جامعة كربلاء

التوصيف المظهري والجزيئي لعزلات الفطريات المرافقة للمكسرات والحبوب المنتجة لسم الافلاتوكسين B1 وامكانية توظيف بكتريا *Bacillus subtilis* في اختزال سميته

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل

درجة الدكتوراه فلسفة في علوم الحياة / سموم ميكروبية

كتبت بوساطة

دعاء فايق علي محمد الاسدي

بأشراف

أ.م.د بان موسى حسن

2023م **1444هـ**

بسم الله الرحمن الرحيم

قالَ تَزْرَعُونَ سَبْعَ سِنِينَ دَأَبًا فَما حَصَدْتُمْ فَذَرُوهُ فِي سُنْبُلِهِ إِلاَّ قَلِيلًا مِمَّا تَأْكُلُونَ ثُمَّ يَأْتِي مِنْ بَعْدِ ذلِكَ سَبْعٌ شِدادٌ يَأْكُلْنَ ما قَدَّمْتُمْ لَهُنَّ إِلاَّ قَلِيلًا مِمَّا تُحْصِنُونَ ثُمَّ يَأْتِي مِنْ بَعْدِ ذلِكَ عامٌ فِيهِ يُغاثُ النَّاسُ وَفِيهِ يَعْصِرُونَ

صدق الله العلي العظيم

سورة يوسف: الآيات(٤٧ ـ ٤٩)

اقرار المشرف

اشهد بان إعداد هذه الاطروحة قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات درجة الدكتوراه في علوم الحياة / سموم ميكروبية .

التوقيع:

الاسم: أ.م.د.بان موسى حسن

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2023

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذ المشرف، أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لمناقشتها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم: د.نصير مرزة حمزة

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة– جامعة كربلاء

التاريخ: / / 2023

إقرار لجنة المناقشة

نحن اعضاء لجنة المناقشة ادناه نشهد بأننا قد اطلاعنا على الاطروحة الموسومة ب"

(التوصيف المظهري والجزيئي لعزلات الفطريات المرافقة للمكسرات والحبوب المنتجة لسم الافلاتوكسين B1 وامكانية توظيف بكتريا *Bacillus subtilis* في اختزال سميته)

المقدمة من قبل الطالبة دعاء فايق علي محمد كجزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة /سموم ميكروبية وبعد اجراء المناقشة العلمية وجدنا انها مستوفية لمتطلبات الشهادة وعليه نوصي بقبول الاطروحة بتقدير امتياز .

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د. سامي عبد الرضا الجميلي

العنوان : جامعة كربلاء/ كلية العلوم الطبية التطبيقية

التاريخ : 23 / 5 /2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم :أ.م د. علاء عبد الحسين الدعمي

العنوان : جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ : 23 / 5 /2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.م .د. عبد الزهرة جبار علي

العنوان : جامعة كربلاء/كلية الزراعة

التاريخ : 23 / 5 /2023

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم :أ.م.د. هدى عبد الرضا عبد الله

العنوان : جامعة كربلاء/ كلية العلوم الطبية التطبيقية

التاريخ : 23 / 5 /2023

عضو اللجنة

التوقيع:

الاسم: أ.م.د.أثير باسل عباس

العنوان :جامعة الكوفة /كلية العلوم

التاريخ : 2023/5/23

عضو اللجنة (مشرفا)

التوقيع :

الاسم :أ.م.د.بان موسى حسن الزبيدي

العنوان :جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ :2023/5/23

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أُصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع :

الاسم : أ.د.حميدة عيدان سلمان

العنوان :عميد كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ : 5 /6 /2023

الاهداء ...

إلى من احمل اسمه كتاج وهاج ، إلى من يعتصر قلبي وجعا على فراقه ...

إلى من أخذ برحيله الدنيا وما فيها... إلى المعطاء الحنون الذي كان سندا لي طيلة حياته... إلى من كنت ارجو وجوده معي لأرى نظرة الفخر في عينيه والدي الغالي رحمه الله ...

إلى من بذلت عمرها تضحية وفداء لنا إلى نبع الحنان .... أمي الحبيبة

إلى سندي وعزوتي في الحياة إلى من هم اقرب الي من روحي إلى من رافقني منذ ان حملنا حقائباً صغيرة وسرنا الدرب خطوة بخطوة .....اخي واخواتي

إلى كل من وقف بجانبي بالنصيحة والدعاء ....

إلى المستقبل ..... اهدي ثمرة جهدي هذا

دعاء

شكر وثناء

الحمد لله حمدا كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه أن منّ علي وأكرمني ووفقني لإنجاز هذا العمل.

في نهاية مشواري لإتمام ما سعيت لتحقيقه على مدى ثلاث سنوات من الجهد والمثابرة والتحري عن كل ما يخدم هذا العمل.

لا يسعني إلا أن اتقدم بجزيل شكري وامتناني إلى الأستاذ المساعد الدكتورة بان موسى حسن الإنسانة التي أنارت لي درب العلم وذللت أمامي الصعوبات جميعها بروحها الطيبة وأخلاقها الكريمة وتوجيهاتها العلمية القيمة التي أضافت الرصانة العلمية على هذا العمل فجزاها الله عني خير الجزاء وقدرني على رد جزء من أفضالها علي.

كما ان واجب العرفان بالجميل يحتم علي أن أتقدم بخالص شكري وامتناني إلى الأستاذ الدكتور سامي عبد الرضا الجميلي الذي أنار لي طريق المعرفة ودعمه المتواصل طيلة أيام البحث

كما أوجه شكري وتقديري إلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة ولرئاسة قسم علوم الحياة لما ابدوه من مساعدة لإكمال مسيرتي العلمية التي بدئت وانتهت في هذه الكلية لهم مني كل الشكر

كما يحتم علي واجب الوفاء أن أتقدم بجزيل شكري وعرفاني إلى عمادة كلية العلوم الطبية التطبيقية لاستضافتهم لي في مختبراتها لإكمال مشروع البحث وتذليل الصعوبات فجزاهم الله عني خير الجزاء.

كل الشكر والتقدير والاحترام للسادة أعضاء لجنة المناقشة المحترمين لتحملهم عناء المجيئ واسراف وقتهم في إبداء الملاحظات العلمية الرصينة التي أتشرف بها وبكل نقد علمي بناء لغرض إغناء الاطروحة وإخراجها على أكمل وجه.

قائمة المحتويات

التسلسل	العنوان	رقم الصفحة
	الخلاصة	XV - XIV
1	**المقدمة**	3-1
2	**استعراض المراجع**	27-4
1.2	السموم الفطرية	4
1.1.2	مخاطر تواجد السموم الفطرية في الاغذية	5
2.1.2	العوامل المؤثرة في حدوث التسمم الفطري	6
3.1.2	الوقاية من السموم الفطرية	7
2.2	الافلاتوكسينات	8
3.2	جنس *Aspergillus*	10
4.2	جنس *Talaromyces columbinus*	14
5.2	فطر *Rhizopus*	15
6.2	المكافحة الحيوية	16
7.2	الصفات والخصائص العامة لبكتريا *Bacillus*	18
1.7.2	الخصائص العامة والتصنيفية لبكتريا *Bacillus subtillus*	19
8.2	انزيم التانيز Tannase enzyme	21
1.8.2	المادة الاساس لعمل انزيم التانيز (التانينات)	23
2.8.2	الية عمل انزيم التانيز Mechanism of tannase action	24
3.8.2	تطبيقات انزيم التانيز Application of tannase enzyme	26
3	**المواد وطرائق العمل**	28
1.3	الاجهزة والادوات المستعملة	28
1.1.3	الحيوانات المختبرية Laboratory animals	33
1.2.3	تحضير المحاليل والصبغات المستخدمة في الدراسة	33
2.2.3	تحضير الاوساط الزرعية	34
1.2.2.3	تحضير وسط جوز الهند	34

2.2.2.3	تحضير وسط الذرة والشعير	34
3.2.3	جمع العينات وتحضيرها Samples collection	35
1.3.2.3	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض انواع المكسرات والحبوب المحلية	35
2.3.2.3	حفظ عزلات الفطريات	35
3.3.2.3	اختبار قدرة عزلات الفطريات على انتاج سموم الافلاتوكسين	36
4.2.3	عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus subtillus*	39
1.4.2.3	دراسة الخصائص المظهرية لبكتريا *Bacillus*	40
2.4.2.3	دراسة الخصائص المجهرية لبكتريا *Bacillus*	40
3.4.2.3	تشخيص عزلة بكتريا *Bacillus* لتحديد النوع	40
4.4.2.3	حفظ عزلات بكتريا *Bacillus*	40
5.4.2.3	اختبار فعالية عزلات البكتريا *Bacillus* في تثبيط نمو الفطريات قيد الدراسة على وسط B.D.A ووسط Nutrient agar ووسط اكار جوز الهند	41
5.2.3	مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا *B.subtillus* B1	41
1.5.2.3	تحديد الوسط التخمري المناسب لتنمية عزلة البكتريا *B.subtillus* B1	41
2.5.2.3	اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة	42
3.5.2.3	تحديد نسبة وسط التخمر الى المادة الحاملة	43
4.5.2.3	انتاج المستحضر الحيوي النهائي من عزلة البكتريا *B.subtillus*	43
5.5.2.3	تقييم كفاءة المستحضر الحيوي في تثبيط نمو الفطريات قيد الدراسة	43
6.2.3	اختبار السلامة الصحية للمستحضر الحيوي	45
1.6.2.3	المعايير الفسلجية للدم	46
2.6.2.**3**	الدراسة النسجية	46
7.2.3	تقييم كفاءة المستحضر الحيوي المصنع في حماية حبوب الحنطة من الاصابة بالفطريات *A.flavus* DB1 والفطر *Rhizopus microsporum* DB1 والفطر *Talaromyces*	47

	colombinus DB3	
51	تنقية انزيم التانيز	8.2.3
52	اختبار السمية الخلوية لانزيم ال Tannase	1.8.2.3
52	اختزال سم الافلاتوكسين Aflatoxin	2.8.2.3
54	**النتائج والمناقشة**	4
54	عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لاصناف المكسرات والحبوب المحلية	1.4
57	الكشف عن قدرة عزلات الفطريات على انتاج سم الافلاتوكسين B1	2.4
64	عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus*	3.4
65	الصفات المظهرية لمستعمرات عزلة البكتريا *B.subtillus*	1.3.4
67	اختبار الفعالية التضادية لعزلات البكتريا اتجاه الفطريات محور الدراسة	4.4
68	اختبار فعالية البكتريا *Bacillus subtillus* B1 في تثبيط نمو الفطريات محور الدراسة	1.4.4
69	مراحل تصنيع المستحضر الحيوي	5.4
69	تحديد الوسط الزرعي الملائم لنمو البكتريا *Bacillus subtillus* B1	1.5.4
69	تقيم كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح البكتريا *Bacillus subtillus* B1	2.5.4
70	تحديد نسبة الوسط التخمري لمستخلص حبوب الذرة الصفراء الى المادة الحاملة caco3	3.5.4
70	تقدير اعداد البكتريا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي	4.5.4
70	اختبار السلامة الصحية للمستحضر الحيوي	6.4
78	دراسة فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح البكتريا *Bacillus subtillus* B1 في حماية بذور الحنطة من الاصابة والتلوث بسم الافلاتوكسين B1	7.4
78	التجربة الخزنية	1.7.4

