

**University of Mosul**  
**College of Agriculture and**  
**Forestry**



**Diagnosis of *Aspergillus flavus* and the Effect of Using  
Coumarin Compounds and *Lactobacillus plantarum* on the  
Growth of the Fungus and the Reduction of Aflatoxin B1  
Produced in Corn**

**Ban Ali Ahmed**  
**Ph.D. Thesis**  
**Plant Protection**

**Supervised by**

**Bassam Yahya Ibrahim, PhD**  
**Assistant Professor**

**Yasser Fakri Mustafa, PhD**  
**Professor**

---

**2023 A.D.**

**1444 A.H**

## Abstract

This study was conducted in the laboratories of the Departments of Plant Protection and Animal Production at the College of Agriculture and Forestry / University of Mosul, and the Pharmacognosy laboratory of the College of Pharmacy / University of Mosul for the period from 3/9/2020 to 4/5/2022. The aims at identifying fungi contaminating local maize samples in grain stores (Al-Hawija, Al-Hamdaniya and Tikrit) and the morphological diagnosis of these fungi, including *A. flavus*. It confirms the diagnosis of the fungus using primers specific to Polymerase chain reaction (PCR) technology. It also determines the susceptibility of isolates of *A. flavus* in the production of aflatoxin B1 (AFB1) and the identification of the most productive isolate of the toxin using High-performance liquid chromatography (HPLC). The growth and sporulation of *A. flavus* were examined *in vitro* using C1, C2 furanocoumarins, *Lactobacillus plantarum*, a toxin-binding preparation (Anpro), and CuSO<sub>4</sub>. In maize grains contaminated with *A. flavus* under storage conditions, the effectiveness of C1, C2 compounds, *L. plantarum*, Anpro, and CuSO<sub>4</sub> on inhibition of growth and sporulation as well as AFB1 production was evaluated. *In vivo*, quail birds that were fed with a food contaminated with AFB1 were given the aforementioned treatments, and the effects on several blood and biochemical parameters of the birds were examined.

The results indicate that the following fungi were isolated with varying frequency from maize grains in Al-Hawija, Al-Hamdaniya and Tikrit stores: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus Stolinifer*, *Rhizoctonia Solani*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*, and *Mucor sp.* *Aspergillus flavus* had the highest frequency rate of all isolates, with an average frequency of 37.8 %.

The diagnosis of the three isolates of *A. flavus* was confirmed by PCR technology. The results of electrophoresis analysis using agarose gel showed the appearance of three bands size 550bp.

The furanocoumarins 2-isoprenylxanthotoxin, symbolized here as C1, Besides, the C2 product is a derivative of isopimpinellin and chemically labeled 2-chloromethylisopimpinellin. These products were then identified by assessing their physicochemical properties and analyzing their Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), Nuclear magnetic resonance (NMR)  $^1\text{H}$ -NMR and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral data.

*In vitro* study, all treatments with different concentrations showed a decrease in colony growth, biomass, and sporulation for Al-hawija ,Al-Hmdaniya and Tikrit isolates.  $\text{CuSO}_4$  (0.04 mg/mL) and *L. plantarum* ( $1 \times 10^{10}$  cells/mL) treatments achieved the highest inhibition percentage for the colony growth. With  $\text{CuSO}_4$  (0.04 mg/mL) inhibiting 99.62%, 98.02%, and 98.72%, respectively, and *L. plantarum* inhibiting 96.49%, 99.32%, and 97.18%, respectively; while the lowest inhibition rates for Anpro (0.01 mg/mL) is 36.27%, 35.88%, and 30.73% respectively. The highest biomass inhibition in *Al-hawija* ,*Al-Hmdaniya* and *Tikrit* isolates are obtained in both  $\text{CuSO}_4$  (0.04 mg/mL) and *L. plantarum* ( $1 \times 10^{10}$ ) treatments. The  $\text{CuSO}_4$  gave inhibition rates of 92.01%, 93.01%, and 94.51% respectively. Bacterial resulted in inhibition rates of 94.58% 95.05%, and 95.58%, respectively. Whereas Anpro (0.01 mg/ml) resulted in inhibition rates of 32.64%, 32.11%, and 34.69% respectively.  $\text{CuSO}_4$  at different concentrations inhibited the total number of sporulation's by 100% in isolates from Al-Hawija, Al-Hamdaniya, and Tikrit, while exposure to Anpro treatment (0.01 mg/ml) gave the lowest inhibition rates of 37.72%, 32.11%, and 34.69%, respectively.

