزء بالبليون بلغت (41 و 26 و 24.33 و 62.33 و 27.67) و (46 و 46.33 و 14.33 و 61 و 28) على التوالي كما في الشكل (4).



الشكل 4. القدرة التثبيطية لخلايا عزلات بكتريا *Lactobacillus* AKF1 وAKF2 وAKF3 وAKF4 وAKF5 المقتولة حرارياً ضد الفطريات النامية على وسط PDA باستعمال تركيزين 250 و500 جزء بالبلليون ودرجة حرارة 28 °م لمدة 7 أيام. RLSD للعزلة=7.3 عند مستوى احتمالية ($P<0.05$).

أما تأثير المنتجات الأيضية للعزلات المحلية فقد أظهرت تفوقاً واضحاً في تثبيط الفطريات، إذ تفوقت العزلات المحلية (AKF1,2,3,4,5) معنوياً عند مستوى احتمالية $P\leq 0.05$ إذ بلغت النسبة المئوية للتثبيط (89 و90 و65 و97 و92)% عند التركيز 0.1 مل/مل على التوالي، في حين بلغت النسبة المئوية للتثبيط عند التركيز 0.2 مل/مل (95 و90 و59 و99 و80)% على التوالي، وتفوقت العزلة المحلية AKF4 كما في الشكل (5). كما يُلاحظ من النتائج تفوق واضح للعزلة AKF4 في تثبيط العزلات الفطرية مقارنةً مع جميع العزلات المحلية التي استُعملت في هذه الدراسة.



الشكل 5. القدرة التثبيطية للمنتجات الأيضية لعزلات بكتريا *Lactobacillus* AKF1 وAKF2 وAKF3 وAKF4 وAKF5 ضد الفطريات النامية على وسط PDA الصّلب باستعمال تركيزين 0.1 و0.2 مل/مل من الوسط ودرجة حرارة 28 °م لمدة 7 أيام. RLSD للعزلة=6 عند مستوى احتمالية ($P\leq 0.05$).

حيث وجد أقل فرق معنوي LSD للعزلات الست المدروسة عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$)، ومن خلال المتوسطات تبين أن أعلى متوسط للتثبيط كان للعزلة AKF4 عندما تكون حية، أو منتجاتها الأيضية، وأقل متوسط للتثبيط للعزلة AKF3 عندما تكون مقتولة حرارياً، وقد أثبتت النتائج أن العزلة AKF4 وبحجم لقاح 10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل هي الأعلى تثبيطاً للفطريات وبنسبة 99%. وهذا يتفق مع Sevgi and Tsveteslava, (2015) اللذين وجدوا أن نسبة التثبيط كانت 100 % للفطريات الملقحة للقمح البلغاري مخبرياً لأجل محاكات الواقع، ومن قبل العزلة *A. niger* و *P. claviforme* و *C. albicans* 8673 و *C. glabrata* 72 التي تسبب تلف محصول القمح.

وقد وجد (Delavenne et al., 2013) أن أحد عشر عزلة من بكتريا حامض اللاكتيك والتي تعود إلى *L. paracasei* و *L. rhamnosus* و *L. zea* و *L. harbinensis* المعزولة من حليب البقر والماعز لها القدرة التثبيطية ضد أنواع من الأعفان والخمائر مثل *Candida parapsilosis* و *Candida diffluens* و *Debaryomyces hansenii* و *Kluyveromyces marxianus* و *Rhodotorula mucilaginosa* و *Zygosaccharomyces bailii* و *Yarrowia lipolytica* و *Penicillium brevicompactum* التي تشارك عادةً في تلف منتجات الألبان. واتفقت الدراسة كذلك مع (Tropcheva et al., 2014) الذين شخصوا أربع عزلات جديدة باستعمال عدّة العمل API 50 CH تعود إلى بكتريا حامض اللاكتيك وهي KR3 و KR4 و KR51 و KR53 التي أثبتت مقدرتها على تثبيط الفطريات *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Trichoderma* المتسببة في تلف المواد الغذائية بشكل كامل. واتفقت النتيجة مع دراسة (Saladino et al., 2016) الذين بينوا تثبيط الفطريات بنسبة 99% على كمية السموم المفروزة.