8.4	تقدير كمية السم B1 وكفاءة البكتريا *Bacillus subtillus* B1 بمنع انتاج سموم الافلاتوكسين بعد مرور ستة اشهر من الخزن بتقنية HBLC	82
9.4	تنقية انزيم التانيز	89
1.9.4	اختبار السمية الخلوية لانزيم ال Tannase	91
2.9.4	اختزال سم الافلاتوكسين Aflatoxin B1	92
	الاستنتاجات	
	التوصيات	
	المصادر العربية	98-95
	المصادر الاجنبية	117-99
	الملاحق	126-118
	الخلاصة الانكليزي	i-iii

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	الصفحة
1-2	تصنيف بكتريا *Bacillus*	18
1-3	الاجهزة والادوات المستعملة في تنفيذ البحث	28
2-3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	31
3-3	الاوساط الزرعية المستخدمة	32
4-3	البواديئ المستخدمة في تقنية POLYMERASE (PCR) CHAIN REACTION	39
5-3	معاملة الحيوانات المختبرية	45
6-3	تنفيذ المعاملات للتجربة الخزنية	47
1-4	عدد عزلات الانواع الفطرية المعزولة من بعض انواع المكسرات والحبوب المحلية	54

2-4	النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من انواع المكسرات والحبوب	56
3-4	النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من المكسرات والحبوب	57
4-4	الارقام المسجلة في البنك الجيني لعزلات الفطريات المشخصة جينيا	59
5-4	الفعالية التضادية لعزلات البكتريا *Bacillus* المعزولة من عينات تربة محافظة كربلاء	67
6-4	المعاملات في التجربة الخزنية	79
7-4	معاملات التجربة الخزنية ونسبة تركيز سم الافلاتوكسين B1 بعد مرور ستة اشهر من الخزن بتقنية HBLC	82
8-4	خطوات تنقية انزيم التانيز من المستخلص الانزيمي الخام للعزلة البكتيرية	90

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1-2	التحلل المائي لTannic acid بواسطة انزيم التانيز	25
2-2	الية عمل انزيم التانيز	26
1-4	تطابق عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1 مع العزلات العالمية في البنك الجيني	60
2-4	الشجرة الوراثية للفطر *Aspergillus flavus* DB1	61
3-4	الشجرة الوراثية للفطر *Aspergillus flavus* DB2	61
4-4	تطابق عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3 مع العزلات العالمية في البنك الجيني	62

5-4	الشجرة الوراثية للفطر *Talaromyces columbinus* DB3	62
6-4	تطابق عزلة الفطر *Rhizopus microspores* DB1 مع العزلات العالمية في البنك الجيني	63
7-4	الشجرة الوراثية للفطر *Rhizopus microspores* DB1	63
8-4	تشخيص عزلة البكتريا *Bacillus subtillus* B1 باستخدام جهاز فايتك	66
9-4	نسبة التثبيط لبكتريا *Bacillus subtillus* B1	68
10-4	معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد اثر لالتهابات الخلايا الكبدية او تفسخ ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	72
11-4	معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد اثر لالتهابات الخلايا الكبدية او تفسخ ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	73
12-4	معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي Nutrint broth للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد اثر لالتهابات الخلايا الكبدية او تفسخ ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	73
13-4	معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد اثر لالتهابات الخلايا الكبدية او تفسخ ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	74
14-4	معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من	74

	حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وانابيب الكلية وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	
15-4	معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وانابيب الكلية وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	75
16-4	معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وانابيب الكلية وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	75
17-4	معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وانابيب الكلية وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	76
18-4	معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	76
19-4	معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	77

20-4	معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين	77
21-4	معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك اثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين.	78
22-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *A.flavus* DB1 فقط بواسطة HPLC	83
23-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 +*A.flavus* DB1 بواسطة HPLC	84
24-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *T.colombinus* DB1 فقط بواسطة HPLC	84
25-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *R.microsporum* DB1 فقط بواسطة HPLC	85
26-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 +*T.colombinus* DB1 بواسطة HPLC	86
27-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 +*R.microsporum* DB1 بواسطة HPLC	86
28-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 فقط بواسطة HPLC	87

29-4	المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب الغير معاملة (معاملات السيطرة) بواسطة HPLC	88
30-4	المخطط الكروماتوكرافي للستاندر القياسي لسم الافلا B1 عند تركيز 2.5bbp بواسطة HPLC	88
31-4	تنقية الإنزيم التانيز بإستخدام المبادل الأيوني DEAE Cellulose في عمود ابعاده 20× 2.5 سم اجريت الموازنة والإسترداد بالمحلول الدارئ خلات الصوديوم بتركيز 10 ملي مولر بسرعة جريان 30 مل /ساعة وبمعدل 3 مل /جزء	90
32-4	تنقية إنزيم التانيز بإستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-150 في عمود ذو الأبعاد 1.5×40 سم، جرت الموازنة والإسترداد بالمحلول الدارئ خلات الصوديوم بتركيز 10 ملي مولر بسرعة جريان 30 مل /ساعة وبمعدل 3 مل /جزء	91
33-4	المخطط الكروماتوكرافي لعينات السيطرة لسم الافلاتوكسين بواسطة HPLC	92
34-4	المخطط الكروماتوكرافي للأنزيم المنقى من عزلة البكتريا بواسطة HPLC	93
35-4	المخطط الكروماتوكرافي للأنزيم الخام المعزول من البكتريا بواسطة HPLC	93

قائمة الملاحق

رقم الملحق	العنوان	رقم الصفحة
1	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1 في البنك الجيني NCBI	118
2	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1 في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية	118
3	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1	119
4	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1	119
5	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2 في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية	120
6	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2	120
7	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2	121
8	يوضح تسجيل عزلة الفطر *talaromyces colombinus flavus* DB1 في البنك الجيني NCBI	121
9	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3 في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية	122
10	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3	122
11	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3	123
12	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1* في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية	123
13	يوضح تسجيل عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1* في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية	124
14	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1*	124
15	يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1*	125
16	تأثير المستحضر الحيوي في المعايير الفسلجية للحيوانات المختبرية	126

قائمة المختصرات

المختصر	الاسم الكامل
AFB1	Aflatoxin B1
AFB2	Aflatoxin B2
AFG1	Aflatoxin G1
AFG2	Aflatoxin G2
AFM1 1	Aflatoxin M1
AFM2	Aflatoxin M2
A.flavus	*Aspergillus flavus*
PDA	Potato dextrose Agar
YES	Yeast extract sucrose
TLC	Thin-Layer Chromatography
UV	Ultraviolet
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
WHO	World Health Organization
LD50	Median lethal dose
ppb Part per billion	ppb Part per billion

الخلاصة

يعد الانتشار الواسع للفطريات واحدة من أهم المشاكل التي تواجهنا في الوقت الراهن لانتشارها الواسع في الطبيعة مسببة التعفن والتلف الغذائي للمواد الخام اضافة لتأثيرها المباشر على صحة الأنسان بسبب سمومها المارة عبر السلسلة الغذائية، كما أن استعمال المبيدات الكيميائية والمعالجات الخاطئة في سبيل التخلص والحد من أنتشار الفطريات لها اضرار مختلفة صحيا وبيئيا.

لذا هدفت الدراسة الحالية لإيجاد بديل أمن وصحي وغير مضر بالبيئة أو الكائنات الحية بوساطة استخدام المعالجة الحيوية التي تلعب دورا مهما في السيطرة البيولوجية، إذ اثبتت نتائج البحث الميداني لحبوب محافظة كربلاء الحصول على 440 عزلة من الفطريات بأنواع مختلفة ،وجد سيادة النوع الفطري *Aspergillus* spp وبنسبة 98% في جميع الحبوب المدروسة ،حين سجل الفطر *Aspergillus flavus* , *Aspergillus niger* نسبة ظهور 90% في حبوب الذرة الصفراء وفي باقي الأنواع تراوحت نسبة الظهور بين 40-80%، اما الفطر *Talaromys colombinus* فقد كأن له ظهور قليل جدا 20-50% مقارنة مع سيادة النوع *Aspergillus* spp ،حين سجل الفطر *Rhizopus microsporus* نسبة ظهور تراوحت بين10-50% في الحبوب المدروسة .

بينت نتائج اختبار كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC واختبار الامونيا أن العزلات جميعها كأنت منتجة لسم الافلاتوكسين وبنسب متفاوتة وأكفأها سمية شخصت جينيا عن طريق تقنية ال PCR وارسلت نتائج التتابعات إلى البنك الجيني واعطيت أرقاما تسلسلية خاصة، إذ كانت العزلات متطابقة بنسبة 100% مع العزلات العالمية مما يؤكد أنتشارها الواسع وعدم اقتصار تواجدها ببيئة محددة.

اعطت التربة المحلية عزلة بكتيرية ذات كفاءة تثبيطيه عالية ضد الفطريات تمثلت بالنوع البكتيري *Bacillus subtillus* وأكد تشخيصها مظهريا ومجهريا وباستخدام جهاز فايتك، إذ كأنت العزلة فعالة جدا في تثبيط نمو الفطريات وبنسبة 100% باستخدام طريقتي المزج والتخطيط واعطيت تسمية *Bacillus subtillus B1*.

