التحري عن مقدرة سلالات جرثومية معزولة من ترب محلية على التثبيط الحيوي لفطر *Aspergillus flavus* السام واختبار أولي لمقدرتها على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1

صابرين محفوظ (1)– أ.م.د. محمد بشير عرنوس (2)– أ.د. عبد السميع هنانو (3)

الملخص:

تُعد الأفلاتوكسينات سموماً حيوية المنشأ تُفرز بواسطة أنواع فطرية عديدة أبرزها فطر *Aspergillus flavus*، يصيب أنواعاً أساسية من المحاصيل الزراعية كالقمح والذرة والقطن والفول السوداني، والتوابل والمكسرات، والفواكه المجففة، ينجم عن ذلك فساداً للأغذية وجعلها غير صالحة للاستهلاك نظراً للعواقبها السمية الناتجة عن استهلاك المنتجات الملوثة متمثلة بحدوث خلل في الجهاز المناعي، ومشكلات في الخصوبة، واضطرابات في النمو؛ فضلاً عن التأثير الحاد بعد التسمم بهذه المركبات، إذ تعد مسؤولة عن التسبب بسرطان الكبد الذي يعد العضو الرئيس المستهدف عند التعرض للأفلاتوكسينات.

(1) طالبة دراسات عليا (دكتوراه)، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، الجمهورية العربية السورية، sabrin.mahfouz@damascusuniversity.edu.sy

(2) الأستاذ المشرف، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، الجمهورية العربية السورية، bashir.arnous@damascusuniversity.edu.sy

(3) الأستاذ المشرف المشارك، مدير بحوث، هيئة الطاقة الذرية السورية، الجمهورية العربية السورية، ashanano@oec.org.sy

نظراً للسعي الحثيث للحصول على منتجات غذائية خالية من التلوث الفطري ومفرزاتها من السموم (الذيفانات)، لاسيما بعد التزايد الكبير على طلب الغذاء، كان لابد من البحث عن بدائل حيوية قادرة على السيطرة على الفطريات السامة والحد من إفرازها للذيفانات.

تسلط هذه الدراسة الضوء على الفاعلية الحيوية المُحتملة لسلالات جرثومية معزولة من التربة؛ في كبح نمو فطر *Aspergillus flavus* ومنعه من إنتاج الأفلاتوكسين، وإجراء اختبار لمقدرتها على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 الأكثر ثباتية في تركيبه الكيميائي والأشد سمية. خلصت نتائج البحث إلى أن الفاعلية التضادية الحيوية لثمانية سلالات جرثومية تنتمي للأجناس *Acinetobacter, Bacillus, Pseudomonas* تمكنت من حصر نمو الفطر موضوع الدراسة، ومن بين هذه السلالات الموصّفة منعت سبع سلالات منها فطر *A. flavus* من إفراز الأفلاتوكسينات على وسط الزرع مقارنة مع الشاهد الايجابي. كما بينت نتائج التجربة الأولية لتفكيك سم B1 تفردت سلالتين تابعتين لجنس *Bacillus* بالقدرة على تفكيكه جزئياً واستعماله كمصدراً وحيداً للكربون والطاقة.

الكلمات المفتاحية:

التربة، الجراثيم، فطر *Aspergillus flavus* ، الأفلاتوكسينB1، التفكيك الحيوي.

Investigation of the ability of bacterial strains isolated from local soil to bioinactivate the toxic fungus *Aspergillus flavus* and a preliminary test of their ability to biodegrade aflatoxin B1

Sabrin Mahfouz (1) , Dr. Bashir Arnous (2)

Dr. Abdulsamie Hanano (3)

Abstract

Aflatoxins are biological toxins that are excreted by many fungal species. The most prominent is *Aspergillus flavus* which infects major crops like wheat, corn, cotton, peas, seasoning, nuts, and dried fruits, it results in spoilage in food rendering it not valid for consumption due to toxic consequences when eating contaminated products Among these influences immune system malfunction, fertility problems, growth disorders, as well as acute impact after poisoning by these compounds as It is considered responsible for causing liver cancer which is the main organ targeted when exposure to Aflatoxins.

(1) Ph.D. Student, Department of plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic، sabrin.mahfouz@damascusuniversity.edu.sy

(2) Supervisor, Department of plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syrian Arab Republic, bashir.arnous@damascusuniversity.edu.sy

(3) Share Supervisor, Research Director, Syrian Atomic Energy Commission, Syrian Arab Republic, ashanano@oec.org.sy.

Owing to the relentless pursuit of food products free of fungal contamination and their toxins, especially after increasing the demand for food, there was a need to look for bio-preservatives capable of controlling toxic fungi and reducing their secretions of toxins. this study highlights the potential bioactivity of bacterial strains isolated from the soil in curbing *Aspergillus flavus* growth, preventing excreting of aflatoxins, and testing their ability to biodegradation of B1; the most consistent in chemical structure and the most toxic.

The research results showed that antifungal activity for eight bacterial strains belongs to the genera *Acinetobacter, Bacillus,* and *Pseudomonas* that enabled to limit growth studied fungus. there were seven isolated of the characterized strains that prevented the fungus from producing the toxin in medium culture; in comparison with the controlled experiment, the results of the initial test of biodegradation of Aflatoxins demonstrated uniqueness of two strains following to *Bacillus* genus can partial degradation f B1 and use it like a source of carbon and energy.

Keywords:
Soil, Bacteria, *Aspergillus flavus,* Aflatoxin B1, Biodegradtion.

