مجلة المثنى للعلوم الصرفة
AL-Muthanna Journal of Pure Sciences (MJPS)
VOL.(3)...NO.(1) ….2016

التأثيرات السمية لراشح الفطر *Aspergillus ochrarous* المعزول من بذور المكسرات في بعض التغيرات النسيجية المرضية لذكور الجرذ الأبيض

م.م. صبا عبد الأمير كاظم
كلية العلوم / جامعة القادسية

الخلاصة
أُجريت هذه الدراسة لبيان التغيرات النسجية المرضية في كبد وطحال وكلية والرئة لذكور الجرذان تحت تأثير الراشح الخام للفطر Aspergillus ochraceus المنمى على وسط مستخلص البطاطا والدكستروز السائل PDB في ذكور الجرذان البيض المختبرة بطريقة التجريع الفموي بجرعة 1مل/كغم ولمدة 30 يوم. وأظهرت نتائج الاختبارات النسيجية لتأثير الراشح الخام للفطر (A. ochrarous) تأثيرات مرضية في بعض أنسجة الجرذان البيض المختبرة المتمثلة بفقدان البنيان الهندسي (شعاعيات الكبد) مع احتقان للوريد المركزي كذلك وجود تليف في نسيج الكبد وفرط تنسج hyperplasia في ظهارة القناة الصفراوية bil duct في أنسجة الكبد، فضلاً عن حصول نضح الماء من خلايا الكبد مؤدياً إلى انحلال الخلايا بدرجات متفاوتة كذلك أنسجة الرئة ارتشاح حاد في الخلايا اللتهابية مع نزف حاد واحتقان في الأنسجة الرئوية كما إن هناك تسمك في النسيج البيني بين الاسناخ alveoli وإصابة القصيبات الرئوية والتي تميزت بتوسف (تساقط) وتنكس بالخلايا الطلائية التي تبطن القصيبات وكذلك وجود نفاخ رئوي وأنسجة الكلية توسع النبيبات الكلوية الملتوية مع تنخر حاد في الخلايا الطلائية المبطنة للنبيبات الكلوية كذلك وجد ارتشاح بالخلايا اللتهابية وضمور الكبيبات الكلوية. اما أنسجة الطحال فقد وجدت استفاذ في اللب الأبيض و اختفاء للشرينات الصغيرة مع تكاثر في اللب الأحمر. وتعود هذه التغيرات المختلفة في الأنسجة قيد الدراسة إلى طبيعة السموم الفطرية التي ينتجها الفطر المذكور أعلاه.

المقدمة

تعد المكسرات من المكملات الغذائية المهمة حيث اعتبرت منظمة أبحاث السرطان (WCRE) في عام 1997 المكسرات مصدر غذائي جيد للدهون غير المشبعة والبروتين والألياف الغذائية والعناصر المعدنية والفيتامينات (Prasad,*et al.*,2000; Penny *et al.*,1999 وتعتبر المكسرات من المواد الغذائية المعرضة للإصابة بالفطريات المنتجة للسموم (احمد،1988) إذ تتعرض للتلوث بالفطريات إثناء عملية الحصاد أو النقل أو الخزن أو إثناء عرضها في الأسواق بصورة مكشوفة إنَّ ما يزيد من خطورة تلوث الحبوب بهذه الفطريات قدرتها على إنتاج مواد أيضية عرضية ذات تأثيرات سامة ومسرطنة للإنسان والحيوان تدعى بالسموم الفطرية Mycotoxins ، وتشير الدراسات إلى إن لمعظم الفطريات الموجودة في الأغذية القدرة على إنتاج أكثر من نوع من هذه السموم الفطرية إثناء نموها (Smith.*et.al.*,1994) .