اثبت وسط الذرة الصفراء كفاءة عالية لنمو البكتريا إذ بلغ عدد الوحدات البكتيرية 12.5×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة ، حين بلغت 7×10^{12} في مستخلص الشعير، أما الحنطة فقد كأنت أقل بكثير من مستخلص الشعير .

اوجدت مادة كربونات الكالسيوم كمادة حاملة للبكتريا وبنسبة2:1 غم/مل (مادة حاملة/راشح بكتيري) إذ بلغت اعداد البكتريا المحسوبة في الغرام الواحد 150×10^{12} وحدة تكوين المستعمرة /غم واجري فحص السلامة الصحية للمستحضر الحيوي على حيوانات الجرذ الأبيض المختبرية وكأنت فحوصات الدم الفسلجية والمقاطع النسجية للكبد والكلية والجزء الأول من الامعاء ضمن الحدود الطبيعية ولم تشاهد أي تغييرات عن الحالة الطبيعية مقارنة بمعاملة السيطرة (جرذان غير معاملة).

كما اثبت المستحضر الحيوي كفاءة عالية في التجربة الخزنية التي أستمرت لمدة ستة أشهر إذ لم تسجل أي اصابات في الحبوب المعاملة بالمستحضر الحيوي البكتيري فقط مقارنة مع معاملات السيطرة الحبوب غير المعاملة حيث بلغت نسبة تركيز السم فيها والمقاسة بتقنية HPLC بين 96-98 Pbm حين سجلت الحبوب المعاملة بالفطر *Aspergillus flavus* DB1 نسبة تلوث بالسم بلغت 489.08 Pbm والفطر *Talaromyces columbinus DB3* نسبة 401.22Pbm والفطر *Rhizopus microsporus* DB1 نسبة 395.19Pbm .

في حين الحبوب التي تم معاملتها باللقاح الفطري والمعاملة بالبكتريا بلغت نسبة تركيز السم صفر في جميع المعاملات عدا معاملة الحبوب بالفطر *Aspergillus flavus* DB1 والبكتريا إذ بلغت 1.99PPM وهي نسبة ضعيفة جدا مقارنة مع معاملات السيطرة، إذ أن قياس تركيز السم بتقنية HPLC اعطت نتائج دقيقة جدا لكمية السم الموجودة مقارنه مع تركيز السم في معاملات المقارنة.

اثبتت النتائج الدور الفعال لأنزيم التانيز في البكتريا ويعد واحد من أهم الأنزيمات الفعالة في تثبيط النمو الفطري وتحطيم سموم الافلاتوكسين ، إذ امكن عزل الأنزيم بشكل منقى من المستخلص البكتيري للمزارع السائلة وبعمر 48 ساعه عن طريق عمليات الترسيب والديلزة إذ تم الحصول على الأنزيم بشكل خام وبنسبة 100% وتمت تنقيته بشكل جيد للحصول على أنزيم نقي ، واعطت نتائج اختبارات السمية الخلوية للأنزيم النقي نتائج موجبة إذ لم يبدي الأنزيم أي تأثيرات سلبية في كريات الدم الحمراء ، كما اثبت كفاءته في تحطيم سم الافلاتوكسين حيث خفض تركيزسم الافلاتوكسين إلى 1.3 نانو غرام /مل في الأنزيم الخام ، وبلغت 1.5 نانو غرام / مل في الأنزيم المنقى.

1- المقدمة

تعد الفطريات واحدة من أهم المشاكل التي تتواجد في الوقت الراهن وذلك لانتشارها الواسع في الطبيعة، وتعد واحدة من أهم المسببات الرئيسية التي تسبب التلف الجرثومي للمواد الغذائية اذ يمكنها النمو في مجموعه واسعة ومختلفة في أغذية الأنسان بما فيها المواد الخام (Gizachew *et al*.,2016) . فهي تسبب خطرا على صحة الأنسان عن طريق استهلاكه للسموم التي تنتج من بعض الفطريات عبر السلسلة الغذائية في البلدان المتقدمة والنامية (Hymery *et al*.,2014). حيث تكون مسؤولة بشكل اساسي عن التغاييرات المرئية وغير المرئية ، مثل الروائح الكريهة والنكهات الغير مستساغه وبذلك تؤدي إلى اتلاف الطعام والخسائر الاقتصادية الكبيرة(Garnier *et al* .,2017a). تعتبر مجموعه فطريات جنس *Aspergillus* من اكثر الأنواع انتشارا في اغلب البيئات وتعد من أهم منتجات سموم الافلاتوكسين (Balina *et al*.,2018) .

يعد تلوث الأعلاف والحبوب و اغلب المواد الغذائية بالفطريات وسمومها من اكثر المشاكل التي تهدد الدول وخاصة التي تفتقر لظروف الخزن المثالي وتعتبر مصدرا يسبب قلقا صحيا مما دعى تلك الدول لتوفير مصادر غذائية آمنة و صحية و خالية من التلوث لتحقيق الامن الغذائي وبالنتيجة عدم تعرض الأنسان أو الحيوان لهذه السموم (Makun *et al*.,2010) .

السموم الفطرية Mycotoxin عامة هي عبارة عن منتجات أيض ثانوية تنتج من بعض الفطريات القادرة على انتاجها و تمتاز بوزنها الجزئي الواطئ مما يؤدي إلى عدم مقدرة الجهاز المناعي لمعرفتها لذا تتراكم في أنسجة و اعضاء مختلفة كالطحال والكلية و الكبد و تعد من اخطر انواع السموم المعروفة ، بسبب قدرتها على تحمل درجات الحرارة المرتفعة جدا (الجميلي ،2014) . لهذه السموم تأثيرات أخرى مختلفة اذ تسبب تثبيط في الجهاز المناعي بالإضافة الى التشوهات الخلقية والتسمم الكلوي و مسخ الاجنة و لها القدرة على احداث تأثيرات مزمنة وحادة كالاضطراب الحاصل في الجهاز العصبي المركزي و الاوعية الدموية نتيجة لتناول اغذية حاوية على تراكيز متباينة من هذه السموم بشكل مستمر (Bhat and Vasanthi ,2003) .

تعتبر الأفلاتوكسينات مسببة للسرطانات ومسببة لنقص المناعة ومطفرة وسامة حيث تنتج من قبل مجموعه واسعة من فطريات *Aspergillus* spp. التي تلوث مجموعة كبيرة من

الحبوب مثل الذرة والقطن والفول السوداني. لا تؤثر الأفلاتوكسينات سلبًا على إنتاج المحاصيل فقط، بل تجعلها غير صالحة للاستهلاك وتضر بصحة الأنسان والحيوان (Guan *et al*,2021)

تمت دراسة العديد من طرائق المكافحة مثل المكافحة البيولوجية وتطوير الأصناف المقاومة والمبيدات الفطرية على نطاق واسع خلال السنوات الماضية لمنع التلوث بالأفلاتوكسينات. من ضمن استراتيجيات المكافحة، أظهرت المكافحة البيولوجية للأفلاتوكسين في السنوات الأخيرة نتائج اكثر فعالية في كل من محاصيل ما قبل الحصاد وبعده، اذ أن لها القدرة للتخلص من السموم ، وحماية الأعلاف و جودة الغذاء ، وصديقة للبيئة ، و أقل خطورة. حيث يمكن تلافي تلوث الاغذية من خلال طرائق حيوية لا تسبب خللا للنظام البيئي وليس لها أي تأثيرات جانبية لصحة الأنسان أو الحيوان ولا تسبب تغييرات في نظام السلاسل الغذائية (الأسدي،2013).

تمتاز الاحياء المجهرية بقدرتها على انتاج مواد أيضية ذات تراكيب مختلفة تكمن فعالية هذه المواد انها تنظم بواسطة المغذيات وفعالية الانزيمات ومعدل النمو ومدة الحضن حيث تقوم هذه الكائنات بإنتاج هذه المواد لمساعدتها في المنافسة مع الاحياء الحية الاخرى ببيئتها الطبيعية والتكيف مع التغايرات التي تحدث في تلك البيئات (Al-saraireh *et al*.,2015).

من أهم الإنزيمات الميكروبية إنزيم التانيز Tannase أو ما يسمى Tannin acyl hydrolase (E.C 3.1.1.20) وهو من الإنزيمات الخارج خلوية المهمة جدا في التكنولوجيا الحيوية البايولوجية، يمكن إنتاجه من مصادر إحيائية ميكروبية مختلفة (فطريات ، بكتريا). يمتاز إنزيم التانيز بمزايا عديدة كسهولة إنتاجه بطريقة المزارع المغمورة أو عن طريق تخمرات الحالة الصلبة باستخدام المخلفات الزراعية منخفضة التكلفة وتحمله لمدى واسع من درجات الحرارة وأسس هيدروجينية وقدرته العالية على التحلل المائي للتانينات السامة وتحويلها الى مركبات ابسط واقل ضررا وهي الكلوكوز والـ Gallic acid، لذا استخدم على مستوى عالمي واسع في تطبيقات صناعية وغذائية مثل ترويق المشروبات وازالة الطعم المر، تحسين جودة الاعلاف، و رفع القيمة الغذائية لمسحوق الفول كذلك دوره الفعال في ازالة المركبات الفينولية المتعددة من مياه الصرف الصحي..... الخ (Albuquerque, *et al*., 2020).

وللتأثيرات التضادية دورا مهما في السيطرة البايلوجية Biological control الامر الذي جعلها تحظى باهتمام كبير من قبل العلماء الذين حاولوا الاستفادة من تأثير هذه المواد بما يخدم حياة الأنسان (الشويلي،2012) اذ اكدت العديد من البحوث على قدرة بعض أنواع

Bacillus على انتاج المركبات المضادة الفعالة ضد البكتريا والفطريات (Baruzzi *et at* .,2011).