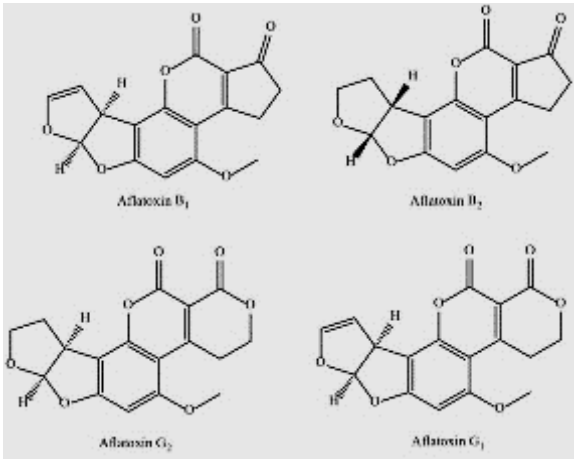
المقدمة:

السموم الفطرية Mycotoxins مستقلبات ثانوية تنتجها الفطريات الخيطية في الأغذية أو في الأعلاف [1] مما ينجم عنه تلفاً في المواد الغذائية وفساداً في العلف [2]؛ وبالتالي تأثيرات صحية بالغة تتراوح ما بين التسمم الحاد إلى آثار طويلة الأمد كالتسبب في العوز المناعي والإصابة بالسرطان لدى الإنسان والحيوانات التي تناولت الغذاء الملوث[3].

تُعد الأنواع الفطرية المنتجة للسموم التابعة لأجناس: *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Claviceps* الأكثر خطورة والأكثر شيوعاً في التسبب بالسمية [4]، من بين مئات عدة من السموم الفطرية المختلفة استحوذت ست مجموعات منها على أكبر قدر من الاهتمام تبعاً لأثرها السمي بالغ الشدة على الصحة وتهديدها لسلامة الغذاء ألا وهي: الأفلاتوكسينات aflatoxins، الأوكراتوكسينات ochratoxins، الباتولين patulin، الفيومونسنات fumonisins ، الزيارالينون zearalenone، التريكوثيسينات Trichothecenes (النيفالينول nivalenol، الديوكسي نيفانول deoxynivalenol ، مركبات T-2, HT-2) [5]، يُشار إلى الأفلاتوكسينات Aflatoxins بالمركبات الأشد سمية، إذ تُصنف ضمن المواد المسرطنة لتأثيرها في تركيب الـ DNA (Deoxyribonucleic acid) وتثبيط تصنيع الـ RNA (Ribonucleic acid) والبروتينات [6]، كما تسبب تشوهات الأجنة [7]. تُفرز من قبل سلالات فطرية عديدة إلا أن فطريات *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* هي الأكثر إفرازاً للأفلاتوكسينات [6، 8].

يمثل جنس *Aspergillus* مجموعة واسعة من الفطريات الأكثر وفرة حول العالم، والتي تتميز بمقدرتها على تحمل الظروف البيئية القاسية [9]، يصيب فطر *Aspergillus* طيفاً واسعاً من المحاصيل الزراعية الأساسية مثل: القمح، الشعير، الفول السوداني، الذرة، القطن، والرز، كما يصيب المكسرات والفواكه المجففة، مسبباً تلوثاً في الحليب ومشتقاته، وكذلك العصائر، فينتج عنه خللاً في جودة الغذاء وقابلتيه للاستهلاك [10، 11]. تؤدي مشكلة تلف الغذاء الناتج عن النمو الفطري إلى خسائر ضخمة في الإيرادات العالمية سنوياً؛ إذ تشير الدراسات أن ما يقارب 5–10% من الغذاء في العالم و50% من الفاكهة والخضراوات في المناطق الاستوائية تُتلف سنوياً بسبب الفساد الفطري Fungal spoilage، كما يتسبب الهجوم الفطري على القمح والذرة والرز بخسائر سنوية في الإنتاج الزراعي العالمي تقّدر بنحو 60 بليون دولار [12].

وفقاً للتركيب الكيميائي فإن الأفلاتوكسينات تشمل أربعة سموم رئيسية وهي: G2,G1,B2,B1[8]؛ يوضح الشكل 1 البنية الكيميائية لمركبات الأفلاتوكسين، ومن بين هذه المجموعات الأربع يعد الأفلاتوكسين B1 الأكثر انتشاراً في الغذاء والأشد سمية.



الشكل1: البنية الكيميائية لمركبات الأفلاتوكسين [13]

تعد الأفلاتوكسينات من حيث خواصها مركبات صلبة عديمة الرائحة، تمتلك قابلية الانحلال في المذيبات العضوية مثل الكلوروفورم والميتانول، كما تمتاز بمقدرتها على التألق عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية UV ؛ مما يتيح الكشف عنها وتحليلها وتحديد تركيزها بطرائق التحليل الكروماتوغرافي [14]، من الجدير بالاهتمام أن الأفلاتوكسينات تكون بصورة مركبات نقية مقاومة لدرجة حرارة الغليان؛ لذلك لا تتفكك في عمليات طهي المواد الغذائية (الغلي أو القلي)، أو أن تتحطم بشكل جزئي [15].

نظراً للخطورة العالية التي تسببها مركبات الأفلاتوكسين لسلامة الغذاء، وعواقب التسمم المهددة لصحة الكائنات الحية المستهلكة، تُبذل جهود حثيثة عالمياً

لاتخاذ تدابير عملية للوقاية والمعالجة الفعّالة من هذه السموم، فكان التوجه الأول نحو استعمال مواد كيميائية حافظة مثل: بروبيونات الكالسيوم calcium propionate، ثنائي أكسيد الكبريت sulfur dioxide، سوربات البوتاسيوم potassium sorbate تجنباً للفساد الناتج عن نمو الخمائر والأعفان، كان هذا حلاً ناجعاً لحدٍ ما؛ لكنه يتعارض مع هدف المنتجات الغذائية الخالية من المواد الكيميائية الاصطناعية [16].

ومن ثم الاستعانة بمجموعة من الطرائق الفيزيائية لنزع السموم الفطرية اعتماداً على استخدام الحرارة، التأين الإشعاعي، والأشعة فوق البنفسجية [17]، أو بالاعتماد على طرائق المعالجة الكيميائية من خلال استخدام الحموض، أو مواد ذات طبيعة قلوية، مرجعة، مؤكسدة، مكلورة [18].