ويعتبر الفطر *Aspergillus ochraceu* من الفطريات المنتجة للسموم الفلاتوكسينات والاوكراتوكسينات إذ يمتاز الفطر بقدرته العالية على إنتاج الاوكراتوكسين A أكثر من بقية الأنواع (Council for Agricultural Science and Technology ,2003) إذا إن كثر من 50% من الاوكراتوكسينات سجلت في الحبوب وبنسبة أكثر من 1 ملغم/كغم (Krishnamurthy, 2005) وترجع تسميه الاوكراتوكسينات إلى أول فطر عزل منه *A. ochraceus* إذ اكتشف الاوكراتوكسين في جنوب إفريقيا عام 1965 من قبل Scott (Scott,1965) وهو يسبب تسمم الكلى في الإنسان والحيوان على حدا سواء (عبد الحميد، 2000) ويسبب السم مرضا مميت للإنسان يدعى Nephropathy Balkan كما يحدث إمراض خبيثة (عبد الحميد، 2000 Huwig ,*et.al*,. 2001;) وينتج هذا السم من العديد من الفطريات ولكن يبقى *A. ochraceus* هو الوحيد المهم في حالات اصابة الحبوب

المخزونة (Frisvad,*et.al*,. 1991) وللاوكراتوكسين تأثيرات مختلفة شوهدت في أنواع كثيرة من الكائنات الحية فهو بالدرجة الأولى سم كلوي ويؤثر على الكبد ويشابه في تأثيره الافلاتوكسين B1 ويسبب حالات تشوه الأجنة وهو عامل مسرطن ويقوم بتثبيط جهاز المناعة Smith ,*et.al*.,1994 ; Moura,*et.al*.,2004 ; IARC , (1993).

ولغرض التعرف على التأثيرات السمية لراشح الفطر *A.ochrarous* كونه من الفطريات المرافقة لبذور المكسرات في ذكور الجرذ الأبيض تمحورت الدراسة حول الآتي:-

1- عزل وتشخيص *A. ochrarous* من بذور المكسرات .

2- اختبار تأثير تجريع الجرذان المختبرة براشح الفطر*A.ochrarous* على التغيرات النسيجية المرضية .

المواد وطرائق العملMaterials & Methods

1: عزل وتشخيص *فطر Aspergillus ochraceus*مـن بذور المكسرات

تم الحصول على عينات من بذور المكسرات من الأسواق المحلية وتم تتعقيمها سطحيا بمحلول هايبوكلورايت الصوديوم بتركيز 1% ولمدة دقيقتين غسلت بعدها بماء معقم ثم زرعت في اطباق بتري معقمة حاوية على أكار ومستخلص البطاطا والدكستروز (PDA) مع إضافة 40 ملغم/لتر كلوروفورم لمنع نمو البكتريا، بواقع خمس حبات في كل طبق، أربعة محيطية والخامسة في منتصف الطبق، حضنت الإطباق في درجة حرارة 25±2 مْ لمدة سبعة أيام (ميخائيل وبيدر، 1982). بعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية عزلات الفطر *A. ochraceus* بنقل قرص من كل مستعمرة وزرعه في طبق PDA جديد، كررت العملية لعدة مرات.

شخصت عزلة الفطر *A. ochraceus* اعتماداً على الصفات التصنيفية المظهرية والمجهرية Pitt (& Hocking , 2009)

2: حفظ عـزلات الـفـطـر *A. ochraceus*

نميت العزلات في انابيب اختبار تحوي كل منها على وسط PDA بصورة مائلة وحضنت في درجة حرارة 25±2 مْ ولمدة سبعة أيام ثم حفظت في الثلاجة لحين استعمالها في التجارب اللاحقة .