لذلك كان هدف هذه الدراسة ايجاد بديل حيوي أمن للحد من مشكلة التلوث الغذائي بالسموم الفطرية وتمثل ببعض أنواع بكتريا *Bacillus* واختبار كفاءتها في تثبيط الفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين ولحماية الحبوب من التلوث بالفطريات المنتجة له وتحديد الانزيمات الفعالة المسؤولة عن العمليات الفعالة للبكتريا وقد تمحورت الدراسة حول الاتي:

1. عزل الفطريات المرافقة للحبوب الجافة في محافظة كربلاء.
2. عزل أنواع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* من تربة محافظة كربلاء وتشخيصها.
3. اختبار الفعالية التضادية لتلك الأنواع البكتيرية المعزولة بالفقرة (2) للفطريات المرافقة للأغذية محور الدراسة.
4. اختيار العزلة البكتيرية الأكثر فعالية ضد الفطريات المدروسة.
5. تشخيص الانزيم البكتيري الفعال (التانيز) والتأكد من وجوده وفعاليته في العزلة البكتيرية المنقاة
6. اختبار قدرة عزلات الفطريات المدروسة على إنتاج سموم الافلاتوكسينB_1 بتقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة TLC.
7. الكشف عن جين aFla في العزلات الفطرية التي تكون موجبه للاختبار المبين في ألفقره (6).
8. تصنيع مستحضر حيوي من العزلة البكتيرية الأكثر فعالية في تثبيط انواع الفطر *Aspergillus*.
9. اجراء تقييم مختبري وأخر تحت ظروف الخزن الطبيعية لبيان كفاءة المستحضر الحيوي المصنع على حماية حبوب المحاصيل الاستراتيجية من الإصابة بالفطر *Aspergillus spp.*والتلوث بسم الافلاتوكسين B_1.
10. معرفة كمية التحطيم الحاصل لسموم الافلاتوكسين بواسطة البكتريا من خلال تقنية HPLC
11. التأكد من السلامة الصحية الغذائية للمستحضر الحيوي عن طريق استخدامه وتطبيقه على الحيوانات المختبرية والتأكد من المعايير الحيوية والنسيجية
12. -تصنيع مستحضر حيوي بكتيري لاستخدامه تجاريا في حماية الاغذية والحبوب المختلفة اثناء فترات الخزن في المخازن الغذائية.

2- المقدمة

تعد الفطريات واحدة من أهم المشاكل التي تتواجد في الوقت الراهن وذلك لانتشارها الواسع في الطبيعة، وتعد واحدة من أهم المسببات الرئيسية التي تسبب التلف الجرثومي للمواد الغذائية اذ يمكنها النمو في مجموعه واسعة ومختلفة في أغذية الأنسان بما فيها المواد الخام (Gizachew *et al*.,2016) . فهي تسبب خطرا على صحة الأنسان عن طريق استهلاكه للسموم التي تنتج من بعض الفطريات عبر السلسلة الغذائية في البلدان المتقدمة والنامية (Hymery *et al*.,2014). حيث تكون مسؤولة بشكل اساسي عن التغاييرات المرئية وغير المرئية ، مثل الروائح الكريهة والنكهات الغير مستساغه وبذلك تؤدي إلى اتلاف الطعام والخسائر الاقتصادية الكبيرة(Garnier *et al* .,2017a). تعتبر مجموعه فطريات جنس *Aspergillus* من اكثر الأنواع انتشارا في اغلب البيئات وتعد من أهم منتجات سموم الافلاتوكسين (Balina *et al*.,2018) .

يعد تلوث الأعلاف والحبوب و اغلب المواد الغذائية بالفطريات وسمومها من اكثر المشاكل التي تهدد الدول وخاصة التي تفتقر لظروف الخزن المثالي وتعتبر مصدرا يسبب قلقا صحيا مما دعى تلك الدول لتوفير مصادر غذائية آمنة و صحية و خالية من التلوث لتحقيق الامن الغذائي وبالنتيجة عدم تعرض الأنسان أو الحيوان لهذه السموم (Makun *et al*.,2010) .

السموم الفطرية Mycotoxin عامة هي عبارة عن منتجات أيض ثانوية تنتج من بعض الفطريات القادرة على انتاجها و تمتاز بوزنها الجزئي الواطئ مما يؤدي إلى عدم مقدرة الجهاز المناعي لمعرفتها لذا تتراكم في أنسجة و اعضاء مختلفة كالطحال والكلية و الكبد و تعد من اخطر انواع السموم المعروفة ، بسبب قدرتها على تحمل درجات الحرارة المرتفعة جدا (الجميلي ،2014) . لهذه السموم تأثيرات أخرى مختلفة اذ تسبب تثبيط في الجهاز المناعي بالإضافة الى التشوهات الخلقية والتسمم الكلوي و مسخ الاجنة و لها القدرة على احداث تأثيرات مزمنة وحادة كالاضطراب الحاصل في الجهاز العصبي المركزي و الاوعية الدموية نتيجة لتناول اغذية حاوية على تراكيز متباينة من هذه السموم بشكل مستمر (Bhat and Vasanthi ,2003) .

تعتبر الأفلاتوكسينات مسببة للسرطانات ومسببة لنقص المناعة ومطفرة وسامة حيث تنتج من قبل مجموعه واسعة من فطريات *Aspergillus* spp. التي تلوث مجموعة كبيرة من

الحبوب مثل الذرة والقطن والفول السوداني. لا تؤثر الأفلاتوكسينات سلبًا على إنتاج المحاصيل فقط، بل تجعلها غير صالحة للاستهلاك وتضر بصحة الأنسان والحيوان (Guan *et al*,2021)

تمت دراسة العديد من طرائق المكافحة مثل المكافحة البيولوجية وتطوير الأصناف المقاومة والمبيدات الفطرية على نطاق واسع خلال السنوات الماضية لمنع التلوث بالأفلاتوكسينات. من ضمن استراتيجيات المكافحة، أظهرت المكافحة البيولوجية للأفلاتوكسين في السنوات الأخيرة نتائج اكثر فعالية في كل من محاصيل ما قبل الحصاد وبعده، اذ أن لها القدرة للتخلص من السموم ، وحماية الأعلاف و جودة الغذاء ، وصديقة للبيئة ، و أقل خطورة. حيث يمكن تلافي تلوث الاغذية من خلال طرائق حيوية لا تسبب خللا للنظام البيئي وليس لها أي تأثيرات جانبية لصحة الأنسان أو الحيوان ولا تسبب تغييرات في نظام السلاسل الغذائية (الأسدي،2013).

تمتاز الاحياء المجهرية بقدرتها على انتاج مواد أيضية ذات تراكيب مختلفة تكمن فعالية هذه المواد انها تنظم بواسطة المغذيات وفعالية الانزيمات ومعدل النمو ومدة الحضن حيث تقوم هذه الكائنات بإنتاج هذه المواد لمساعدتها في المنافسة مع الاحياء الحية الاخرى ببيئتها الطبيعية والتكيف مع التغايرات التي تحدث في تلك البيئات (Al-saraireh *et al*.,2015).

من أهم الإنزيمات الميكروبية إنزيم التانيز Tannase أو ما يسمى Tannin acyl hydrolase (E.C 3.1.1.20) وهو من الإنزيمات الخارج خلوية المهمة جدا في التكنولوجيا الحيوية البايولوجية، يمكن إنتاجه من مصادر إحيائية ميكروبية مختلفة (فطريات ، بكتريا). يمتاز إنزيم التانيز بمزايا عديدة كسهولة إنتاجه بطريقة المزارع المغمورة أو عن طريق تخمرات الحالة الصلبة باستخدام المخلفات الزراعية منخفضة التكلفة وتحمله لمدى واسع من درجات الحرارة وأسس هيدروجينية وقدرته العالية على التحلل المائي للتانينات السامة وتحويلها الى مركبات ابسط واقل ضررا وهي الكلوكوز والـ Gallic acid، لذا استخدم على مستوى عالمي واسع في تطبيقات صناعية وغذائية مثل ترويق المشروبات وازالة الطعم المر، تحسين جودة الاعلاف، و رفع القيمة الغذائية لمسحوق الفول كذلك دوره الفعال في ازالة المركبات الفينولية المتعددة من مياه الصرف الصحي..... الخ (Albuquerque, *et al*., 2020).

وللتأثيرات التضادية دورا مهما في السيطرة البايلوجية Biological control الامر الذي جعلها تحظى باهتمام كبير من قبل العلماء الذين حاولوا الاستفادة من تأثير هذه المواد بما يخدم حياة الأنسان (الشويلي،2012) اذ اكدت العديد من البحوث على قدرة بعض أنواع

Bacillus على انتاج المركبات المضادة الفعالة ضد البكتريا والفطريات (Baruzzi *et at* .,2011).

لذلك كان هدف هذه الدراسة ايجاد بديل حيوي أمن للحد من مشكلة التلوث الغذائي بالسموم الفطرية وتمثل ببعض أنواع بكتريا *Bacillus* واختبار كفاءتها في تثبيط الفطريات المنتجة لسم الافلاتوكسين ولحماية الحبوب من التلوث بالفطريات المنتجة له وتحديد الانزيمات الفعالة المسؤولة عن العمليات الفعالة للبكتريا وقد تمحورت الدراسة حول الاتي:

13. عزل الفطريات المرافقة للحبوب الجافة في محافظة كربلاء.
14. عزل أنواع البكتريا التابعة لجنس *Bacillus* من تربة محافظة كربلاء وتشخيصها.
15. اختبار الفعالية التضادية لتلك الأنواع البكتيرية المعزولة بالفقرة (2) للفطريات المرافقة للأغذية محور الدراسة.
16. اختيار العزلة البكتيرية الأكثر فعالية ضد الفطريات المدروسة.
17. تشخيص الانزيم البكتيري الفعال (التانيز) والتأكد من وجوده وفعاليته في العزلة البكتيرية المنقاة
18. اختبار قدرة عزلات الفطريات المدروسة على إنتاج سموم الافلاتوكسين B_1 بتقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة TLC.
19. الكشف عن جين aFla في العزلات الفطرية التي تكون موجبه للاختبار المبين في ألفقره (6).
20. تصنيع مستحضر حيوي من العزلة البكتيرية الأكثر فعالية في تثبيط انواع الفطر *Aspergillus*.
21. اجراء تقييم مختبري وأخر تحت ظروف الخزن الطبيعية لبيان كفاءة المستحضر الحيوي المصنع على حماية حبوب المحاصيل الاستراتيجية من الإصابة بالفطر *Aspergillus spp.* والتلوث بسم الافلاتوكسين B_1.
22. معرفة كمية التحطيم الحاصل لسموم الافلاتوكسين بواسطة البكتريا من خلال تقنية HPLC
23. التأكد من السلامة الصحية الغذائية للمستحضر الحيوي عن طريق استخدامه وتطبيقه على الحيوانات المختبرية والتأكد من المعايير الحيوية والنسيجية
24. -تصنيع مستحضر حيوي بكتيري لاستخدامه تجاريا في حماية الاغذية والحبوب المختلفة اثناء فترات الخزن في المخازن الغذائية.