حيث تبين عدم كفاءة هذه الطرائق نظراً لوجود سلالات فطرية تمتلك المقدرة على المقاومة، فضلاً عن التأثير السلبي لهذه الوسائل على جودة المنتجات الغذائية إضافة إلى تكلفتها الاقتصادية العالية؛ ومن هنا ظهرت الحاجة لإيجاد بدائل آمنة وفعّالة واقتصادية للتغلب على مشكلة التلوث الفطري للغذاء. إذ تم التوجه نحو استعمال البدائل الحيوية bio-preservatives بهدف الحفاظ على الأغذية وزيادة مدة صلاحيتها وذلك بالاعتماد على الأحياء الدقيقة أو الصادات الحيوية المُنتجة بواسطة هذه الكائنات [19–21]، إذ أثبتت دراسات علمية

الدور الحيوي الفعّال الذي تتميز به بعض أنواع الجراثيم في تثبيط نمو الفطور السامة [22] ومقدرتها على التفكيك الحيوي لهذه السموم لاسيما الأخطر والأشد سمية "الأفلاتوكسينات" [23، 24].

أهداف البحث:

1. التحري عن عزلات جرثومية تتسم بفعالية حيوية وتوصيفها جزيئياً.
2. اختبار الفعالية الحيوية للسلالات الجرثومية الموصّفة في تثبيط نمو الفطر السام *Aspergillus flavus*.
3. اختبار الفعالية الحيوية للسلالات الجرثومية في كبح إفراز فطر *A. flavus* للأفلاتوكسين B1.
4. دراسة المقدرة الحيوية الجرثومية على تفكيك الأفلاتوكسين بشروط المختبر.

المواد والطرائق:

1. جمع عينات التربة والزراعة الجرثومية:

جُمعت عينات التربة من أربع مناطق متفرقة (ريف دمشق: منطقتي معضمية الشام A، دير العصافيرB، حمص C، السويداء D) عُزلت جراثيم التربة بتحضير معلق حيث وُزِن 1 غ لكل عينة على حِدة وأُذيبت في 5 مل من محلول ملحي MSM (وسط أملاح معدنية Mineral salt medium)(نترات الصوديوم 4غ، فوسفات البوتاسيوم 3غ، كلوريد الأمونيوم 4غ، كبريتات المغنزيوم المائية 0.2غ، كلوريد الصوديوم 1غ، كلوريد البوتاسيوم 1غ، كلوريد الكالسيوم 0.1غ، فوسفات الصوديوم 0.2غ، كبريتات

الحديدي 0.001غ)، وُضعت الأنابيب في حمام مائي بدرجة حرارة 30 مْ، مع الرج بسرعة 105 دورة/دقيقة، 24 ساعة.

زُرع 100 ميكرولتر من معلق التربة على وسط منمي عام للأحياء الدقيقة "آغار مغذٍ Nutrient agar"، حُضنت الأطباق بدرجة حرارة 30 مْ، 24 ساعة. تبعاً لكثافة النمو الجرثومي عند الزرع مباشرةً، أُجريت سلسلة من التمديدات المتناقصة (10^3إلى 10^6)، وتمت الزراعة في الشروط سابقة الذكر.

2. توصيف العزلات الجرثومية:

تم تأكيد هوية العزلات الجرثومية على مستوى الجنس والنوع بتوصيفها جزيئياً اعتماداً على تقنية عالية الكفاءة تتمثل بسَلْسَلِة المورثة 16S rRNA، إذ تم العمل وفق الخطوات الآتية:

- **عزل الدنا الجينومي gDNA من العزلات الجرثومية النقية:**

استُخلص DNA باستخدام (DNA extraction KIT- QIAGENE) وفق المراحل المرفقة مع كعيدة الاستخلاص، بعد زراعة العزلات الجرثومية المدروسة في 10 مل وسط LB (Luria–Bertani) السائل، وحُضنت أنابيب الزرع بدرجة حرارة 30 مْ، مع الرج بسرعة 110 دورة/دقيقة، 24 ساعة.

- **تضخيم المورثة 16S rRNA باستعمال تقانة PCR (polymerase chain reaction):**

أُجري تضخيم المورثة 16S rRNA من الدنا الجينومي تركيز 200 نانوغرام/مل بحجم تفاعل نهائي25 ميكرولتر، استُخدمت المواد الكيميائية التالية في التفاعل: محلول موق Taq polymerase buffer(تركيز 10x)، نكليوتيدات حرّة منقوصة الأكسجين dNTPs (dioxynucliotid triphosphat) (25 ميلي مولر mM)، كبريتات المغنزيوم MgSO4 3 ميلي مولر)، إنزيم البلمرة Taq polymerase(U 1.5)، بادئات Primers (16S rRNA Forward , 16S rRNA Reverse) تركيز 10 ميكرومول، بالتسلسل الموضّح في الجدول1، عينة DNA ، ماء مقطر (منزوع الشوارد) عقيم لإتمام حجم التفاعل. عند إجراء التفاعل استُعملت عينة DNA مدروسة سابقاً كشاهد إيجابي، تم التضخيم باستعمال جهاز Thermal cyclers، وفق المراحل الآتية: المرحلة الأولى رفع الحرارة لدرجة 94 مْ مدة خمس دقائق، يليها 35 دورة (فك الارتباط Denaturation بدرجة حرارة 94 مْ، الالتحام Annealing 58 مْ ، الاستطالة Extention 72 مْ) مدة كل مرحلة دقيقة واحدة، والمرحلة الأخيرة بدرجة حرارة 72 مْ مدة عشرة دقائق.

الجدول1: تسلسل البادئات المستعملة لتفاعل PCR.

البادئة	التسلسل النكليوتيدي	حجم ناتج ال PCR Amplicon(bp)
S rRNA 16F	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG3' 5'	500
S rRNA 16R	5' GCCCGGGAACGTATTCACCG3'	

رُحّلت قطع DNA بعد تضخيمها على هلامة الأغاروز تركيز 1% ، تمت قراءة تتالي النكليوتيدات لنواتج تضخيم المورثة 16S rRNA باستعمال جهاز(ABI 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)- قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية– هيئة الطاقة الذرية السورية.