وأكد (Ryu et al., 2014) بعد عزل سلالة تعود إلى بكتريا *L. plantarum* أن هناك مركبات تمنع نمو الفطريات الخيطية والخمائر في النبيذ المصنّع في كوريا، وكان تأثيرها في الفطريات الخيطية أقوى من الخمائر، وذلك عند درجة حرارة 27 °م لمدة 27 يوماً وبدون إجراء عملية التعقيم عليها. ومن ضمن هذه المركبات المضادة للفطريات والتي حددت بتقنية HPLC هي 5-oxododecanoic acid (MW 214) و 3-hydroxy decanoic acid (MW 188) ومركب 3-hydroxy-5-dodecenoic acid (MW 214).

2- ربط الأفلاتوكسين B1 مخبرياً:

يشير الجدول (1) والأشكال (6 و 7 و 8 و 9) إلى كمية AFB1 المتبقية بعد حضن العزلات البكتيرية الخمس في حال كونها حية أو مقتولة حرارياً أو منتجات الأيض الثانوية للعزلات قيد الدراسة عند درجة حرارة 37 °م ورقم هيدروجيني 6.5 ولمدة 24-48 ساعة، وباستعمال أعداد للخلايا الحية (10^6 و 10^8) خلية/مل، وتركيزين للخلايا المقتولة حرارياً 250 و 500 جزء بالبلليون وتركيزين للمنتجات الأيضية 0.1 و 0.2 مل لكل مل من الوسط، أظهرت النتائج أن أفضل المعاملات لتثبيط الأفلاتوكسين وتحت مستوى معنوية 0.05 كانت لكل من AKF1 و AKF2 و AKF4 و AKF5، ولوحظ أن استعمال البكتريا سواء كانت حية أو مقتولة حرارياً قد ربطت سموم AFB1، إذ وصلت إلى نسبة 100% كما في العزلة AKF5 المقتولة حرارياً وعند تركيز 250 جزء بالبلليون وبعد 48 ساعة من الحضن عند درجة حرارة 37 °م. وكذلك وصلت نسبة ربط سموم AFB1 إلى 100% كما في العزلات AKF1 و AKF2 و AKF5 المقتولة حرارياً عند تركيز 500 جزء بالبلليون بعد 48 ساعة. لوحظ أن العزلة AKF4 المقتولة حرارياً قد ربطت سموم AFB1 بنسبة 100% عند تركيز 500 جزء بالبلليون خلال 24 و 48 ساعة.

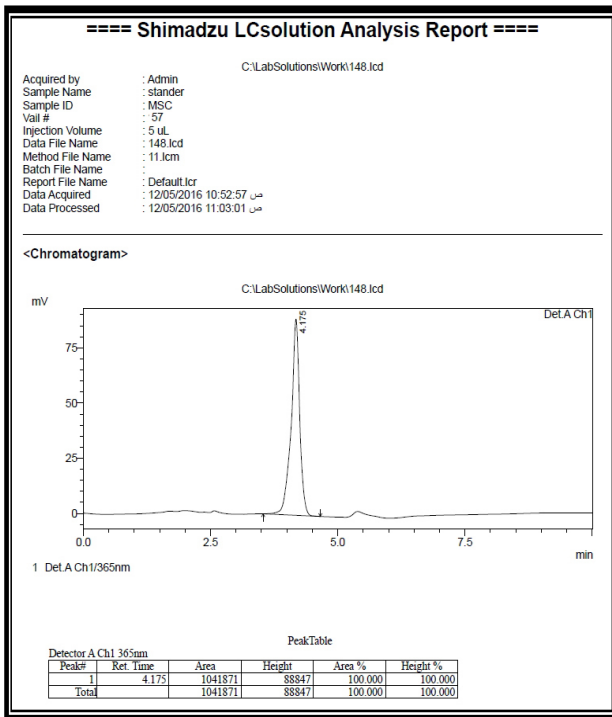
إن عملية ربط الأفلاتوكسين B1 من قبل البكتريا تعتمد أساساً على نوع السلالة البكتيرية، ودرجة الحرارة، والدالة الحامضية، ووقت الحضن، والظروف ذات الصلة. علماً أن بكتريا *Lactobacillus* هي من أكثر السلالات البكتيرية استعمالاً، وعملية الربط تكون على الأرجح على سطح الخلية البكتيرية لاسيما مع الكربوهيدرات المكوّن الرئيس لجدار الخلية، الذي يتكوّن من الببتيدوكلايكان Peptidoglycan، وكذلك حامض الليبوتكويك Lipoteichoic acids وتشير التقارير إلى أن أحماض التكويك Teichoic acids قد تكون عناصر مهمة تشارك في ربط AFB1 وكمية قليلة من البروتين، ولا يعتقد أن للدهون الخليوية أي دور في عملية الربط (Ahlberg et al., 2015).