The results demonstrate the ability of *A. flavus* isolates AL-Hamdaniya, Tikrit, and Al-Hawija to produce AFB1 in rice grains by using HPLC technology with rate of 312, 214, and 207  $\mu\text{g}$  /g, respectively.

In storage, the experiment showed that all treatments had the ability to inhibit sporulation of *A. flavus* under storage conditions after 30 days. This effect diminished after 60 and 90 days of treatment. The ELISA results show

that all treatments reduced the concentration of AFB1 in corn contaminated with *A. flavus* isolates and differed significantly ( $p > 0.05$ ) from the positive control treatment under storage conditions. All treatments after 60 days achieved a reduction of AFB1 when compared after 30 days. Bacteria ( $1 \times 10^{10}$  cells/ml) treatment achieved the highest reduction of AFB1 after 30 and 60 days at 44.023 and 28.49 ppb respectively ; While the treatment of C1 (250  $\mu\text{g}$  /ml) gave the lowest reduction rate at 137.265 and 101.525 ppb respectively .

The results of the effect of the treatments *in vitro* the organism is enhanced by their results in the body of quail birds (*in vivo*), where the birds were fed with diet containing aflatoxin (7 mg / kg) and the treatments for 21 days, where the results show a significant improvement hematological and biochemical parameter compared with the group of birds that were given AFB1 only. According to the study, aflatoxin B1 contamination results in a considerable reduction in packed cell volume (PCV), red blood cell counts (RBC), hemoglobin (Hb), blood glucose, total blood protein, and superoxide dismutase (SOD) levels. Also, this contamination causes the number of total white blood cells (WBC) and the level of uric acid in the blood to significantly increase.

In regard to the number of red blood cells, white blood cells, and packed cell volume , Anpro treatment was the most effective, as it reached 3.0493  $33.086 \text{ cells/mm}^3$  and 40.667% respectively ;while C2 treatment gave the highest concentration of hemoglobin at 12.66g/dL.

In regard to uric acid ,SOD and glucose concentration, Anpro treatment achieved the highest effectiveness with 6.03mg/dL,  $2.03 \mu\text{mol}^{-1}$  and 165 mg/dL respectively; while Bacteria treatment gave the highest level of glucose at 158mg/dL.

The addition of *L. plantarum*,  $\text{CuSO}_4$ , Anpro, C1, and C2 to meals contaminated with aflatoxin B1 improved hematological and biochemical parameters.

## الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسمي وقاية النبات والإنتاج الحيواني في كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل ، ومختبر العقاقير في كلية الصيدلة / جامعة الموصل ، للفترة من 9/3 / 2020 إلى 2022/5/4 بهدف التعرف على الفطريات الملوثة لعينات الذرة المحلية في مخازن الحبوب (الحويجة والحمدانية وتكريت) والتشخيص المظهري لهذه الفطريات بما في ذلك فطر *Aspergillus flavus* ، بعد ذلك تم تأكيد تشخيص الفطر باستخدام بادئات خاصة بتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل ، وكذلك تحديد قابلية عزلات *A. flavus* على إنتاج الافلاتوكسين B1 (AFB1) وتحديد أكثر العزلات انتاجا للسم باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا عالية الاداء (HPLC) تم دراسة تأثير مركبات الفورانونوكومارين C1 ، C2 وبكتيريا *Lactobacillus plantarum* ومستحضر مقيد للسموم Anpro وكبريتات النحاس  $CuSO_4$  على نمو و تبويغ الفطر *A. flavus* مختبريا وتم تقييم كفاءة مركبات C1 ، C2 و *L. plantarum* و Anpro و  $CuSO_4$  على تثبيط نمو و تبويغ الفطر *A. flavus* وانتاج AFB1 باستخدام اختبار المقايسة الامتصاصية للانزيم المرتبط (ELISA) في حبوب الذرة الصفراء الملوثة بالفطر *A. flavus* تحت ظروف التخزين. وتم دراسة تأثير المعاملات السابقة الذكر على بعض المعلمات الدموية والكيميائية الحيوية لطيور السمان (في الجسم الحي) التي تم تغذيتها على عليقة ملوثة بالسم AFB1.