تمت مقارنة تسلسل المورثة 16S rRNA الخاص بكل عزلة بالتسلسلات الموجودة في قاعدة البيانات الخاصة بالمعلومات الوراثية (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) NCBI باستعمال برنامج خاص بقراءة تتالي النكليوتيدات (Chromas- version 2.6.6)، وبناءً عليه حُدد جنس ونوع كل عزلة على حِدة، تلا ذلك حفظ السلالات الجرثومية ضمن وسط LB سائل، بدرجة حرارة 4 مْ لحين إتمام التجارب المخبرية.

3. انتقاء سلالات جرثومية مُثبت مرجعياً مقدرتها على تفكيك السموم الحيوية:

بعد التوصيف الجزيئي انتُقيت الأنواع الجرثومية وفق تنوع مقدراتها الحيوية في تثبيط نمو أحد أنواع الفطور السامة، ومقدرتها على التفكيك الحيوي لأنواع مختلفة من الملوثات

العضوية المعندة، من ضمنها السموم الفطرية (الميكوتوكسينات) مرجعياً، حيث تم التحري عن مقدرة تسع سلالات جرثومية تنتمي إلى الأجناس *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* على التثبيط الحيوي لنمو الفطر المدروس، وتفكيك الأفلاتوكسين B1.

4. اختبار التضادية الحيوية للسلالات الجرثومية في تثبيط نمو فطر *Aspergillus flavus*:

في أولى مراحل العمل تم تنشيط نمو الفطر *Aspergillus flavus* على وسط مغذي خاص بزراعة الفطريات ديسكتروز بطاطا آغار Patato Dextrose Agar "PDA"، ديكستروز بطاطا سائل Patato Dextrose Browth "PDB"، تم الحضن في درجة حرارة 28 مْ، ولمدة أسبوع.

دُرست الفاعلية التضادية للسلالات الجرثومية على وسط مغذي ملائم لنمو الأحياء الدقيقة LB (Luria–Bertani)؛ حُضّر معلق بوغي بأخذ مسحة من أبواغ الفطر النامي على وسط الزرع بعمر 5 أيام وحُلت ضمن وسط ملحي معقم MSM، غُمست أقراص الترشيح العقيمة بالمعلق البوغي، ثم نُقلت باستعمال الملقط المعقم وغرست في منتصف الوسط المغذي، باستعمال إبرة الزرع زُرعت مسحة مأخوذة من السلالة الجرثومية المدروسة في الزوايا الأربعة حول نقطة الزراعة الفطرية. حُضنت الأطباق بدرجة 28 مئوية، لمدة

أسبوع. ومن ثم تتبع نمو الفطر بوجود السلالة الجرثومية لدراسة التأثير التثبيطي المُحتمل.

5. دراسة التأثير الجرثومي في إفراز فطر *Aspergillus flavus* للأفلاتوكسين B1:

بعد تقييم كفاءة الجراثيم المدروسة حيوياً بتثبيط نمو الفطر، اختُبرت مقدرتها في الحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1، بزراعة النوع الجرثومي في وسط زراعة سائل LB Broth 25 مل وذلك بأخذ مسحة من النوع الجرثومي المدروس ومزجها ضمن سائل الزراعة، ثم مزج 500 ميكرولتر من المعلق البوغي ضمن الوسط، حُضنت الأنابيب في حمام مائي مضبوطة حرارته 28 مْ، ورج 100 دورة/دقيقة، ولمدة أسبوع. كما حُضّر أنبوب زراعة شاهد مزروع ضمنه الفطر المدروس فقط، وذلك بهدف دراسة الفرق بين المقدرة الجرثومية المُحتملة في تثبيط إفرازه للأفلاتوكسين B1، وإنتاجه للسم عند النمو في الوسط الزرعي بغياب النوع الجرثومي المثبط. بعد أسبوع التجربة استُخلص الأفلاتوكسين B1 بالطريقة الآتية [25]:

1. نُقل أنبوب الزراعة السائل 14000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق.
2. نُقل السائل الطافي إلى أرلينة زجاجية، ثم أُضيف 100 مل من المذيب العضوي الكلورفورم، ثم وُضعت العينة على الرجاج مدة ساعة.
3. رُشح الوسط باستعمال ورقة ترشيح مُضاف لها سلفات الصوديوم، كُرر الترشيح مرتين.

4. تم تبخير العينة باستعمال جهاز المبخر الدوار بعد ضبط حرارته 40 درجة مئوية، والضغط 474 مللي بار.
5. بعد تمام التجفيف حُلت العينة في 500 ميكرولتر من الكلورفورم.
6. اختبر إنتاج الأفلاتوكسين بطريقة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography "TLC" بترحيل العينة على صفيحة السيلكا، ضمن محلول الترحيل المركب من: كلورفورم، أسيتون 1:9.
7. تم ملاحظة تألق الأفلاتوكسين المفرز أو غياب وجوده في العينات بواسطة جهاز وحدة الكشف بالأشعة فوق البنفسجية UV.

6. اختبار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 بواسطة السلالات الجرثومية المدروسة:

بعد دراسة الفاعلية التضادية للسلالات الجرثومية في التثبيط الحيوي لنمو الفطر والحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1، تم إجراء اختبار أولي للمقدرة الحيوية للأنواع الجرثومية المدروسة على تفكيك الأفلاتوكسين؛ وذلك بزراعة النوع الجرثومي ضمن وسط ملحي فقير بالمواد المغذية MSM يحتوي على B1 كمصدر وحيد للكربون والطاقة بتركيز 20 نانوغرام/ميكرولتر، في ظروف حضن: درجة الحرارة 30 مْ، والرج 115 دورة/دقيقة، مدة ستة أسابيع.

تم تتبع التدرك الحيوي للأفلاتوكسين بواسطة الجراثيم أسبوعياً بترحيل 10 ميكرولتر من وسط الزراعة على صفيحة السيلكا، ومقارنة التألق تحت أشعة UV مع الشاهد وسط الزراعة والأفلاتوكسين المضاف للوسط فقط.