اتفقت النتائج مع ما توصل إليه (Al-Saad, 2015) الذي استعمل خمس عزلات من بكتريا *Bacillus subtilis* وهي BSS4 و BSS3 و BSS1 و BSS2 التي تميّزت بقدرتها على ربط 200 جزء بالبلليون من سموم AFB1 بنسبة

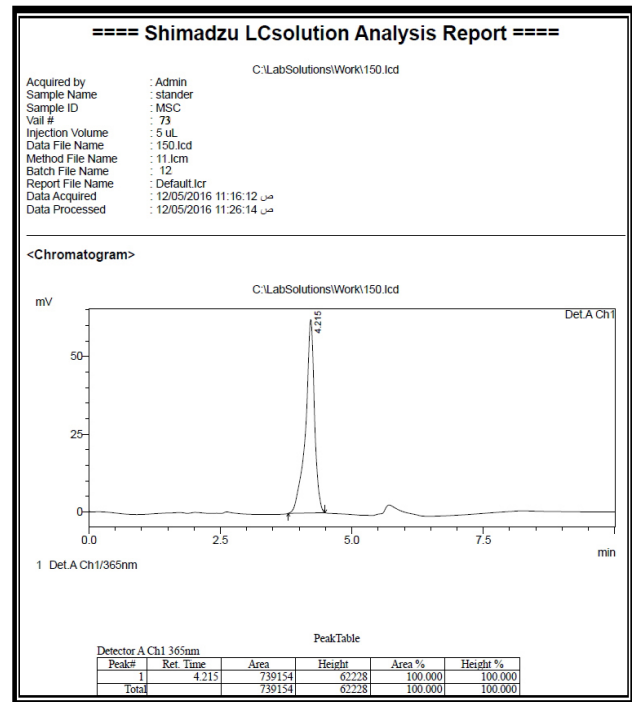
100 و 100 و 99.53 و 97.07 و 95.56 % على التوالي. أما العزلتان التابعتان لبكتريا *Pseudomonas fluorescens* وهما PFMst و PFDL فقد ربطتا 200 جزء بالبليون من AFB1 بنسبة 79.8 و 97.39 % على التوالي. ويُعزى التدهور الحاصل لسّم AFB1 في الغالب إلى النشاط الأنزيمي الخارج الخليوي للبكتريا الذي يعتمد عادة على مستوى الجينات التي تتحكم في إنتاج تلك الأنزيمات (Reddy et al., 2010; Afsharmanesh et al., 2014). يوجد العديد من البكتريا مثل (*Lactococcus lactis* و *Escherichia.coli* و *B.subtilis*) التي تمتلك قدرة عالية على تحلل AFB1 في الوسط السائل عن طريق ربط AFB1 في جدار الخلية البكتيرية، التي تؤدي إلى إزالة التأثير السمي للأفلاتوكسين B1 (Al-Jumaily, 2014).

الجدول (1) تركيز الأفلاتوكسين B1 المتبقي بعد الحضانة عند درجة حرارة 37 °م في المختبر باستعمال بكتريا *Lactobacillus* الحية والمقتولة حرارياً والمنتجات الأيضية مع 200 جزء بالبليون من AFB1