استعراض المراجع

1.2. السموم الفطرية

جاءت تسمية Mycotoxin (السموم الفطرية) من اللغة اليونانية مشتقة من mykes بمعنى الفطريات و toxicom السم والتي هي عبارة عن منتجات ايض ثانوية تنتجها الفطريات المنتجة للسموم التي من الممكن إن تسبب موت ومرض للأنسان والحيوان ، حيث تم اكتشاف اكثر من 400 نوع من السموم الفطرية في اماكن مختلفة في جميع إنحاء العالم (2020، Matny).

السموم الفطرية هي منتجات ايضية ثانوية تنتج من الفطريات الخيطية وتحت درجات حرارة ورطوبة مناسبة ، يمكن إن يحدث التسمم بها عن طريق الابتلاع و الاستنشاق أوعن طريق الملامسة خلال الجلد ويمكن إن يستهلكها الأنسان مباشرة عن طريق الأغذية الملوثة بالسموم أو من خلال تناول أغذية كالحوم أو الحليب أو البيض لحيوانات سبق وإن تغذت على اعلاف ملوثه بها (Majeed *et al*, 2018 ؛Sun *et al* ,2017). حيث إن لوجود السموم في الأغذية تأثيرات بعيدة الاجل على الصحة ، مثل تأثيراتها المسرطنة والنقص المناعي . ومن بين المئات من السموم الفطرية التي اكتشفت لغاية الوقت الحاضر اخذ اثني عشر سم الاهتمام الواسع نظرا لما لها من تأثيرات خطرة لصحة الأنسان ولسعة انتشارها في الأغذية (WHO،2018) .

اذ تعد مركبات كيميائية سامه تتميز بعدد من الخصائص فهي عديمة الطعم Tasteleesوعديمة الرائحة Odorless وغير مرئية Invisible (Jallow *et al* ,2015).

اغلب السموم الفطرية هي مركبات حلقية أروماتية Aromatic hydrocarbon ونادرا جدا تكون ذات سلاسل مفتوحة Aliphatic hydrocarbon يتباين الوزن الجزيئي لها (710- 97) دالتون ، ولانخفاض وزنها الجزيئي عدم قدرة جهاز المناعة للإنسان و الحيوان على إنتاج الأجسام المضادة لها وهنا تكمن خطورتها مناعيا (اسماعيل ،2014).

السموم الفطرية عرفت عبر التاريخ عن طريق حالات التسمم التي تعرض لها الأنسان من خلال تناوله للعراهين السامة التي بسببها حدثت حالات الوفاة ، وفي ذلك الوقت لم تكن المركبات التي احدثت التسمم معروفة ، كذلك حدثت عبر التاريخ العديد من الكوارث نتيجة

السموم الفطرية مثل (Stachybotryotoxicosis) وهو اول حالة تسمم للخيول من خلال تناولها لأعلاف ملوثة بالفطر *Stachybotrys chartarum*. في أوكرانيا عام 1930. وكذلك في روسيا خلال الحرب العالمية الثانية ظهرت اعراض للتسمم ونقص في كريات الدم البيضاء Alimentary Toxic Aleukia نتيجة التعرض لاحد السموم الثلاثية وهو . T2-Toxin الذي يعود لسموم الترايكوثسينات . وكذلك سانت أنتوني Sant Anthonys ، وهو ناتج عن تناول الحبوب الملوثة بالأجسام الحجرية لفطر *Claviceps purpurea* ما يعرف شائعا بتسمية الاركوت (اسماعيل ،2014).

يعد بداية تأسيس علم السموم الفطرية (Mycotoxicology)بشكل رسمي وعالمي بعد حادثة تسمم أفراغ الديك الرومي في إنكلترا عام 1960 أذ اودت الى وفاة (100000) ديك رومي في أحد مزارع تربيتها تبين حينها إن السبب الرئيسي هو العلف الحاوي على AFB1 المنتج من قبل الفطر *A.flavus* الذي كان يعطى في تغذيتها (نخيلان،2011).

1.1.2 مخاطر تواجد السموم الفطرية في الأغذية

تقدر الخسائر الاقتصادية الناتجة بسبب نقص في الإنتاجية بسبب السموم الفطرية تقريبا اكثر من مليار و 500 مليون دولار امريكي سنويا وذلك بسبب ثلاثة سموم فطرية فقط وهي Aflatoxin ، Fuminesen ، والسموم الثلاثية (Mantny,2017).

من الممكن تلوث الغذاء البشري بالسموم الفطرية في مراحل معينة ومختلفة في السلسلة الغذائية (Shapira and Paster ,2004). حيث ما يقارب 25% من إنتاج الحبوب سنويا يكون ملوثا بالسموم الفطرية، اذ يواجه 815مليون شخص وأكثر مشكلة الفقر والجوع حول العالم وفقا لتقارير الاخيرة لبرنامج الأغذية العالمي (Pal, 2017).

وجد الباحثون الكثير من السموم الفطرية ويكون اكثرها شيوعا وضرر واثارة للقلق على صحة الكائنات الحية هي الافلاتوكسين ،الباتولين،الاوكراتوكسين ، الفيومينزين، الزيرالينون ،النيفإنول .والتي تظهر بسبب تلوث المحاصيل بالفطريات المكونة لها قبل الحصاد او في اثناء الإنبات او بعد جني المحاصيل وهي تنتقل خلال السلسلة الغذائية (WHO،2018).

بينت العديد من الابحاث إن اعضاء الجسم التي يصلها الدم أولا تكون اكثر عرضة للتسمم من باقي الاعضاء اذ إن لكمية الدم الواصلة دور في زيادة احتمال تعرض هذه الاعضاء للتسمم اذ إن الكبد والكلية هما من اكثر الاعضاء تعرضا للتسمم لكونهما من الاعضاء التي

تصلها كميات كبيرة من الدم ،ويعتبر الكبد هو من أول الأعضاء التي يصلها الدم (الجميلي،2014).

ينتج عن استهلاك الغذاء الملوث بالسموم الفطرية امراضا قد تكون حادة ومزمنة للإنسان والحيوان. اذ وجدت سموم الافلاتوكسينات في كبد الأطفال المصابين بمرض Kwashiorkor(سوء التغذية فقر البروتين في اطفال افريقيا)،وكذلك سجل في إندونيسيا ما يقارب 20 الف حالة وفاة بسرطانات الكبد سنويا وذلك بسبب تناول الأغذية الملوثة بالافلاتوكسين ،في الاتحاد الاوربي هنالك 3.2 مليون حالة تسمم سنويا و 50000 حالة يتم علاجها بسبب السموم الفطرية،و تقدر الخسائر السنوية في الولايات المتحدة و كندا ما يقارب خمسة مليار دولار (Matny،2020).

تقوم الفطريات بتغيير كل من الخواص الكيميائية والفيزيائية للمواد المتعفنة حيث تغيير الطعم (تزرنخ، مرارة) والمظهر (الوان العفن السوداء وغيرها) وتغير التركيب و القيمة الغذائية مثل نقص فيتامين A، وتحلل الدهون واكسدتها. (Garnier *et al* ,2017a).

يسبب التأثير التازري للسموم المركبة تأثيرا اكبر مما لو كانت تعمل بصورة منفردة، اذ درست العديد من حالات التآزر وعلى سبيل المثال فيومونيسين مع الافلاتوكسين B1 و DON مع فيومونيسين ، والافلاتوكسين B1 مع الافلاتوكسين B2 (Harvey *et al* ,1995).

كذلك تسبب قلقا كبيرا في الأغذية البشرية، أذ إن تسجيل المستويات العالية لها في الأغذية وفي عينات الدم والادرار للأشخاص في البلدان النامية، يوكد إن هذه السموم هي سبب مهم للوفاة في أفريقيا وفي جنوب شرق اسيا (Pitt،2000).

2.1.2.العوامل المؤثرة في حدوث التسمم الفطري

هنالك العديد من العوامل تتحكم في توزيع و حدوث التسمم الفطري، بشكل اساسي المناخ ونوع المحاصيل ونوع وظروف الخزن المرتبطة بالعديد من المؤثرات مثل (العوامل الاحيائية،ظروف وطرق الحصاد، التخزين والمعالجة، وكذلك المحتوى الرطوبي) ، الضرر الذي من الممكن إن تسببه الحشرات قبل وبعد الحصاد (Matny،2020،اسماعيل ،2014).

تتأثر النظم البيئية الطبيعية للنبات بتغير المناخ، اذ يؤثر التغايير في المناخ على توزيع الفطريات الفارزة للسموم الفطرية في اماكن نموها وتواجدها. كذلك تؤثر الموجات الحرارية

والأشعة فوق البنفسجية والجفاف على النظام الحيوي ومن الممكن إن تسبب ظهور سلالات مطفرة جديدة من الفطريات المنتجة للسموم الفطرية بسبب التكيف الانتخابي الذي من الممكن إن يكون اكثر تحملا لظروف البيئية الجديدة واكثر إنتاجا للسموم (Manty *et al*, 2016).

للظروف البيئية تأثيرات مباشرة على قدرة الكائنات الحية الممرضة في البقاء والعيش خارج العائل المضيف، مثل الحرارة والرطوبة واشعه الشمس، حيث يتم تكييف الأنواع المتحملة للحرارة للعيش في مناخ اكثر دفئا (Matny،2020).

3.1.2.الوقاية من السموم الفطرية

الوقاية من الاصابة في الحقول لها الاهمية القصوى للسيطرة على الاصابة بالفطريات المنتجة للسموم وحالات التلوث بها وذلك عن طريق الحفاظ على الظروف الملائمة لنمو الفطريات عن طريق اتباع طرائق يمكن من خلالها التقليل من التلوث في ضوء استخدام طرائق المقاومة الحيوية ،وتحديد مواعيد حصاد المحاصيل ومابعد الحصاد الملائمة ،والتقليل من تلف البذور عن طريق الحشرات أو غيرها ،والسيطرة على ظروف الخزن لتقليل من الضرر (اسماعيل،2014).

السبب الرئيسي لحدوث التسمم الفطري في المحاصيل اثناء خزنها هو بسبب توفر الظروف المناسبة لنمو الفطريات المنتجة للسموم في الحاصل المخزون ، حيث إن ظروف التخزين الغير صحيحة والسيئة كالرطوبة العالية ودرجات الحرارة المتباينة تعد من اهم العوامل الرئيسية التي تؤدي إلى حصول التلوث الفطري ،وتعتبر عمليات سوء الحصاد ،وظروف التجفيف ،والتعبئة ،والتخزين والنقل ظروف مسببة لنقل ونمو الفطريات وزيادة احتمالية خطر إنتاج السموم الفطرية (Matny ،2020).