نتائج البحث:

1. التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية المعزولة من التربة:

وُصّفت العزلات الجرثومية المعزولة من الترب جزيئياً بناءً على تسلسل المورثة 16S rRNA بعد تضخيمها بتفاعل PCR ، إذ حُدد هوية 107 سلالات جرثومية، وُثق التسلسل النكليوتيدي للسلالات الجرثومية الموصّفة على مستوى الجنس والنوع والأعلى موثوقية في قاعدة البيانات NCBI GeneBank databases تحت أرقام تعريفية (GenBank ID: from MW475085 To MW475154). بينت نتائج البحث أن جنس *Bacillus* كان الأكثر وفرة ضمن عينات التربة المدروسة حيث شكّل 37.38% من مجموع العزلات الجرثومية المدروسة، يليه الجنسان *Pseudomonas* و *Acinetobacter* بنسبة 21.49%،14.01% على الترتيب، الجدول 2.

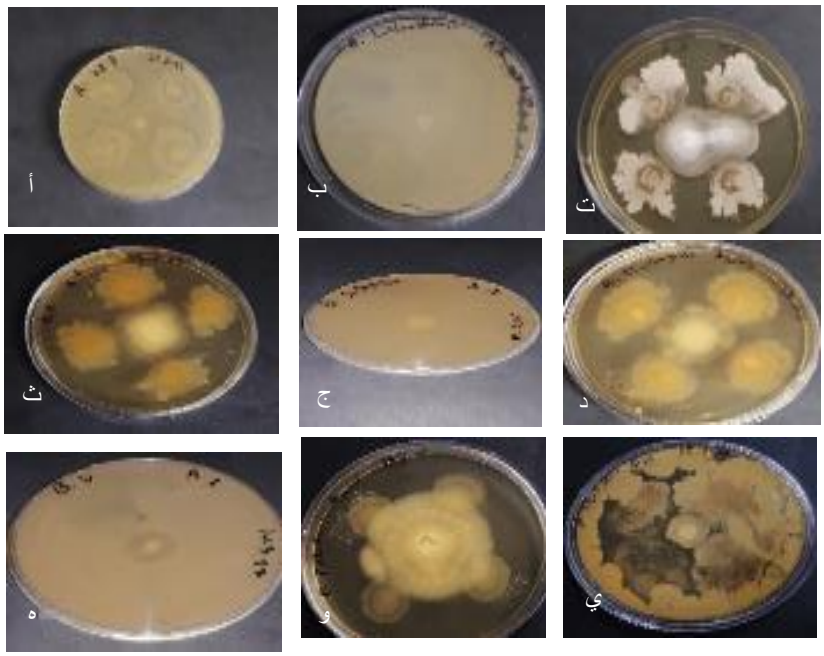
الجدول 2: نتائج التوصيف الجزيئي للأنواع الجرثومية المنتقاة بهدف دراسة مقدراتها الحيوية

الجنس	النوع المدروس	السلالة	الرقم التعريفي 16S rDNA Accession N
Acinetobacter	A. *baumannii*	B3c	MW475140
Bacillus	*B. licheniformis*	A1-3a	MW475094
	B. megaterium	A3-2f	MW475117
	B. pumilus	A3-3g	MW475123
	B. thuringiensis	A3-2j	MW475119
	B. subtilis	A1-2f	MW475093
	B. velezensis	A1-3d	MW475097
Pseudomonas	*P. putida*	A1-1d	MW475087
	P. stutzeri	D2e	MW475152

2. التضادية الحيوية للسلالات الجرثومية ضد فطر *Aspergillus flavus*:

بينت نتائج اختبار الفاعلية الحيوية للسلالات الجرثومية في تثبيط نمو فطر *Aspergillus flavus* مقدرة ثمان سلالات من بين السلالات التسع المدروسة على الحد من نمو الفطر على وسط الزرع LB :

A. baumannii، *B. licheniformis*، *B. megaterium*، *B. pumilus*، *B. thuringiensis*، *B. subtilis*، *B. velezensis*، *P. stutzeri*. حيث تمثل الأثر التثبيطي في الحد من نمو الفطر تبعاً لقطر مستعمرة الفطر مقارنة بنمو مستعمرة الفطر الشاهد، كما تشكلت هالة تثبيط حول الفطر دلالة على الفاعلية التضادية عند السلالتين *B. subtilis*، *B. velezensis*. على خلاف ذلك تبين أن السلالة غير فعالة في تثبيط نمو الفطر *P. putida*، ومنعه من التبوغ؛ إنما التأثير كان عكسياً إذ نمى الفطر على حساب الجراثيم النامية. يوضح الشكل 2 نتائج اختبار التضادية.



الشكل 2: صور توضيحة لنتائج اختبار التضادية الحيوية لسلالات الجرثومية المدروسة: أ. *A. baumannii*، ب. *B. licheniformis*، ت. *B. megaterium*، ث. *B. pumilus*، ج. *B. subtilis*، د. *B. thuringiensis*، ه. *B. velezensis*، و. *P. putida*، ي. *P. stutzeri*.

3. تثبيط إفراز فطر *Aspergillus flavus* للأفلاتوكسين B1:

بينت نتائج التجربة أن سبع سلالات من بين السلالات المدروسة تمكنت من كبح نشاط الفطر، إذ ثبطت مقدرته على إنتاج الأفلاتوكسين ضمن وسط الزراعة، بينما السلالتين التابعتين لجنس *Pseudomonas* لم تتمكن من حد إفراز الأفلاتوكسين الجدول 3.

الجدول 3: نتائج مقدرة السلالات الجرثومية على تثبيط إفراز B1.