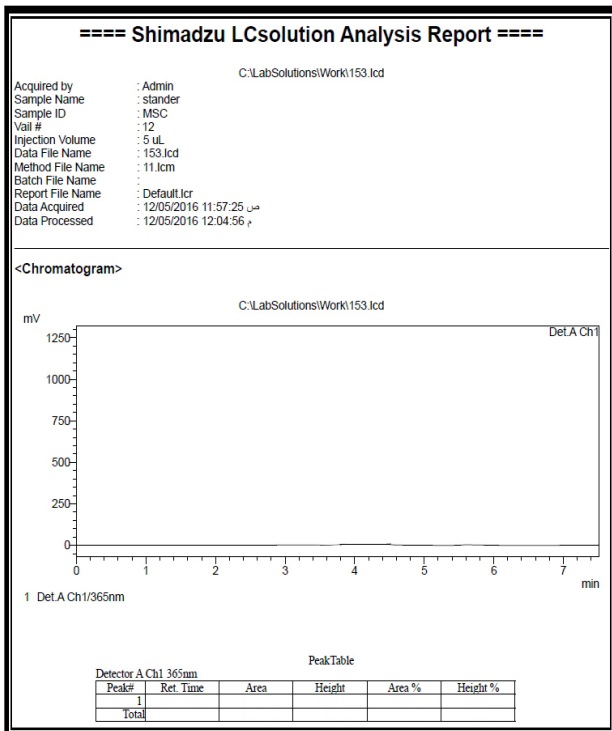
المتوسط	حجم اللقاح				العزلات الحية
	Cfu x1 10 ⁸		10 ⁶ x1 Cfu		
	h 24	h 48	h 24	h 48	
4.250 ^{ef}	6	2	5	4	AKF1
2.425 ^f	3.3	2.8	2.2	1.4	AKF2
24.950 ^d	37	23.3	20	19.5	AKF3
1.850 ^f	0.8	0.2	4.2	2.2	AKF4
2.600 ^f	4.4	1.2	4.3	0.5	AKF5
RLSD للعزلة=2.66 عند مستوى احتمالية (P≤0.05).					
المتوسط	تركيز الخلايا				العزلات المقتولة حرارياً
	500ppb		250ppb		
	h 24	h 48	h 24	h 48	
0.850 ^f	0.8	0	1.3	1.3	AKF1
0.563 ^f	0.89	0	0.16	1.2	AKF2
6.100 ^e	8	2.4	7	7	AKF3
0.700 ^f	0	0	1.6	1.2	AKF4
1.725 ^f	0.1	0	1.3	0	AKF5
RLSD للعزلة=1.14 عند مستوى احتمالية (P≤0.05).					
المتوسط	مل / مل تركيز المنتجات				المنتجات الأيضية
	ml /0.2		ml /0.1		
	h 24	h 48	h 24	h 48	
191.325 ^b	195	185	190.3	195	AKF1
184.500 ^c	188	170	200	180	AKF2
199.325 ^a	197.3	200	200	200	AKF3
183.600 ^c	180	180	190	184.4	AKF4
193.125 ^b	200	190	182.5	200	AKF5
RLSD للعزلة=5.6 عند مستوى احتمالية (P≤0.05).					



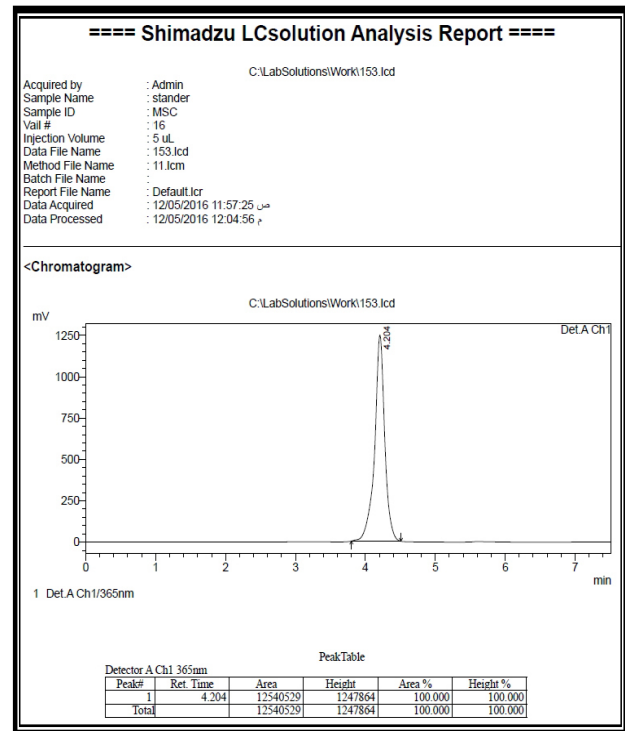
الشكل 7. ظهور قمة الأفلاتوكسين B₁ للعزلة AKF3
بحجم لقاح 10^8 Cfu بعد 48 ساعة