3: دراسة التأثيرات السمية لراشح الـفـطـر *A. ochraceus*في ذكور الجرذان البيض المختبرية:

تضمنت هذه الدراسة الخطوات التالية :

3-1: تحضير راشح الفطر :

حضر الوسط السائل PDB ثم وزع في ثلاثة دوارق مخروطية حجمها 500 مل بمعدل 250 مل لكل دورق، وبعد التعقيم والتبريد لقحت الدوارق ا بقرصين قطر 5 ملم من مستعمرة الفطر *A. ochraceus* بعمر أسبوع، وحضنت جميع الدوارق بدرجة حرارة 25±1 مْ ولمدة ثلاثة أسابيع. ثم رشح المستخلص خلال ورق الترشيح (Whatman N0.4) في قمع بوخنر، وأخذ الراشح ووزع في أنابيب اختبار معقمة وحضنت في الثلاجة لحين الاستعمال(الشبلي ، ١٩٩٨).

3-2: تهيـئة الجـــرذان وتجريعها :

استعمل في هذه التجربة 20 جرذا ذكرا وقسمت الى مجموعتين :

المجموعة الاولى: تضم 10جرذان تمت عمليـة التجريع عن طريق إعطاء المستخلص عن طريق الفم باستخدام الماصـــــة الدقيقة Micro pipette براشح الفطر *A. ochraceus* (بجرعة ا مل/100 غم للجرذ/يوم) .

المجموعة الثانية: تضم 10 جرذان تمت عمليـة التجريع عن طريق الفم باستخدام الماصـــــة الدقيقة Micro pipette بالمحلول الفسلجي (Normal saline)(بجرعة 1مل/100غم للجرذ/يوم) والتي مثلت معاملة السيطرة.

أجري التجريع ولمدة 30 يوم وبعد مرور يومين من آخر عملية حقن تم تضحية الحيوانات بعد ان خدرت بالكلوروفورم وشرحت عن طريق فتح التجويف البطني ولغرض إجراء الدراسة النسجية تم استئصال الكبد والكلية والطحال والرئة ثم غسلت جيدا بالمحلول الفسلجي (Normal saline) بعدها ثبتت بالفورمالين10% وبعدها تم تحضير المقاطع

النسيجية لتلك الأعضاء (Bancroft&Stevens ,1982 ;Klich ,2002).

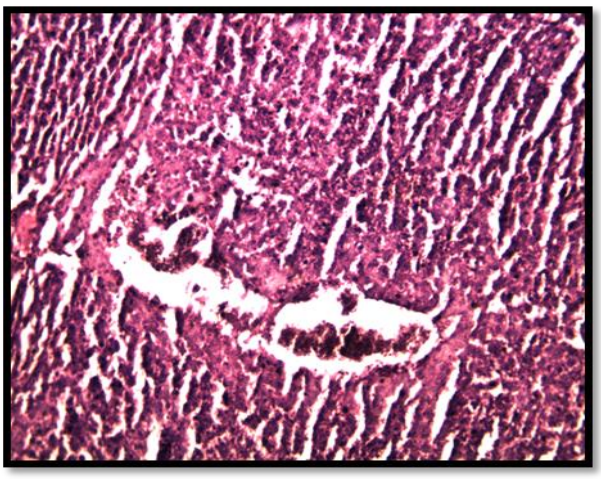
تشخيص التغيرات المرضية في المقاطع النسجية:
شخصت العينات من قبل الدكتور خليل كزار جلاب في كلية الطب البيطري /جامعة القادسية.

النتائج والمناقشة :

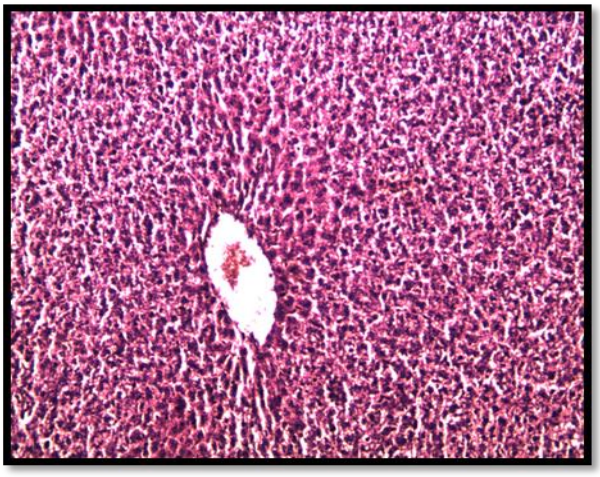
أظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من أكباد وطحال وكلى ورئة الجرذان التي تم حقنها براشح الفطر *A. ochraceus* وجود تغيرات مرضية واضحة في الكبد بفقدان البنيان الهندسي (شعاعيات الكبد) مع احتقان للوريد المركزي كذلك وجود تليف في نسيج الكبد وفرط تنسج hyperplasia في ظهارة القناة الصفراوية bile duct ومقارنة مع معاملة السيطرة (شكل 1أ - ب).