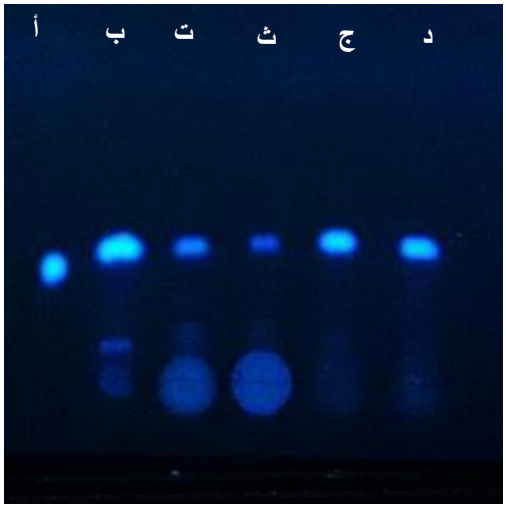
الجنس الجرثومي	النوع الجرثومي	نتيجة تثبيط إفراز B1 (+التثبيط/–التثبيط)
Acinetobacter	A. *baumannii*	+
Bacillus	*B. licheniformis*	+
	B. megaterium	+
	B. pumilus	+
	B. thuringiensis	+
	B. subtilis	+
	B. velezensis	+
Pseudomonas	*P. putida*	–
	P. stutzeri	–

4. اختبار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 بواسطة السلالات الجرثومية المدروسة:

تم تتبع نمو الجراثيم ضمن وسط الزراعة المضاف إليه الأفلاتوكسين كمصدراً وحيداً للطاقة أسبوعياً، في ختام أسابيع التجربة تبين حدوث تفكك جزئي لمركب B1 بواسطة سلالتين *B. megaterium , B. pumilus*، لُوحظ ذلك من خلال انخفاض التألق الواضح تحت أشعة UV مقارنة مع تألق 1 ميكرولتر من مركب العياري، وتألق العينة الشاهد الحاوية على الوسط المُستعمل المُعامل بالأفلاتوكسين فقط؛ مما يدل على انخفاض تركيزه في الوسط. وذلك على

خلاف بقية السلالات الجرثومية التي لم تتمكن من التعامل مع السم وتفكيكه.

يوضح الشكل 3 نتيجة الاختبار واختلاف التألق بين العينات المدروسة.



الشكل 3: صورة توضيحية للمقارنة بين التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين، تبين نتائج الترحيل على صفيحة السيلكا تحت أشعة UV **للعينات في الترتيب الآتي: أ. الأفلاتوكسين العياري، ب. الوسط مضافاً إليه الأفلاتوكسين، ت. الوسط الملقح بالسلالة** *B. megaterium*، **ث. الوسط الملقح بالسلالة** *B. pumilus*، **ج. الوسط الملقح بالسلالة** *B. subtilis* ، **د. الوسط الملقح بالسلالة** *B. velezensis*.

المناقشة:

توافقت نتائج دراسة الفاعلية التضادية المميزة للأجناس الجرثومية: *Acinetobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* مع دراسات سابقة تبرهن الدور الحيوي الذي تؤديه هذه الأجناس، إذ بينت دراسة في عام 2016 النشاط المضاد لفطر *Aspergillus* بواسطة مستقلبات ثانوية طيارة تفرزها عصيات *Acinetobacter baumannii* [26]، كما أكدت دراسة لنشاط جراثيم *B. licheniformis* ودورها في تثبيط نمو نوعين تابعين لجنس

Aspergillus: A. *flavus* ، *A. parasiticus* بنسبة 49%، 47% على الترتيب [27]، لكن على خلاف الدراسات السابقة [28، 29] التي أثبتت مقدرة حيوية عالية بنسبة 93.6% لم تمتلك السلالة الجرثومية المدروسة فاعلية في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين.

أما جنس *Bacillus Megaterium* تبين دراسة دور الببتيدات المفرزة بواسطة هذا النوع أثراً تثبيطياً في نمو فطر *Aspergillus flavus* ومنعه من تشكيل الأبواغ إضافة لتثبيط مقدرته على إفراز الأفلاتوكسين [30]، وهذا ماتم إثباته بالسلالة المدروسة في البحث من ناحية الفاعلية المميزة التي أبدتها في التضادية الحيوية ضد الفطر ومفرازته السامة.

كذلك وصّف في دراسات سابقة فاعلية التثبيط الحيوي لأنواع من الفطريات السامة من بينها فطر *Aspergillus* بواسطة مستقلبات حيوية مقاومة للحرارة، ولاختلاف درجات حموضة الوسط مُفرزة بواسطة *B. pumilus* [31، 32].

يشتهر جنس *B. thuringiensis* في استثمار مقدراته في عمليات المكافحة الحيوية للآفات والممرضات النباتية[34 ,33]، والفطور السامة لعل أهمها *A. flavus* [35] وهذا ما تم تأكيده في دراستنا، إذ ثبط النوع المذكور نمو الفطر وتبوغه.

تؤكد أبحاث عديدة تنوع الأدوار الحيوية للنوع الجرثومي *B. subtilis* أبرزها السيطرة الحيوية على فطر *A. flavus* [22، 36]، وهذا ماتم إثباته في دراستنا، حيث حدت من نمو الفطر المدروس، كما يتميز جنس *B. subtilis* بمقدرته الحيوية على تفكيك سموم

عضوية معندة وشديدة الثباتية أهمها الأفلاتوكسين B1 [37، 38]؛ لكن بخلاف ذلك لم تتمكن السلالة المدروسة في بحثنا من النمو بوجود الأفلاتوكسين.

كما تؤكد دراسات عديدة حول النشاط المضاد للفطر الذي تتميز به *B. velezensis* من قبل الببتيدات الدهنية المفرزة بواسطة خلاياها؛ والتي تمكنها من كبح إنتاش الأبواغ، والحد من نموه الإعاشي [24، 39]. توافق نتائج اختبار التضادية الحيوية في هذا البحث نتائج الأبحاث السابقة إذ أبدت السلالة المدروسة دوراً تثبيطياً تمثل بنمو محدود للفطر وتشكل هالة تثبيط أحاطت بالمستعمرة الفطرية. على نقيض ذلك اختلفت نتائج هذا البحث مع الدراسات السابقة إذ لم تبدِ السلالة المدروسة فاعلية في منع الفطر من إنتاج سمه، كما لُوحظ غياب مقدرتها على النمو بوجود الأفلاتوكسين، قد يُفسر ذلك باختلاف ظروف الزراعة مع الأبحاث السابقة التي تشير لحضن المستخلص الجرثومي بحرارة 80 مْ، أدى ذلك لتفكيك عالي الفاعلية وصل لنسبة 94.70% [24].