الشكل 6. ظهور قمة الأفلاتوكسين B₁ القياسي عند وقت
الاحتفاظ الخاص به بأستعمال جهاز HPLC



الشكل 9. عدم ظهور قمة الأفلاتوكسين B₁ للعزلة AKF4
بتركيز خلايا 500 ppb المقتولة حرارياً بعد 24 ساعة



الشكل 8. ظهور قمة الأفلاتوكسين B₁ للعزلة AKF2
باستخدام تركيز 0.1 ml من المنتج الايضي بعد 24 ساعة

3- قياس كفاءة ربط الأفلاتوكسين في الخلايا البكتيرية الحية والمقتولة حرارياً:

تشير النتائج في الجدول (2) إلى كفاءة عملية غسل خلايا بكتريا *Lactobacillus* بالماء المقطر الخالي من الأيونات ومركب الاسيتونايتريل Acetonitrile ومحلول الفوسفات الملحي الدارئ، في ربط سموم الأفلاتوكسين B1 وقد تم غسل الخلايا البكتيرية ثلاث مرات متتالية، حيث أفرجت بعض العزلات عن AFB1 بكميات قليلة نسبياً وبطريقة تعتمد على نوع العزلة، إذ لوحظ عند غسل البكتريا بالماء الخالي من الأيونات عدم ظهور حالة استرجاع لسموم الأفلاتوكسين وللمرة الثالثة على التوالي، في حين بلغت أعلى كمية مسترجعة من الأفلاتوكسين B1 المربوط عندما غسلت الخلايا البكتيرية الحية للعزلة AKF3 بمحلول PBS قيمة بلغت 0.8 جزء بالليون، وكانت أقل كمية مسترجعة من الأفلاتوكسين لخلايا البكتريا الحية للعزلة AKF2 حوالي 0.1 جزء بالليون عند غسل البكتريا بالاسيتونايتريل. اتفقت النتيجة مع ما وجدته Serrano-Niño *et al.*, (2015) حيث أكدت نتيجة دراستهم أن غسل 14 عزلة بكتيرية من LAB لم يفرج إلا عن كمية ضئيلة نسبتها 1.1% عند الغسلة الثالثة للعزلة *L. casei* L9 حيث لم تفرج العزلة نفسها AFB1 بالغسلة الأولى والثانية، ولم تعط العزلة *L. casei* 7R1 و *L. casei* Shirota أي كمية من AFB1 بالغسلة الثالثة بالمحلول الدارئ. ووجد كذلك في دراسة (Hernandez-Mendoza *et al.*, 2009) أن العزلة *L. casei* 7R1 لم تفرج عن AFB1 في الغسلات الثلاث باستعمال المحلول الدارئ عند الغسل، ويعود السبب إلى الألفة القوية بين مواقع الربط على جدار الخلية وسموم AFB1. ووجد Pizzolitto *et al.*, (2011) أن كفاءة الربط للعزلات *L. acidophilus* P₂₂ و *L. fermentum* و *L. casei* وصلت ما بين 92-98% عند غسلها بمركب Acetonitrile.

الجدول 2. كمية AFB1 المفرج عنها بعد عملية الغسل لثلاث مرات متتالية لعزلات بكتريا <i>Lactobacillus</i> عند درجة حرارة الغرفة ولمدة 5 دقائق باستعمال الماء المقطر الخالي من الأيونات ومركب الاسيتونايتريل ومحلول الفوسفات الملحي الدارئ					
الغسل بالماء المقطر الخالي من الأيونات					
ت	رمز العزلة	أعداد خلايا البكتريا الحية/مل		تركيز خلايا البكتريا المقتولة حرارياً (ppb)	
		10 ⁶	10 ⁸	250	500
1	AKF1	0	0	0	0
2	AKF2	0	0	0	0
3	AKF3	0	0	0	0
4	AKF4	0	0	0	0
5	AKF5	0	0	0	0
الغسل بمركب الاسيتونايتريل Acetonitrile					
ت	رمز العزلة	أعداد خلايا البكتريا الحية/مل		تركيز خلايا البكتريا المقتولة حرارياً (ppb)	
		10 ⁶	10 ⁸	250	500
1	AKF1	0.25	0.1	0	0
2	AKF2	0.1	0.1	0	0
3	AKF3	0.6	0.1	0	0
4	AKF4	0.0	0.0	0	0
5	AKF5	0.0	0.0	0	0
الغسل بمحلول الفوسفات الملحي الدارئ PBS					
ت	رمز العزلة	أعداد خلايا البكتريا الحية/مل		تركيز خلايا البكتريا المقتولة حرارياً (ppb)	
		10 ⁶	10 ⁸	250	500
1	AKF1	0.12	0.0	0.0	0.0
2	AKF2	0.22	0.0	0.0	0.0
3	AKF3	0.8	0.0	0.0	0.0
4	AKF4	0.0	0.0	0.0	0.0
5	AKF5	0.0	0.0	0.0	0.0