أظهرت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة للطحال وجود استفاذ في اللب الابيض و اختفاء للشرينات الصغيرة مع تكاثر في اللب الاحمر اي وجود انتفاخ احمر نتيجة تكاثر انسجة خلايا الطحال على نحو غير طبيعي Red bulb hyperplasia وبالمقارنة مع معاملة السيطرة (شكل 2 أ- ب)، إما بالنسبة لأنسجة الرئة فوجد ارتشاح حاد في الخلايا اللتهابية مع نزف حاد واحتقان في الأنسجة الرئوية كما إن هناك تسمك في النسيج البيني بين الاسناخ alveoli وإصابة القصيبات الرئوية والتي تميزت بتوسف (تساقط) وتنكس بالخلايا الطلائية التي تبطن القصيبات وكذلك وجود انتفاخ رئوي وبالمقارنة مع معاملة المقارنة (شكل 3 أ- ب). وفي المقاطع المأخوذة من أنسجة الكلية فان ابرز التغيرات المرضية التي لوحظت فيها توسع النبيبات الكلوية الملتوية مع تنخر حاد في الخلايا الطلائية المبطنة للنبيبات الكلوية كذلك وجد ارتشاح بالخلايا اللتهابية وضمور الكبيبات الكلوية وبالمقارنة مع معاملة المقارنة (شكل 4 أ- ب)

ان تفسير ذلك قد يعود الى طبيعة السموم الفطرية التي يفرزها الفطر *A. ochraceus* حيث وجد بان له القابلية على انتاج الافلاتوكسينات والاوكراتوكسين A الذي يعتبر من السموم الكلوية القوية والذي يسبب تشوهات خلقية (Aleksandra,*et.,al*.2009)
واشار(Richardson ,*et.al.*,1987) إلى تأثير الافلاتوكسينات في خلايا الكبد، إذ تؤدي إلى انحلال الخلايا البرنكيمية. هذه النتائج تتفق مع (Huseyin,*et.,al.* ,2004) كذلك تتفق مع (Jameel , 2011).