أشارت النتائج إلى عزل الفطريات التالية وبنسب تكرار متباينة من بذور الذرة في مخازن الحويجة والحمدانية وتكريت وهي *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* و *Rhizopus. Stolinifer* و *Rhizoctonia . Solani* و *Penicillium sp.* و *Fusarium sp.* و *Mucor sp.* وسجل الفطر *Aspergillus flavus* أعلى معدل تكرار لتردد العزل بمتوسط بلغ 37.8٪.

تم تأكيد التشخيص لعزلات الفطر *A. flavus* بالتشخيص الجزيئي باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل. أظهرت نتائج تحليل الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الاكاروز ظهور ثلاث حزم حجمها 550 زوج قاعدي.

تم اكتشاف اثنين من مركبات الفورانونوكومارين ، المركب الاول هو Isoprenylxanthotoxin يرمز له هنا بـ C1 ، والمركب الثاني chloromethylisopinpinellin يرمز C2 من بذور التفاح الذهبي تم تحديدها من خلال تقييم

خصائصها الفيزيائية والكيميائية وتحليل البيانات الطيفية بالأشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي للبروتون والرنين النووي المغناطيسي للكربون .

في الدراسة المختبرية ، أظهرت جميع المعاملات بتركيزات مختلفة انخفاضاً في مساحة المستعمرة والكتلة الحيوية وتكوين السبورات في عزلات الحويجة ، الحمداية وتكرت . حققت معاملات  $\text{CuSO}_4$  (0.04 مجم / مل) و  $L. plantarum$  ( $1 \times 10^{10}$  خلية / مل) أعلى نسبة تثبيط لمساحة نمو المستعمرة في جميع العزلات اذ بلغت في معاملة  $\text{CuSO}_4$  (0.04 مجم / مل) 99.62% و 98.02% و 98.72% على التوالي وفي معاملة  $L. plantarum$  96.49% و 99.32% و 97.18% على التوالي ؛ بينما كان أقل معدلات تثبيط لمعاملة Anpro (0.01 مجم / مل) بنسبة بلغت 36.27% ، 35.88% ، 30.73% على التوالي. تم الحصول على أعلى تثبيط للكتلة الحيوية في كلا معاملي  $\text{CuSO}_4$  (0.04 مجم / مل) و  $L. plantarum$  ( $1 \times 10^{10}$ ). أعطت معاملة  $\text{CuSO}_4$  في عزلات ا عزلات الحويجة ، الحمداية وتكرت معدلات تثبيط بلغت 92.01% ، 93.01% ، 94.51% على التوالي. نتج عن المعاملة بالبكتيريا معدلات تثبيط بلغت 94.58% و 95.05% و 95.58% على التوالي. بينما نتج عن المعاملة ب Anpro (0.01 مجم / مل) معدلات تثبيط بلغت 32.64% و 32.11% و 34.69% على التوالي. ثبط  $\text{CuSO}_4$  بتركيزات مختلفة تكوين سبورات الفطر بنسبة 100% في عزلات الحويجة والحمداية وتكرت ، بينما أعطت لمعاملة ب Anpro (0.01 مجم / مل) أقل معدلات تثبيط بلغت 37.72% ، 32.11% ، و 34.69% على التوالي.

أظهرت نتائج التجربة الخزنية في المختبر أن لجميع المعاملات قدرة على تثبيط تبويغ الفطر *A. flavus* تحت ظروف الخزن بعد 30 يوماً. وقل هذا التأثير بعد 60 و 90 يوماً من المعاملة.