RLSD للعزلة=0.05 عند مستوى احتمالية (P≤0.05).

الإستنتاجات:

يُستنتج من الدّراسة الحالية قابلية بكتريا *Lactobacillus spp.* على تثبيط الفطريّات وربط سموم الأفلاتوكسين سواءً كانت هذه البكتريا حيّة أو مقتولة حراريّاً.

المراجع:

- Afsharmanesh, H.; M. Ahmadzadeh; M. Javan-Nikkhah; and K. Behboudi (2014). Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. *Crop Protection*. 60: 83- 92.
- Ahlberg, S.H.; V. Joutsjoki; and H.J. Korhonen (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International journal of food microbiology*. 207: 87- 102.
- Al-Jumaily, S.A. (2014). *Mycotoxins*. Book house publisher. Iraq. Pp 423.
- Al-Saad, L.A. (2015). Biotic and abiotic control on *Aspergillus flavus* growth, aflD and aflR expression and Aflatoxin B1 production. PhD Thesis, Basrah University, Basrah, Iraq.
- Aneja, K.R. (2002). *Experiments in microbiology, plant pathology, tissue culture and mushroom production technology*. 3rded New Age International (p) Limited. Publishers. New Delhi.
- Asurmendi, P.; L. Pascual; A. Dalcero; and L. Barberis (2014). Incidence of lactic acid bacteria and *Aspergillus flavus* in brewer's grains and evaluation of potential antifungal activity of these bacteria. *Journal of Stored Products Research*. 56: 33- 37.
- Barguil, B.M.; M.L.V. Resende; R. S.Resende; J. Beserra Júnior; and S.M. Salgado (2005). Effect of extracts from citric biomass, rusted coffee leaves and coffee berry husks on *Phoma costarricensis* of coffee plants. *Fitopatologia brasileira*. 30 (5): 535- 537.
- Bennett, J.W.; M. Machida; and K. Gomi (2010). An overview of the genus *Aspergillus*, In *Aspergillus. Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. 1:1- 17.
- Campos, M.A.; M.S. Silva; C. P. Magalhães; S. G.Ribeiro; R. P.Sarto; E.A. Vieira; and M.F.G. de Sá (2008). Expression in *Escherichia coli*, purification, refolding and antifungal activity of an osmotin from *Solanum nigrum*. *Microbial Cell Factories*. 7(1): 7.
- Cataldi, T.R.I.; G. Margiotta; L. Lasi; B.D. Chio; C. Xiloyannis; and S.A. Bufo (2000). Determination of compound in olive plant extracts by anion-exchange chromatography with pulsed amperometric. *Anal. Chem.*, 72: 3902- 3907.
- Cawoy, H.; W. Bettiol; P. Fickers; and M. Ongena (2011). *Bacillus*-based biological control of plant diseases. IN: Stoytcheva, M. (Ed.). *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. InTech. Croatia.Pp. 273- 302.
- Delavenne, E.; R. Ismail; A. Pawtowski; J. Mounier; G. Barbier; and G. Le Blay (2013). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. *Food Control*. 30(1): 206- 213.
- Dušica, Ć.; N. Devrnja; J. Milojević; S. Zdravković-Korać; L. Tubić; MS. Djuričković; and B. Vinterhalter (2012). Pollen morphology and variability of *Tulipa hungarica* Borb. *African Journal of Biotechnology*. 11(3): 616- 620
- El-Nezami, H.; P. Kankaapaa; S. Salminen; and J. Ahokas (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind food carcinogens. *Food and Chemical Toxicology*. 36(4):321- 326.
- Fountain, J.C.; B.T. Scully; X. Ni; R.C. Kemerait; R.D. Lee; Z. Chen; and B. Guo (2014). Environmental influences on maize-*Aspergillus flavus* interaction and aflatoxin production. *Frontiers in Microbiology*. 5:17.
- Georgianna, D.R.; and G.A. Payne (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 113- 125.