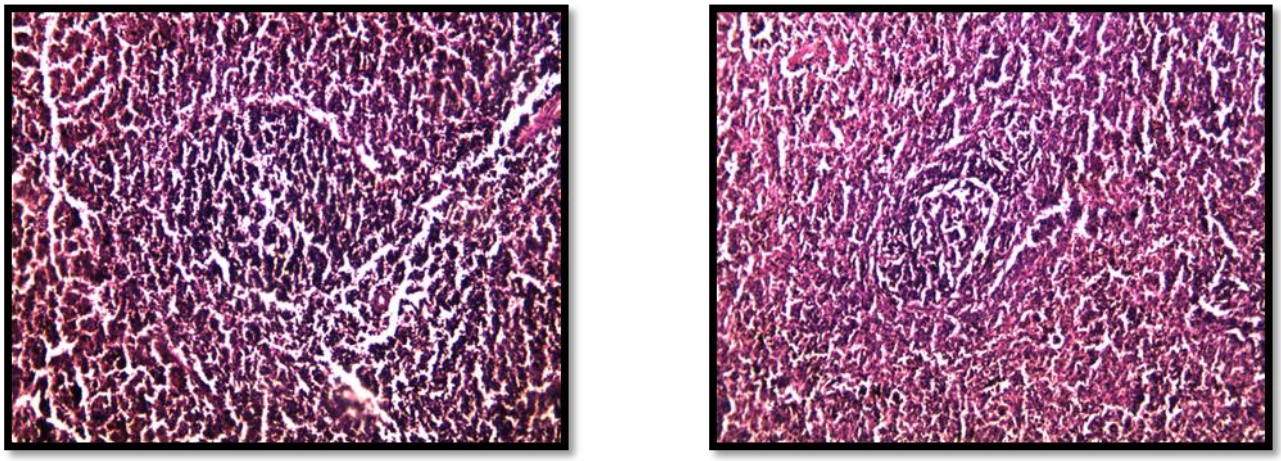


(أ)



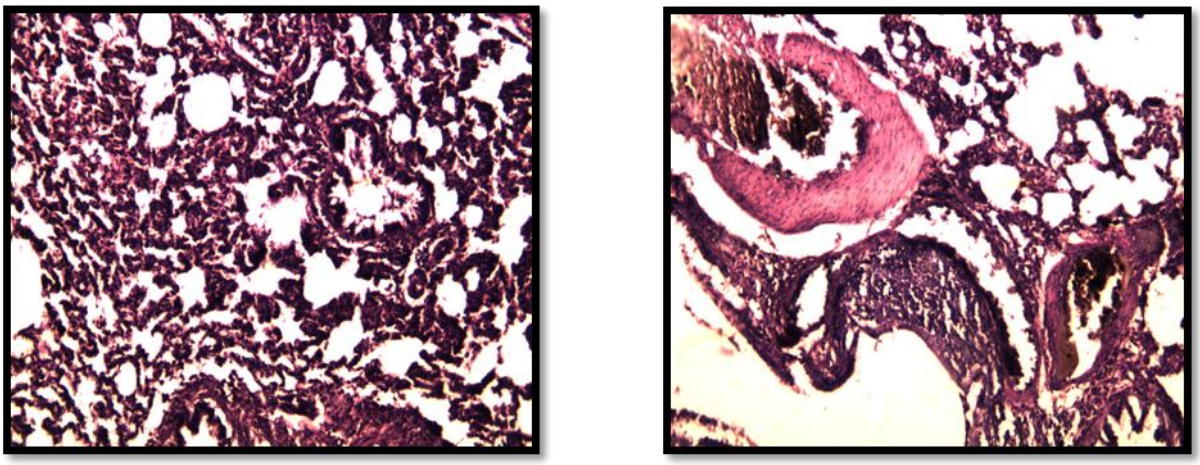
(ب)

شكل (1) : (أ) يوضح الشكل المقطع النسيجي لكبد الجرذان المعاملة براشح الفطر الخام (*A. ochraceus*)
(ب) يوضح الشكل المقطع النسيجي للكلية الجرذان المعاملة بالمحلول الفسلجي (Normal saline)



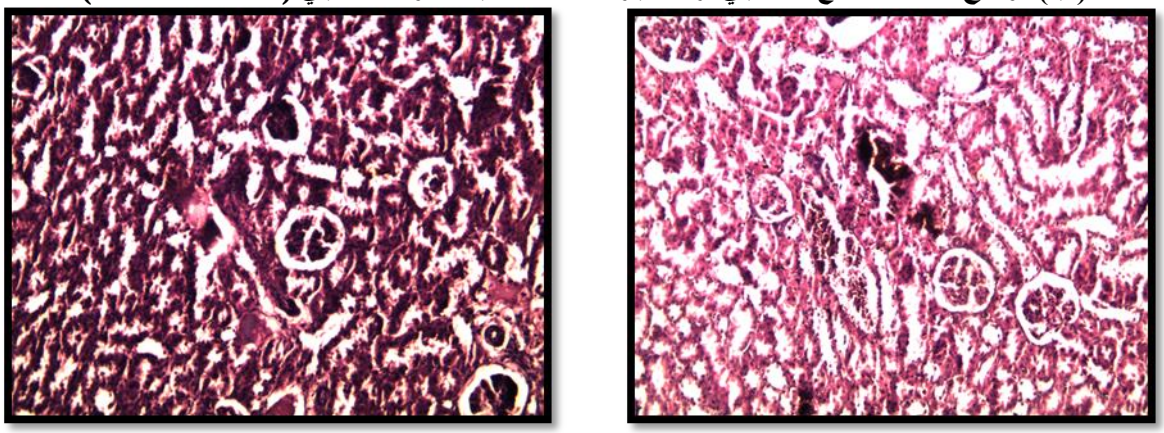
(ب) (أ)