تتميز الأنواع الجرثومية التي تنتمي لجنس *Pseudomonas* بتنوع أدوارها الحيوية في تفكيك سموم عضوية مختلفة، كذلك فعاليتها التضادية في تثبيط الفطر المدروس، اختلفت هذه الدراسة مع دراسات سابقة تبرهن دور *P. putida* في تثبيط نمو الفطر وكفاءتها في تفكيك مركب B1 بواسطة إنظيمات كإنظيم الليباز[40، 41]. ويُفسر ذلك لعدم توافر الظروف اللازمة لتحفيز إنظيمات التفكيك الحيوي عند النوع المدروس من درجة الحرارة ودرجة الحموضة pH الملائمة.

أما النوع الجرثومي *P. stutzeri* فتبين دراسة حديثة في عام 2022 كفاءة عالية في التثبيط الحيوي تُقدر بنسبة 100%، وفاعلية عالية في منعه من إفراز السم [42]، توافق نتائج البحث مع الدراسة المذكورة من ناحية المقدرة التثبيطية لنمو الفطر، لكن اختلفت معها بالكفاءة في منع الفطر من إفراز السم.

تُعد نتائج اختبار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين واعدة لاستثمار المقدرة الحيوية للسلالتين في عمليات المعالجة الحيوية لعينات غذائية ملوثة، كما يمثل ماتم استخلاصه من نتائج نواة لأبحاث متطورة تهدف للتعمق بمسار التفكيك الحيوي ودراسة الآلية الدقيقة لتثبيط الفطر والسيطرة الحيوية على إنتاجه لمستقلباته السامة، وتفكيك مركب B1 الأشد سمية في الوسط الملوث به.

الاستنتاجات:

1. أثمر عن البحث توصيف جزيئي لجراثيم معزولة من الترب المحلية.
2. تبين نتائج هذه الدراسة الدور الحيوي لسلالات من هذه الجراثيم في التثبيط الحيوي لنمو فطر *Aspergillus flavus* شديد السمية، كما تم تأكيد مقدرة سبع سلالات جرثومية على الحد من نشاط الفطر ومنعه من إفراز B1 في وسط الزراعة.
3. يقدم البحث دليلاً على تفرد سلالتين جرثوميتن *B. megaterium , B. pumilus* على تفكيك مركب B1 واستعماله كمصدر للكربون والطاقة.

التوصيات:

1. متابعة التحري عن مقدرة السلالات الجرثومية التي أبدت فاعلية إيجابية في الاختبار الأولي للتفكيك الحيوي لمركب الأفلاتوكسين B1 من خلال الكشف الدقيق عن مستويات تفككه وذلك بطرائق الكروماتوغرافيا عالية الدقة.
2. استثمار الدور الحيوي الفعّال التي تؤديه جراثيم الترب في تفكيك الملوثات العضوية المعندة، وتحسين خصوبة التربة، وتعزيز نمو النباتات وحمايتها من الممرضات والآفات.

قائمة المراجع:

.1 Daou, R., Joubrane, K., Maroun, R. G., Khabbaz, L. R., Ismail, A., & El Khoury, A. (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. AIMS Agriculture and Food, 6(1), 416-447

.2 Iqbal, S. Z. (2021). Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. Current Opinion in Food Science, *42*, 237-247.

.3 YANG, Y., LI, G., WU, D., LIU, J., LI, X., LUO, P., ... & WU, Y. (2020). Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. Trends in food science & Technology, *96*, 233-252.

.4 HAMAD, G. M., MEHANY, T., SIMAL-GANDARA, J., ABOU-ALELLA, S., ESUA, O. J., ABDEL-WAHHAB, M. A., & HAFEZ, E. E. (2023). A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. Food Control, *144*, 109350..

.5 ALSHANNAQ, A., & YU, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. International journal of environmental research and public health, *14*(6), 632

.6 COPPOCK, R. W., CHRISTIAN, R. G., & JACOBSEN, B. J. (2018). Aflatoxins. In Veterinary toxicology (pp. 983-994).

.7 BENKERROUM, N. (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. International journal of environmental research and public health, *17*(2), 423.

.8 EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM), SCHRENK, D., BIGNAMI, M., BODIN, L., CHIPMAN, J. K., DEL MAZO, J., ... & WALLACE, H. (2020). Risk assessment of aflatoxins in food. Efsa Journal, *18*(3), e06040.

.9 CHO, H. J., SON, S. H., CHEN, W., SON, Y. E., LEE, I., YU, J. H., & PARK, H. S. (2022). Regulation of Conidiogenesis in Aspergillus flavus. Cells, 11(18), 2796.

.10 AWUCHI, C. G., AMAGWULA, I. O., PRIYA, P., KUMAR, R., YEZDANI, U., & KHAN, M. G. (2020). Aflatoxins in foods and feeds: A review on health implications, detection, and control. Bull. Environ. Pharmacol. Life Sci, *9*, 149-155.

.11 El-SAYED, R. A., JEBUR, A. B., KANG, W., & EL-DEMERDASH, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. Journal of Future Foods, *2*(2), 91-102.

.12 VARSHA, K. K., & NAMPOOTHIRI, K. M. (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. Food Control, *69*, 61-64.

.13 BAKIRCI, G. T. (2020). Investigation of aflatoxins levels in commercial dried figs from western Turkey. International Food Research Journal, *27*(2), 245-251.

.14 NAZHAND, A., DURAZZO, A., LUCARINI, M., SOUTO, E. B., & SANTINI, A. (2020). Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. Foods, *9*(5), 644.

.15 KUMAR, P., MAHATO, D. K., KAMLE, M., MOHANTA, T. K., & KANG, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern

for food safety, human health and their management. Frontiers in microbiology, *7*, 2170.

.16 LEYVA SALAS, M., MOUNIER, J., VALENCE, F., COTON, M., THIERRY, A., & COTON, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review. Microorganisms, *5*(3), 37.

.17 JAMES, A., & ZIKANKUBA, V. L. (2018). Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Sahara Africa. Food Control, *90*, 372-381.

.18 KARLOVSKY, P., SUMAN, M., BERTHILLER, F., DE MEESTER, J., EISENBRAND, G., PERRIN, I., ... & DUSSORT, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. Mycotoxin research, *32*, 179-205.