- Gerbaldo, G.A.; C. Barberis; L. Pascual; A. Dalcero; and L. Barberis (2012). Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiology Letters. 332(1): 27- 33.
- Goldblatt, L.A. (1969). Aflatoxin: Scientific background control and implication. Food science and technology, A series of Monographs.
- Hernandez-Mendoza, A.; H.S. Garcia; and J.L. Steele (2009). Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B 1. Food and chemical toxicology. 47(6):1064- 1068.
- IARC: International Agency for Research on Cancer (1993). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. World Health Organization: Lyon, France. 56:489.
- Iram, W.; Anjum, T.; M. Iqbal; A. Ghaffar; and M. Abbas (2016). Structural elucidation and toxicity assessment of degraded products of Aflatoxin B1 and B2 by aqueous extracts of trachyspermum ammi. Frontiers in microbiology. 7.
- Jakhar, K.K.; and J.R. Sadana (2004). Sequential pathology of experimental aflatoxicosis in quail and the effect of selenium supplementation in modifying the disease process. Mycopathologia. 157: 99- 109.
- Landersjo, C.; Z. Yang; E. Huttunen; and G. Widmalm (2002). Structural studies of the Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (ATCC53103). Biomacromolecules. 3: 880- 884.
- Mejía-Teniente, L.; A. M.Chapa-Oliver; M. A.Vazquez-Cruz; I.Torres-Pacheco; Guevara- R.G. González (2011). Aflatoxins biochemistry and molecular biology-biotechnological approaches for control in crops, IN: Torres-pacheco, I (Ed.). Aflatoxins-Detection, Measurement and Control. Chapter. 10 :317- 354.
- Montini, R.M.D.C.; J.R.D.S. Passos; and A.F.D. Eira (2006). Digital monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) on agar medium. Brazilian Journal of Microbiology. 37(1): 90- 95.
- Oluwafemi, F.; and F.A. Da-Silva (2009). Removal of aflatoxins by viable and heat-killed *Lactobacillus* species isolated from fermented maize. Journal of Applied Biosciences. 16: 871 - 876.
- Peltonen, K.; H. El-Nezami; C. Haskard; J. Ahokas; and S. Salminen (2001). Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Dairy Science. 84: 2152- 2156.
- Pizzolitto, R.P., D.J. Bueno; M.R. Armando; L. Cavaglieri; A.M. Dalcero; and M.A. Salvano (2011). Binding of aflatoxin B1 to lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in vitro: a useful model to determine the most efficient microorganism. In *Aflatoxins-biochemistry and molecular biology*. InTech.
- Prachyakij, P.; J. Schnurer; W. Charernjiratrakul; and D. Kantachote (2007). Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented. Journal of Science and Technology. 29(2):211-218.
- Qian, G.; L. Tang; X. Guo; F. Wang; M.E. Massey; J. Su; T.L. Guo; J.H. Williams; T.D. Phillips; and J.S. Wang (2014). Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male F344 rats. Journal of Applied Toxicology. 34: 241–249.
- Rajani, P.; V. Sridevi; and M.V.V.C. Lakshmi (2012). A review on biological control of aflatoxin cropcontamination. International Journal of Chemical, Environmental and Pharmaceutical