شكل (2): يوضح الشكل المقطع النسيجي لطحال الجرذان المعاملة براشح الفطر الخام (*A.ochraceus*)
(ب) يوضح الشكل المقطع النسيجي للكلية الجرذان المعاملة بالمحلول الفسلجي (Normal saline)



(ب) (أ)

شكل (3) : (أ) يوضح الشكل المقطع النسيجي لرئة الجرذان المعاملة براشح الفطر الخام ((*A. ochraceus*))
(ب) يوضح الشكل المقطع النسيجي لرئة الجرذان المعاملة بالمحلول الفسلجي (Normal saline)



(ب) (أ)

شكل (4) : (أ) يوضح الشكل المقطع النسيجي للكلية الجرذان المعاملة براشح الفطر الخام ((*A. ochraceus*))
(ب) يوضح الشكل المقطع النسيجي لكلية الجرذان المعاملة بالمحلول الفسلجي (Normal saline)

المصادر: Reference

1. احمد، صلاح عمر (1988). تواجد الافلاتوكسينات في بعض النقل في الاسواق المحلية. رسالة ماجستير. كليةالزراعة. جامعةالموصل.
2. الشبلي، ماجد كاظم عبود. (١٩٩٨). المقاومة الحيوية للفطريات الممرضة و الفطريات الثانوية المرافقة لبذور الرز. رسالة ماجستير. كلية التربية/ جامعة القادسية.
3. عبد الحميد، محمد عبد الحميد (2000). الفطريات والسموم الفطرية .كلية الزراعة. جامعة المنصورة. دار النشر للجامعات. جمهورية مصر العربية .
4. ميخائيل، سمير وتركي بيدر، (1982). أمراض البذور. دار الكتب للطباعة والنشر- جامعة الموصل. 190 ص

5-Aleksandra S. Boaarov - Stanaia.; Aleksandra D. Miljkovia1; Radmila M. Resa novi a; Kseni ja D. Nesia;Vesna M. Jaaevia;Dani jela N. Mihal jai a1(2009). OchratoxinA in viro" biosynthesis by the Aspergillus ochraceus E'G isolate. N 117, 69—77.

6-Bancroft, J.D. and Stevens, A. (1982). Theory and practice of histological techniques . Churchill Living Stone , New York . 117

7-Council for Agricultural Science and Technology .(2003) . Mycotoxins Risk in plant , Animal , and Human Systems .Report No.139. Council for Agricultural Science and Technology. Ames Iowa. USA ISBNI– 887383–22.0. ISSN 0194 – 4088

8-Frisvad, J. C. and R. A. Samson .(1991). Mycotoxins produced by species of Penicillium and Aspergillus occurring in cereals. In: Chelkowski , J., (ed) Cereals grain . Elsevier Science Publishers , Amsterdam , P. P: 441- 476

9-Huwig, A., S. Freimund., O. Kappeli and H. Dulter. (2001). Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. Toxicology Letters. 122 : 179-188

10-IARC, (1993) . International Agency For Research on Cancer (IARC)– Summaries and Evaluation . Ochratoxin A (Group 2B) vol. 56. p: 489.