تم التعرف على 500 نوع من السموم الفطرية وهنالك ما يقارب 1000 نوع لم يتم الكشف عنها ، وهنالك سموم فطرية تشكل خطرا لعدم وجود دراسات و طرقا لتحديدها (Horky *et al* ,2018).

وللتقليل من التعرض الناتج من السموم الفطرية ينصح باتباع ما يلي :(WHO ،2018)

- التنوع في النظام الغذائي
- عدم حفظ الأغذية والحبوب لفترات طويلة

- خزن المواد الغذائية الخام بطرق جيدة لحمايتها من الاصابات الحشرية والجفاف والرطوبة والحرارة
- شراء المواد الغذائية الطازجة والغير معاملة بالمواد الحافظة
- فحص المواد الغذائية جيدا مثل الحبوب ، التين المجفف ،الفستق ،الفول السوداني ،جوز الهند ،التي عادة ما تتلوث جميعها بالافلاتوكسين ،كذلك الكشف عن وجود الاعفإن الملوثة لها ظاهريا

2.2.الافلاتوكسينات

الافلاتوكسينات هي منتجات أيض ثانوية تنتج من أنواع معينه من الفطريات و توجد بشكل طبيعي في جميع ارجاء العالم، من الممكن إن تلوث المواد الغذائية وتشكل مخاطرا صحية على الكائنات الحية، وكذلك تشكل مخاطر اقتصادية كبيرة، مما يتسبب في خسارة 25% من المحاصيل سنويا حول جميع دول العالم، يوجد عدة أنواع من الافلاتوكسينات لكن B1,B2,G1,G2 تشكل خطورة كبيرة حيث وجدت في الأغلبية العظمى للأغذية الرئيسية الداخلة في الغذاء البشر (WHO, 2018).

تعد الافلاتوكسينات من اكثر وأخطر السموم سمية وتنتج من بعض أنواع الرشاشيات مثل *A.flavus* و *A.niger* التي تتواجد في التربة ومتبقيات النباتات والحبوب وغيرها و تكون واسعة الانتشار ،وقد ثبتت أيضا إن الافلاتوكسين تحدث طفرات في النظام الجيني اي تسبب اضرارا في الحوامض النووية (Kumar *et al* ,2017).

يتعرض ما يقارب 4.5 مليار شخص في البلدان النامية للافلاتوكسينات وذلك عن طريق الأغذية غير الخاضعة لشروط الرقابة والسلامة الصحية ،مما أدى بالعديد من الدول الى وضع لوائح تنظيمية عن المستويات المسموح تواجدها في الأغذية والاعلاف ،وتختلف هذه الحدود باختلاف البلدان ، حيث حددت التراكيز في العديد من الدول بين 1-20 مايكرو غرام وبمتوسط 5 مايكرو غرام لكل كيلو غرام بالنسبة للافلاتوكسين B1، اما للافلاتوكسين الكلي 0-35 مايكرو غرام وبمتوسط 10 مايكرو غرام لكل كيلو غرام، أما الولايات المتحدة فحددت بحدود 20 مايكرو غرام لكل كيلو غرام للمجموع الكلي للافلاتوكسين في جميع المواد الغذائية ،ملحق(6)(Van Egmond و Jonker،2004).

يعد AFB1 الاكثر شيوعا و تواجدا وقد تم تصنيفه من قبل الوكالة الدولية لا بحاث السرطان في التسلسل الاول من المجموعة A كمسرطن للكبد والقناة الصفراوية (2019، IARC).

يسبب الافلاتوكسين B1 مجموعه كبيرة من الأثار الضارة للإنسان والحيوانات المختلفة ، وخاصة الدواجن ، كتضرر الكبد و ضعف الكفاءة التناسلية وأنتاجيتها، قلة البيض وغيرها (WHO،2017).

عند وصول الافلاتوكسين B1 وB2 إلى صغار الماشية المرضعة عن طريق تناولها لأعلاف ملوثة ، فإن ما يقارب 1.5% منها تقريبا يضاف اليها مجموعة هيدروكسيل ويفرز بالحليب بشكل M1 وM2 ،وهي مركبات ذات سمية تكون أقل من B1 وB2 لذلك وضعت العديد من الدول حدودا للافلاتوكسين في الاعلاف (Pitt،2000).

AFB1 و AFM 1 هي سموم مسرطنة وسموم كبدية (Vaz *et al* ,2020) ، AFM1 هي السموم الوحيدة التي حددت منظمة الصحة والغذاء العالمية الحدود القصوى لها في الحليب ومنتجاته Maximum residue limits(MRL) (Gao *et al* ,2016)،حيث لا تتحطم خلال عمليات البسترة خلال تحضير الحليب او مشتقاته (Branch *et al* ,2013)،يمكن إن تسبب سرطان الكبد والرئة والقولون (Marchese *et al* ,2018).

مشاكل السموم كثيرة جدا وواسعه الانتشار وخصوصا في البلدان ذات الدخل المحدود وكذلك البلدان النامية ومن الممكن إن يكون وجودها شائع جدا (Udomkun *et al* ,2017)،وممكن إن تلوث حليب الأم (Warth *et al*,2016)،وحليب الرضع (Awaisheh *et al* ,2019)،لذلك الدراسات و البحوث حول السموم الفطرية اصبحت ضرورية جدا للحفاظ على صحة الأنسان وحمايته (Nguyen *et al* ,2020).

ذكر الجميلي ،(2014) إن سم B1 يسبب موت نصف عدد الفئران (LD50) بجرعة مقدارها 9 ملغم/كغم في حين إن سم الاوكراتوكسين A تسبب بنفس التأثير لكن بجرعة مقدارها 22 ملغم/كغم وهذا يؤكد إن لسم الافلاتوكسين سمية أكثر من الاوكراتوكسين.

الافلاتوكسينات هي هياكل حلقية لها أشكال فريدة وغير متجانسة عالية الاوكسجين (Balina *et al* ,2018)،تم تسمية النوعين الرئيسين لها B,G وذلك نتيجة تألقهم تحت الأشعة الفوق بنفسجية بالون الأخضر والازرق ويمثل هذا التألق أساس عمل تقنيات الكشف عن

الافلاتوكسين،إن التركيب الكيمياوي للافلاتوكسينات غير مختلف كثيرا ولكن هناك اختلافآ في درجات سميتها، تركيبها الكيمياوي يتألف من نواة من cumarin وحلقتين furan وفي المجموعة B هناك حلقة خماسية الاضلاع ، اما المجموعه G فإنها تحتوي على حلقة Lactone ،حيث إن من اهم خصائص الافلاتوكسين هي قدرتها على التفلور Fluorescence والتي لها اهمية في الكشف وتحديد التراكيز الضئيلة لها خصوصا عندما يتم تسليط الأشعة فوق البنفسجية UV عليها وقد تم فصل المادة السامة بطريقة Thin Layer Chromatography(TLC) وتبين إنها مؤلفة من بقعتين لكل منها لون توهجي مختلف ومعامل جريان Rate of Flow تكون الاولى ذات توهج ازرق بنفسجي وRf (0.6)وهو الافلاتوكسين B والثانية ذات توهج اخضر و Rf(0.4) وهو افلاتوكسين G (Kumar,2018) .

3.2.جنس *Aspergillus*

يعد فطر ال *Aspergillus* من الفطريات الواسعة الانتشار ،ويوجد في التربة والهواء والمحاصيل الغذائية (Pitt and Hocking,2009).كذلك على المواد العضوية المتفسخة وفضلات الحيوانات (العاني،1998).تم وصف جنس *Aspergillus*لأول مرة من قبل الكاهن فلورنتين Florentine وعالم الفطريات P.A.Micheli في عام 1729 وتمت تسميته استنادا إلى التشابه البنائي لهيكل conidiophore مع اداة رش الماء المقدس في الطقوس الدينية للكنيسة (Bennett and Klich,1992).إن اهمية هذا الفطر ترجع بالأساس إلى قدرته على إنتاج المركبات الايضية الثانوية المسرطنة(Muthomi,2012).يبلغ عدد أنواعه ما يقارب 250 نوع ويكون اوسع انتشارا في المناطق الحارة منها في الباردة (Kortner *et al* ,2008).

صنف Raper and Fennell (1965) فطر *Aspergillus* ضمن شبه العائلة Moniliaceae التابعة إلى شبه الرتبة Moniliales، وتتكاثر معظم هذه الفطريات لا جنسيا فقط ،إلا إن هناك البعض منها تتكاثر جنسيا حيث تسلك سلوك الفطريات الكيسية ،بتكوين سبورات كيسيه (Ascospores) مرتبة داخل أكياس (Asci) وتكون الاكياس مطمورة داخل جسم ثمري كروي الشكل Cleistothecium (Pitt and Hocking ,1997). تكون مستعمرات الفطر *Aspergillus ذات* ألوان مختلفة بحسب لون الأبواغ (Conidia) منها الأبيض الأخضر والبني ،الوردي ،الأزرق ،التبني ،الأسمر المائل إلى الصفرة و الأسود (Kown-Chung and Benett,1992).

تسبب أنواع جنس الفطر *Aspergillus* الكثير من الأضرار الاقتصادية والصحية كأتلاف الحبوب كالذرة الصفراء والحنطة وغيرها من المنتجات الغذائية الأخرى (الاسدي ,2013) ، ولا يقتصر التأثير المدمر للفطريات على إتلافها المحاصيل الزراعية فحسب ،وإنما هناك العديد من الفطريات التي تتكاثر على المحاصيل الحقلية أثناء الخزن ،أو حتى أثناء وجود المحصول في الحقل ، وتقوم هذه الفطريات بإنتاج المواد السامة والخطرة على صحة الأنسان والحيوان عند استخدام هذه المحاصيل ،و أكثر المحاصيل تعرضا لهذه السموم هي القمح والشعير والذرة الصفراء والذرة البيضاء وذلك بسبب احتوائها على نسبة عالية من الكربوهيدرات (ابراهيم والجبوري ،1998).