- Research. 3(1): 83- 86.
- Reddy, K.R.N.; N.I. Farhana; B. Salleh; and C.A.F. Oliveira (2010). Microbiological control of mycotoxins: present status and future concerns. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. 2: 1078- 1086.
- Ryu, E.H.; E.J. Yang; E.R. Woo and H.C. Chang (2014). Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*. 41:19- 26.
- Saladino, F.; C. Luz ; L. Manyes; M. Fernández-Franzón; and G. Meca (2016). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*. 67: 273- 277.
- Serrano-Niño, J.C.; A. Cavazos-Garduño; F. Cantú-Cornelio; A. F.Gonzalez-Cordova; B.Vallejo-Cordoba; A. Hernández-Mendoza; and H.S. García (2015). In vitro reduced availability of aflatoxin B 1 and acrylamide by bonding interactions with teichoic acids from *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology*. 64(2): 1334- 1341.
- Sevgi.; and I.I. Tsvetelava (2015). Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria, Isolated from Bulgarian Wheat and Rye Flour. *Journal of Life Sciences*. 9: 1- 6.
- Shu, X.; D.P. Livingston; R.G. Franks; R.S. Boston; C.P. Woloshuk; and G.A. Payne (2015). Tissue-specific gene expression in maize seeds during colonization by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant Pathology*. 16(7): 662- 674.
- SPSS (Statistical Package for Social Science). (2012) .
- Tropcheva, R.; D. Nikolova; Y. Evstatieva; and S. Danova (2014). Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product “katak”. *Anaerobe*. 28: 78- 84.
- Wan, X.L.; Z.B. Yang; W.R. Yang; S.Z. Jiang; G.G. Zhang; S.L. Johnston; and F. Chi (2013). Toxicity of increasing aflatoxin B1 concentrations from contaminated corn with or without clay adsorbent supplementation in ducklings. *Poultry Science*. 92:1244- 1253.
- Wogan, G.N.; T.W. Kensler; and J.D. Groopman (2012). Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepa to cellular carcinoma. *Food Additives and Contaminants*. 29: 249- 257.
- Zuo, R.; J. Chang; Q. Yin; P. Wang; W. Cheng; X. Wang; and Q. Zheng (2012). Inhibiting *Aspergillus flavus* growth and degrading aflatoxin B1 by combined beneficial microbes. *African Journal of Biotechnology*. 11(65): 12903- 12909.

A Study of Inhibition Activity of *Lactobacillus* spp. Against Fungi and Aflatoxin B1 in Vitro

Keethar Rashid Majeed⁽¹⁾, Amal Khazem Ghadban⁽¹⁾ and Faleh Mehdi Saleh^{*(1)}

(1). Food technology Department, Faculty of Agriculture, Al Basra University, Al Basra, Iraq.

(*Corresponding author: Dr. Faleh Mehdi Saleh. E-Mail: husionforever1@gmail.com).

Received: 27/07/2017

Accepted: 18/08/2017

Abstract

This study was conducted in April 2015 to August 2016, to investigate the inhibition activity of *Lactobacillus* spp. in vitro against fungi and aflatoxin using local isolates i.e., *L. casi* (AKF1), *L. plantarum* (AKF2), *L. casi* (AKF3), *L. plantarum* (AKF 4) and *L. Jonsonii* (AKF 5). The results of assessment of degraded products of Aflatoxin B1 and B2 by aqueous extracts of *trachyspermum ammi*. *Frontiers in microbiology*. 7. the statistical analyses showed that AKF4 exhibited the highest inhibition activity (97, 62.33 and 97%) among all isolates using live bacteria, thermally killed bacteria, and its metabolic compounds, respectively. In contrasts, the inhibition activity of AKF3 were (59, 14.33 and 59%) using live bacteria, thermally killed bacteria, and its metabolic compounds, respectively. Furthermore, aflatoxin binding was studied in vitro using the isolates (AKF 1,2,3,4,5) in MRS media containing 200 ppb of aflatoxin B₁. The results revealed that using live bacteria of AKF4 at concentration 1×10^8 cfu/ml for 48 h showed highest binding percentage 99.9 %, while thermally killed bacteria of AKF1,2,5 at concentration 500 ppb for 48 h gave the highest binding percentage 100 % at 37 °C and pH 6.5. In addition, AKF 4 had the highest binding percentage 100% for both 24 h and 48 h at the same conditions. Binding efficiency results of thermally killed bacteria was 100 %, while binding efficiency of live bacteria ranged between (99.87- 100%) when the bacteria was washed with water, acetonitrile and phosphate buffer saline.

Keywords: Wheat, *Lactobacillus*, Aflatoxin Binding B1, Fungal growth inhibition.