11-Klich M.A. (2002). Identification of common Aspergillus species, CBS, Utrescht. The Netherlands. 116.

12-Krishnamurthy, D.(2005). poultry halchal mycotoxicoses In poultry. www.vetcareindia.com/halchal_mycotoxicoses in poultry. htm.

13-Moura , M . A ., C. H . Machado., L .C. porfirio and R. B. Freire. (2004). Effects of Ochratoxin A on broiler Leukocytes. Bras. cienc. Avic. Vol. 6 No. 3.

14-Penny , M.K.,Y.P. Shaome , S.Joan, E.R.Hope, Z. Guixiang and D.E. Terry,(1999). Nuts and their bioactive constituents effects on serum lipids and factors that affect disease risk American Journal of clinical nutrition . Vol.7,No.3

15-Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). "Fungal and Food Spoilage". 3rd ed. London, U.K. Blackie Academic and Professional. 519 p.

16-Prasad, A.S., J.T. Fitzgerzial and B. Bao, (2000). Duration of symptoms and plasma cytokine levels in patients with zinc acetate. A randomized double blind, placebo- controlled trial Ann.Intren.med

17-Richardson, K.E. ; Nelson, L.A. and Hamilton, P.B. (1987). Effect of dietary fat levels on dose response relationships during aflatoxicosis in young chickens. Poultry science, 66(9): 1470-1478.

18-Scott .D .B .(1965). Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products Mycopath . Mycol . Appl . 25: 213 – 222.

19-Smith, J .W., C. W. Lewis., J. G. Anderson . and G. L. Solomons. (1994). Mycotoxin in human nutrition and health. Directorate General X I I: Science, Research and Development. EVR 16048 EN . P:111–117

20-Smith, J. E.; Solomans, G.L.; Lewis, C.W. and Anderson, J.G. , Ed. (1994). Mycotoxins in human nutrition and health. Directorate-General XII, science, Research and Development EVR, 16048 EN.

21-Huseyin, O.; Gulsen, A. & Nurten, O. (2004). Protective role of melatonin inOchratoxin A toxicity in rat heart and lung. J. of Appli. Toxicol., 24: 505-512.(Abstract).

22-Jameel, F. A. (2011). Pathological effects of Ochratoxin A in brain, heart and lung of chicks. Al-Anbar J. Vet. Sci., Vol.: 4 No. (2)

Toxic effects of fungus *Aspergillus ochrarous* isolated from the seeds of nuts in some of the histopathological changes of the male albino rat

Saba A . K . Ziadi
College of Science / University of Qadisiyah

Abstract

This study was conducted to demonstrate the pathological histological changes in the liver and spleen, lung and kidney of rats under the influence of crude filtrate of the fungus *A. ochraceus* growth of the potato extract and dextrose PDB white laboratory rats by dosage oral a dose of 1 ml / kg for a period of 30 days. The results of the tests textile to the impact of the filtrate raw fungus (*A. ochrarous* ill effects in some tissues of rats laboratory of causing loss of hepatic architecture ,with congestion of central vcins,also there is fibrous connective tissue formation. Also there is hyperplasia of bile ducts epithelium in the liver, as well as for the perfusion of water from the cells of the liver, leading to the dissolution of the cells to varying degrees, as well as the tissues of the lung infiltration of inflammatory cells,sever hemorrhage and congestion in the pulmonary tissue ,also there is thickening of interstitial tissue between alveoli.The bronchioles also attected , which characterized by desequenation and degeneration of epithelial cells which lining it , Also there is pnlmonary,and kidney is dilation of renal

convoluted tubules , Which sever necrosis in the epithelial cells, Which lining there tubules, Also there is infiltration of inflammatory cells.Atrophy of glomeruli also it present.. Either tissue spleen has I found the red swelling as a result of the division of tissue cells of the spleen in a way unnatural. And return the various changes to the nature of mycotoxins produced by the fungus mentioned above.