كذلك تتسبب الفطريات إتلاف الجلود والملابس والأوراق إذا ما تعرضت الى الرطوبة والحرارة الملائمة لنمو الفطر، وهذا يقلل بطبيعة الحال من قيمتها الاقتصادية وتضفي على الملابس والأحذية رائحة العفن. ويسبب الجنس *Aspergillus* فسادا حيويا للمواد كتغيير لون سطح طبقات الخشب ورخاوتها حتى عند وجود مواد كيميائية حافظة للخشب. ويسبب أيضا تلف ألياف القطن العارية وباقي المواد الحاوية على السليلوز، فضلا عن محاليل دبغ الجلود ومهاجمتها للمواد البلاستيكية والبوليميرية (Atlas and Bartha ,1981).

كما تسبب بعض أنواعه أمراضا مختلفة للإنسان والحيوان ويطلق عليها اسم داء الرشاشات Aspergillosis اذ تصيب الرئة وتشبه أعراضها التدرن الرئوي ، وتظهر هذه الأمراض بكثرة في الطيور ، كما تصيب أيضا الماشية والأغنام ، والخيول وتصيب الإنسان في حالات نادرة ،في الآونة الاخيرة ارتبط هذا الداء Aspergillosis بمرض العصر (COVID-19) اذ ذكرت العديد من التقارير الطبية إن داء الرشاشيات الغازي يسبب التهابات مشتركة في المرضى الذين يعانون من COVID-19، ولاسيما في الحالات الشديدة الحرجة اذ تراوحت نسبة حدوثه في COVID-19 من 19.6% إلى 33.3% في حالة متلازمة الضائقة التنفسية الحادة التي تتطلب التهوية الميكانيكية حيث تعد من اكثر المضاعفات الشائعة والخطرة بسبب صعوبة تشخيصها ويمكن إن ترتبط بارتفاع معدلات الوفيات (Lai and Yu, 2021).

وتتطفل بعض أنواعه على بشرة الإنسان مسببة لها أمراضا تسمى بالأمراض الفطرية Mycosis (الشكري ،1991). وتنتج بعض الأنواع التابعة للجنس *Aspergillus*سموم

الافلاتوكسينات حيث تتعرض حبوب عدد من المحاصيل ومنتجاتها وأعلاف الحيوانات والطيور للتلوث بهذه السموم (Tseng *et al*,1995).

سجلت الجراح (1988) إصابة محاصيل الفاكهة المخزونة بالفطر *A.flavus* وكانت أربع عزلات من مجموعة تسع عزلات قادرة على إنتاج سموم الافلاتوكسينات B1 بنسبة 44.4 %في كل من العرموط والرمان ،كما وجد الجميلي (1996) إن نسبة إصابة فستق الحقل بالفطر نفسه كانت 16.6% بعد ستة أشهر من الخزن وكمية الافلاتوكسين المنتجة تقدر بـ 50 مايكروغرام /كغم.

يعد الفطر *Aspergillus flavus* هو أحد الأنواع الرئيسية المنتجة لسموم الافلاتوكسين ،وهو اكثر ملوثات الاعلاف و الغذاء سمية (Savic *et al* ,2020).وصف لأول مرة في عام 1809 من قبل Link (Machida and Gomi,2010).ووجد في بيئات مختلفة في مناطق العالم وبالخصوص في المناطق الاستوائية والمدارية اذ تكون ذات مناخات دافئة ورطبة (Miller *et al* ,2014).فهو موجود في المناطق المعتدلة و تم عزله من التربة (Bhatnagar *et al* ,2014)وكذلك تم عزله من الهواء (Mehl and cotty,2010).

ينمو الفطر *A.Flavus* بمدى حراري واسع يكون بين 26-32 م ، في حين إن أقصى درجات حرارة تسمح بنموه هي 48م (Marin *et al* ,1998).حيث ذكر Gizachew et al (2019) إن درجات الحرارة المثلى لإنتاج سم AFB1تكون عنده 27 م. تنتج سلالات فطر *Aspergillus flavus* 18 نوعآ من سموم الافلاتوكسينات فضلا عن نواتج ايضية سامة أخرى (Bhatnagar *et al* ,2014).

تنمو مستعمرات *A. flavus* سريعا على وسط السابرويد ووسط مستخلص الشعير (Malt extract)، وتكون المستعمرات خضراء مصفرة وتنتج بعض العزلات اجسام حجرية تكون بنية اللون مائلة إلى السواد يتراوح قطرها بين 400-700 مايكروليتر. الحوامل الكونيدية شفافة وغير مقسمه وغير متفرعة تنمو من خلية قاعدية foot cell. تنتفخ عند القمة لتكوين الحوصلة vesicleوتكون بيضوية أو كروية الشكل، تحمل عليها التراكيب القارورية phialides مباشرتا أو تكون التراكيب القارورية محمولة على metulae، وتحمل الكونيدات على التراكيب القارورية (Kown chung and Bennett,1992).

تنمو مستعمرات الفطر *A.parasiticus* على وسط C'zapek Dox agar(CZ) بشكل يميزها عن الفطر*A.flavus* فتنمو مستعمرات النوع *A.parasiticus* على هذا الوسط معطية الون اخضر غامق بينما تكون مستعمرات النوع *A.flavus* على نفس الوسط معطية لونا اخضرآ مائلا للأصفر نتيجة للتشابه بين النوعين *A.flavus* و *A.parasiticus* من حيث أشكال الحوامل الكونيديه وانتظام التراكيب القارورية عليها حيث إن التراكيب القارورية تكون في الكثير من الأحيان ثنائية الصف (Biseriate) كما في*A.flavus* لذلك يعتمد حاليا على شكل الجدار الكونيدي كصفة تشخيصية أولية للفصل بين النوعين ،ففي الفطر *A.flavus* تكون الكونيديا ذات جدران رقيقة و نتوءات ناعمة إلى معتدلة الخشونة وشكل الكونيدات متنوع من الكروي إلى البيضوي . أما الكونيديا في الفطر *A.parasiticus* فهي أكثر ميلا للشكل البيضوي وتكون نتوءاتها مشوكة بشكل واضح (Rodrigues *et al*,2007a) .

الفطر *A.parasiticus* يصيب الحبوب قبل الحصاد وأثناء الخزن حيث يصيب الذرة ،الفول السوداني ،أشجار البندق ،بذور القطن (Payne and Brown ,1998). ويقوم هذا الفطر بإنتاج الافلاتوكسينات G2,G1,B2,B1. (Horn *et al* ,1996)، كذلك وجد بعض سلالات *A.parasiticus* تنتج M_1 وهو مركب هيدروكسيلي موجود غالبا في الحليب ومشتقاته ويوجد بشكل نادر في الذرة المصابة بالفطر *A.parasiticus* (Vesonder *et.* *al*,1991).

ويسبب الفطر *A.niger* التعفن في الكثير من الفواكه والخضراوات والمنتجات الغذائية الأخرى مما يسبب خسائر اقتصادية نتيجة لتلف الأغذية ، حيث يسبب هذا الفطر التعفن الأسود في البصل ، وينتج السم الفطري المالفورمين Malformins مسببا خسائر اقتصادية كبيرة في الحقل والمخزن (Curtis *et al*,2009). وينتج هذا الفطر المالفورمينات Malformins أيضا على الحبوب المتخمرة والفواكه مسببا فساد الطماطة والعنب والمانكو (Parkash and Raaof,1989).

وجد إن للنوعين *A.flavus* و*A.niger* تأثيرات مرضية في أنسجة الفئران وذلك بإحداث تغيرات شديدة في المادة الكروماتينية وحصول الزيادة الغير طبيعية في حجم النوية مصحوبا باحتقان وعائي للنسيج البارينكيمي للكبد وتأثيراته على أنسجة الكلية متمثلة بتجمع السوائل داخل التجاويف للنبيبات الكلوية بسبب نضح الماء من النسيج الطلائي المبطن لها (علي ورائد ،2005) .

4.2.جنس *Talaromyces columbinus*

وصف الباحث بنيامين جنس *Talaromyces* في عام 1955بأنه حالة جنسية للبنسيليوم ينتج أبواغآ كيسيه ناعمة الجدران مغطاة بخيوط متشابكة (Benjamin ، 1955).

يعد فطر *Talaromyces* مهما في صناعة المواد. الغذائية ، المقاومة الحرارية للأبواغ الكيسية توجد في اغلب الأنواع مثلا *T.macrosporus* ،*T.flavus*،*T.helicus* وغيرها حيث يسبب فساد العصائر المبسترة و غيرها من المنتجات المصنعة من الفواكه (and Pitt Hocking 1998، Dijksterhuis 2007).تنتج بعض الأنواع أيضًا السموم الفطرية في المنتجات الغذائية. (Carlton and Engelhardt،1991).

يعود إلى رتبة Eurotiales وتحتوي على عدد كبير من الأنواع التي تمتلك توزيعًا عالميًا ومجموعة كبيرة من العوائل البيئية. توجد في كل مكان ويمكن العثور عليها في الهواء والتربة والنباتات والبيئات الداخلية ((Visagi *et al* ,2014 and Samson *et al* , 2014). بعض الأنواع قادرة على النمو في البيئات القاسية مثل تلك ذات درجات الحرارة المرتفعة / المنخفضة، وتركيزات الملح / السكر العالية، والحموضة المنخفضة أو مستويات الأكسجين المنخفضة (Houbraken,2014).

العديد من أنواع *Talaromyces* لها أهمية اقتصادية وتقنية حيوية وطبية ولها آثار اجتماعية ضخمة. على سبيل المثال، تعد هذه الأنواع حيوية لصناعة الأغذية ويتم استغلال عدد كبير منها لإنتاج الأطعمة المخمرة. تعتبر هذه الفطريات مهمة أيضًا من الناحية التقنية الحيوية لقدرتها على إنتاج الإنزيمات (Ichishima,2016). بالإضافة إلى ذلك، فهي منتجة قوية لمجموعة متنوعة من المستقلبات الثانوية (أو المواد الخارجية) التي يمكن استخدام بعضها كعقاقير ومضادات حيوية أو كمركبات رئيسية لعقاقير مرشحة محتملة ذات أنشطة صيدلانية أو بيولوجية (Frisvad and Samson,2004). من ناحية أخرى، فإن العديد من هذه الأنواع، مثل *T. macrosporus* ، هي مُحلِّلات تفسد الطعام وتتسبب في تدمير المحاصيل الغذائية قبل وبعد الحصاد. والعديد من هذه الأنواع التي تفسد الطعام هي أيضًا منتجة للسموم الفطرية (2009، Pitt). والأسوأ من ذلك، إن بعضها عوامل معدية وتسبب الأمراض للإنسان والحيوان، حيث إن الفطر ثنائي الشكل *T. marneffei* ، المعروف سابقًا باسم *P. marneffei* .