أظهرت نتائج الكشف AFB1 باستعمال تقانة HPLC قدرة عزلات *A. flavus* (الحمداية وتكرت والحويجة) على إنتاج AFB1 في حبوب الرز بواقع 312 و 214 و 207 مايكوغرام/غرام<sup>1</sup> على التوالي

أظهرت نتائج اختبار ELISA أن جميع المعاملات قللت من تركيز AFB1 في حبوب الذرة الملوثة بعزلات الفطر *A. flavus* الثلاثة واختلفت معنوياً عن معاملة المقارنة تحت ظروف التخزين. حققت جميع المعاملات انخفاضاً في AFB1 بعد 60 يوم من التخزين بالمقارنة مع معاملات التخزين بعد 30 يوم . حققت معاملة البكتيريا  $L. plantarum$  ( $1 \times 10^{10}$  خلية .مل<sup>-1</sup>) أدنى محتوى

AFB1 بعد 30 و 60 يوم من التخزين بلغ 44.023 و 28.49 جزء بالمليون على التوالي ، بينما أعطت معاملة C1 (250 ميكروجرام .مل<sup>-1</sup>) أدنى معدل للاختزال بعد 30 و 60 يوما بلغ 137.265 و 101.525 جزء بالمليون.

تم تعزيز نتائج تأثير المعاملات خارج الكائن الحي من خلال نتائجها داخل طيور السمان (داخل الكائن الحي) ، حيث أظهرت نتائج دراسة تأثير معاملة عليقة طيور السمان بمركبات الفورانونوكومارين C1 ، C2 وبكتيريا *L. plantarum* ومستحضر Anpro وكبريتات النحاس CuSO<sub>4</sub> والملوثة بسموم AFB1 بواقع (7ملغم .كغم علف ) تحسناً ملحوظاً في المتغيرات الدموية والكيموحيوية مقارنة بمجموعة الطيور التي أعطيت السم فقط. حيث يؤدي تلوث الأفلاتوكسين B1 إلى انخفاض كبير في حجم الخلايا المعبأة (PCV) ، وعدد خلايا الدم الحمراء (RBC) ، والهيموغلوبين (Hb) ، وجلوكوز الدم ، وإجمالي بروتين الدم ، ومستويات انزيم ديسموتيز الفائق (SOD). كما يتسبب هذا التلوث في زيادة عدد خلايا الدم البيضاء الكلية (WBC) ومستوى حمض البوليك في الدم بشكل كبير.

فيما يتعلق بعدد خلايا الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء وحجم الخلايا المكدسة ، كانت معاملة Anpro الأكثر فاعلية إذ أعطت 3.0493 ، 33.086 ، خلية / مم<sup>3</sup> و 40.667% على التوالي ، بينما أعطت معاملة C2 أعلى تركيز للهيموجلوبين عند 66.12 جم / ديسيلتر.

فيما يتعلق بـحمض البوليك ، ومستويات انزيم ديسموتيز الفائق وتركيز الجلوكوز ، حقق علاج Anpro أعلى فعالية بـ 6.03 مجم / ديسيلتر ، 2.03 مايكرومول/لتر و 165 مجم / ديسيلتر على التوالي ؛ بينما أعطت معاملة البكتيريا أعلى مستوى للجلوكوز عند 158 ملجم / ديسيلتر.

أدت إضافة *L. plantarum* و CuSO<sub>4</sub> و Anpro و C1 و C2 إلى الوجبات الملوثة بالأفلاتوكسين B1 إلى تحسين المعيير الدموية والكيموحيوية.



جامعة الموصل

كلية الزراعة والغابات

تشخيص الفطر *Aspergillus flavus* وتأثير استخدام مركبات

الكيومارين وبكتريا *Lactobacillus plantarum* على نمو الفطر

واختزال سم الافلا B1 المنتج في الذرة

بان علي احمد

أطروحة دكتوراه

وقاية نبات

إشراف

الدكتور ياسر فخري مصطفى

أستاذ

الدكتور بسام يحيى ابراهيم

أستاذ مساعد