.19 IORDACHE, F., GHEORGHE, I., LAZAR, V., CURUTIU, C., DITU, L. M., GRUMEZESCU, A. M., & HOLBAN, A. M. (2017). Nanostructurated materials for prolonged and safe food preservation. In Food preservation (pp. 305-335).

.20 DEY, S., & NAGABABU, B. H. (2022). Applications of food color and bio-preservatives in the food and its effect on the human health. Food Chemistry Advances, *1*, 100019.

.21 SINGH, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-a review. Open veterinary journal, *8*(1), 104-111.

.22 FARZANEH, M., SHI, Z. Q., AHMADZADEH, M., HU, L. B., & GHASSEMPOUR, A. (2016). Inhibition of the Aspergillus flavus growth and aflatoxin B1 contamination on pistachio nut by fengycin and surfactin-producing Bacillus subtilis UTBSP1. The plant pathology journal, *32*(3), 209.

.23 SADIQ, F. A., YAN, B., TIAN, F., ZHAO, J., ZHANG, H., & CHEN, W. (2019). Lactic acid bacteria as antifungal and anti- mycotoxigenic agents: a comprehensive review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, *18*(5), 1403-1436.

.24 SHU, X., WANG, Y., ZHOU, Q., LI, M., HU, H., MA, Y., ... & WU, L. (2018). Biological degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of Bacillus velezensis DY3108 with broad pH stability and excellent thermostability. Toxins, *10*(8), 330.

.25 WACOO, A. P., WENDIRO, D., VUZI, P. C., & HAWUMBA, J. F. (2014). Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops.

.26 KADHIM, M. J. (2016). In Vitro antifungal potential of Acinetobacter baumannii and determination of its chemical composition by gas chromatography-mass spectrometry. Der Pharma Chemica, *8*(19), 657-665.

.27 UL HASSAN, Z., AL THANI, R., ALNAIMI, H., MIGHELI, Q., & JAOUA, S. (2019). Investigation and application of Bacillus licheniformis volatile compounds for the biological control of toxigenic Aspergillus and Penicillium spp. ACS omega, *4*(17), 17186-17193.

.28 WANG, Y., ZHANG, H., YAN, H., YIN, C., LIU, Y., XU, Q., ... & ZHANG, Z. (2018). Effective biodegradation of aflatoxin B1 using the Bacillus licheniformis (BL010) strain. Toxins, *10*(12), 497.

.29 RISAN, M. H., & MUHSIN, A. H. (2015). Efficiency of Bacillus licheniformis to reduce aflatoxin B1 produced by Aspergillus flavus. Al-Nahrain Journal of Science, 18(2), 108-113

.30 CHEN, Y., KONG, Q., & LIANG, Y. (2019). Three newly identified peptides from Bacillus megaterium strongly inhibit the growth and aflatoxin B1 production of Aspergillus flavus. Food Control, *95*, 41-49.

.31 HIGAZY, N. S., SALEH, A. E., HASSAN, Z. U., AL THANI, R., MIGHELI, Q., & JAOUA, S. (2021). Investigation and application of Bacillus pumilus QBP344-3 in the control of Aspergillus carbonarius and ochratoxin A contamination. Food Control, *119*, 107464.

.32 MUNIMBAZI, & BULLERMAN. (1998). Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of Bacillus pumilus. Journal of applied microbiology, *84*(6), 959-968.

.33 BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S. S., & SOBERÓN, M. (2011). Bacillus thuringiensis: a story of a successful bioinsecticide. Insect biochemistry and molecular biology, *41*(7), 423-431.

.34 DOMÍNGUEZ-ARRIZABALAGA, M., VILLANUEVA, M., ESCRICHE, B., ANCÍN-AZPILICUETA, C., & CABALLERO, P. (2020). Insecticidal activity of Bacillus thuringiensis proteins against coleopteran pests. Toxins, *12*(7), 430.

.35 GE, J., HU, J., CUI, S., WANG, Y., XU, C., & LIU, W. (2024). Biosynthesis of Bt-Ag2O nanoparticles using Bacillus thuringiensis and their pesticidal and antimicrobial activities. Applied Microbiology and Biotechnology, *108*(1), 157.

.36 YUAN, S., WU, Y., JIN, J., TONG, S., ZHANG, L., & CAI, Y. (2023). Biocontrol Capabilities of Bacillus subtilis E11 against Aspergillus flavus In Vitro and for Dried Red Chili (Capsicum annuum L.). Toxins, *15*(5), 308.

.37 SURESH, G., CABEZUDO, I., PULICHARLA, R., CUPRYS, A., ROUISSI, T., & BRAR, S. K. (2020). Biodegradation of aflatoxin B1 with cell-free extracts of Trametes versicolor and Bacillus subtilis. Research in Veterinary Science, *133*, 85-91.

.38 AL-MAMARI, A., AL-SADI, A. M., AL-HARRASI, M. M. A., BABU, S. S., AL-MAHMOOLI, I. H., & VELAZHAHAN, R. (2023). Biodegradation of aflatoxin B1 by Bacillus subtilis YGT1 isolated from yoghurt. International Food Research Journal, *30*(1), 142-150.

.39 LI, S., XU, X., ZHAO, T., MA, J., ZHAO, L., SONG, Q., & SUN, W. (2022). Screening of Bacillus velezensis E2 and the inhibitory effect of its antifungal substances on Aspergillus flavus. Foods, *11*(2), 140.

.40 SINGH, J., & MEHTA, A. (2022). The main Aflatoxin B1 degrading enzyme in Pseudomonas putida is thermostable lipase. Heliyon, *8*(10).

.41 SAMUEL, M. S., SIVARAMAKRISHNA, A., & MEHTA, A. (2014). Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by Pseudomonas putida. International Biodeterioration & Biodegradation, *86*, 202-209.

.42 GONG, A. D., LEI, Y. Y., HE, W. J., LIAO, Y. C., MA, L., ZHANG, T. T., & ZHANG, J. B. (2022). The Inhibitory Effect of Pseudomonas stutzeri YM6 on Aspergillus flavus Growth and Aflatoxins Production by the Production of Volatile Dimethyl Trisulfide. Toxins, *14*(11), 788.