يعد من الفطريات سيئة السمعة مستوطنة في جنوب شرق آسيا وهي قادرة على التسبب في التهابات جهازية خاصة في الأفراد الذين يعانون من نقص المناعة مثل المرضى المصابين بفيروس نقص المناعة البشرية (Vanittanakom،2006) أو المرضى الذين يعانون من ضعف المناعة الخلوية (Chan،2016).

5.2.فطر *Rhizopus*

ينتمي إلى صنف الفطريات الزيجية Zygomycetes (George, 1972) ويتواجد في التربة والثمار والاشجار وعلى أغلب أنواع المواد العضوية المتفسخة وكذلك يتواجد في الحبوب المخزونة. يعتبر من الملوثات الشائعة في المخازن (نير جارد,1995) كما ويتسبب في امراض للنباتات مثل مرض العفن الصلب للفواكه والخضروات (Agrious ،1974).

تشكل بعض أنواع *Rhizopus* تهديدًا كبيرًا لما بعد الحصاد في المنتجات الزراعية من خلال الإضرار بمظهر وطعم المحاصيل ، ولا سيما البطاطا الحلوة والفراولة Tournas, (2005) يمكن إن يؤدي الى تسمم الأنسان بسبب إطلاق السموم النباتية المتمثلة بسم الريزوكسين (Partida Martinez *et al*, 2007).

يعد فطر *Rhizopus* أيضًا عامل انتهازي للإنسان ويسبب أمراضا في الحيوانات و في الأفراد وخاصة تلك التي تعاني من نقص المناع (Ma *et al*, 2009).

نشر تصنيف *Rhizopus* بواسطة (Schipper ,1984) فصل الجنس إلى ثلاث مجموعات *R. microsporus* و *R. stolonifer* و *R. arrhizusoryzae* على أساس sporangia و sporangiophores

6.2.المكافحة الحيوية

يمكن تعريفها على إنها منتجات حاوية على خلايا من الميكروبات الحية المختلفة. يمكن وصفها بانها مستحضرات مصنعة تجارية تحتوي على الكائنات الحية او خلايا نامية من الكائنات الحية الدقيقة (Khanna *et al* ,2019).

إن لتطوير طرائق المكافحة الحيوية بطرق حديثة تعزز من الحفاظ على المحاصيل الغذائية الاكثر اهمية للغذاء العالمي ، اذ إن طرائق المكافحة الكيميائية والفيزيائية التقليدية لتلبية المطالب المستقبلية غير اقتصادية وغير مجدية بيئيا (Tyagi *et al* ,2019).

استعملت العديد من الأحياء الدقيقة في مكافحة العديد من المسببات الممرضة التي قد تصيب النبات ولم يتم التركيز على الجوانب التجارية لهذه المكافحة إلا في غضون العقدين الماضيين وجاءت نتيجة التطور العلمي في مجال المكافحة الحيوية والمشاكل العامة من خلال استعمال المواد الكيميائية الزراعية ، فضلا عن إمكانية مكافحة بعض الأمراض التي لا يمكن السيطرة عليها باستعمال الأساليب التقليدية كالمبيدات الكيمياوية والطرق الزراعية وأنتجت الابحاث التي قام بها عدد كبير من الباحثين خلال السنوات الأخيرة في مختلف إنحاء العالم عن توظيف عدد كبيرمن الاحياء الدقيقة في هذا المجال خاصة الاحياء المتوطنة في الترب أو المحمولة فيها واحتلت أنواع البكتريا التابعة لجنسي *Bacillus* و *Pseudomonas* مركز الصدارة في هذا المجال (العاشور،2005).

تعد المكافحة الأحيائية أحد الاتجاهات البحثية الحديثة التي حظيت باهتمام الباحثين في العقود الأخيرة وحلا" علميا" وأمينا" لمكافحة العديد من أمراض النبات والآفات التي تصيبها، لاسيمَا بعد أدراك الأخطار الناتجة عن استعمال المبيدات الكيميائية (الزبيدي ،1992) وتعرف المقاومة الأحيائية بانها استخدام الكائن الحي الدقيق الطبيعي أو المحور في الجينات أو مخرجات الجين لخفض تأثير الأحياء غير المرغوب بها حيث لا يحدث ضرر بالمحاصيل الزراعية (أبو عرقوب،2000) .

إن طرائق استخدام الأحياء المجهرية الدقيقة في مكافحة الكثير من المسببات المرضية قائمة أساسا" على خاصية التضاد Antagonism اذ زاد استعمالها للتطوَر في مجال المكافحة الحيوية، والقلق العام من استخدام المواد الكيميائية فضلاً عن نجاحها في مكافحة الأمراض التي لا يمكن السيطرة عليها باستخدام الأساليب التقليدية المتبعة مثل المبيدات الكيمياوية والطرق الزراعية (Mcheen *et al* , 1986).

أظهرت أحدى الدراسات استعمال المضاد الحياتي Itarin A (هو عبارة عن بروتين دهني معزول من بكتريا *Bacillus subtilis*) بتركيز 50 جزء بالمليون ،أدى إلى تحديد نمو الفطر *A. parasiticus* فضلا" عن تثبيط تام في إنتاج الأفلاتوكسين (Ono and Kimura 1991,) .في دراسة أخرى أثبتت إن المستحضر الحيوي المصنع من لقاح البكتريا *B.subtilis*

قدرة عالية على حماية بذور الذرة الصفراء من الأثار الضارة للفطرين *A.flavus* و*A.niger* في المخزن (علي ومحمد ،2009) .

اثبتت دراسة أخرى قامت بها (الأسدي،2013) إن تعفير بذور الذرة الصفراء والحنطة ببكتريا *Bacillus subtillus* والمحملة على بيكربونات الكالسيوم كفاءة البكتريا بالحفاظ على الحبوب المدروسة من الإصابة بفطريات *A.flavus* و *A.parasitacus* وبتركيز 1غم/كيلوغرام ،كذلك اثبتت الدراسة السلامة الصحية للحيوان أو الأنسان في حال استخدامها في تعفير الحبوب و الأغذية.

للمكافحة الاحيائية ارتباطا وثيق الصلة مع التسميد الحيوي اذ تكمن اهميتها في زيادة النمو والإنتاج وبالتالي الحصول على نبات مميز و كفوء ،كما تقلل الأسمدة الحيوية من استخدام كميات كبيرة من الاسمدة المعدنية قد تصل أحيانا الى 50% وبالتالي تقلل من التكاليف الاقتصادية وتكاليف ايصالها للحقل مما يؤدي إلى زيادة في دخل المزارعين عن طريق زيادة الإنتاج ،اذ إنها منخفضة الاسعار وممكن تحضيرها مختبريا وفي فترات زمنية قليلة وهذا يؤدي إلى دعم الزراعة الأمنة صحيا وإنتاج المحاصيل ذات الجودة العالية (السامرائي،2006).

استعملت بكتريا *Bacillus subtilis* في مجال التسميد الحيوي اذ إن لها القدرة على تحسين قابلية النبات من خلال امتصاص العناصر التي توجد في الاسمدة الكيميائية المضافة مثل (N,P,K) بكفاءة اعلى ، حيث ازداد إنتاج محصول القطن في احدى التجارب بنسبة 30% بعد إن تم استعمال بكتريا *Bacillus subtilis* مقارنة بنباتات القطن التي لم تعامل بها من خلال إنتاجها للإنزيمات التي تساهم في تحرير الفسفور المرتبط عضويا ليتحول إلى الصورة الجاهزة (Bochow *el al*,2006).

7.2.الصفات والخصائص العامة لبكتريا *Bacillus*

تمتاز هذه البكتريا بشكلها العصوي، مستقيمه ومنحنية قليلا ، تتجمع بصورة مفردة او على شكل أزواج بشكل خيوط طويلة أحيانا، موجه لصبغة كرام في المراحل النمو الاولى وتعد من أقدم الاجناس البكتيرية المكتشفة من قبل العالم Ferdenand Cohn (بعنون،2015).يتراوح قطر الخلية الخضرية (0.5×1.2-2.5×10) مايكروميتر (الموسوي،2011)، ولها العديد من التكيفات التركيبية الفسيولوجية تمكنها من البقاء حية مدة طويلة حيث تحتوي جدار خلوي مؤلف من عدة طبقات مؤلف من Peptidoglycan ولها

القدرة على الحركة وافراز المضادات الحيوية هذا ما يمكنها في العيش في بيئات مختلفة ومتنوعة (Prescott ،2002).

تنتج سبورات داخلية Endospores عند تعرضها للظروف القاسية وتبقى ساكنة فترات طويلة (Madigan and martinko ,2005)، لها أشكال متعددة كالشكل الكروي ولإهليلجي والعصوي ويكون موقع السبور مختلف يكون مركزي Centralاو طرفي Terminalاو شبه طرفية Subterminal (صالح،2005)، وتم تقسيم هذا الجنس إلى ثلاث مجاميع بالاعتماد على شكل السبورات الداخلية والحافظة السبورية (Sarvices،2015)

صنف ((Promon *et al*,2015 هذا الجنس حسب الجدول التالي (2-1)

Kingdom	**Bacteria**
Phylum	**Firmicutes**
Class	**Bacilli**
Order	**Bacillales**
Family	**Bacillaceae**
Genus	***Bacillus***

ذكر Nicholson (2002) إن اغلب الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* spp. لها المقدرة للبقاء على قيد الحياة بشكل مترمم (Saprophyte) في التربة التي تعتبر الخزانات الاولية لهذه البكتريا، كما إن الأغلبية الكبرى من تلك الخلايا لها القدرة على الاحتفاظ بحيويتها بشكل ابواغ ساكنة (Garbeva *et al*, 2003) .

تستطيع بعض أنواعها النمو في درجات حرارية تتراوح بين 25-37م وهنالك بعض الأنواع تعد محبة لدرجات الحرارة العالية 75م وتسمى Thermophilicفي حين هناك أنواع لها القدرة على النمو في درجات حرارة منخفضة 3م تسمى Psychrophilic وأنواع تعيش في محتوى حامضي متباين PH بين 2-10 (كاظم،2010).

اكد Bandowواخرون،(2002) على إن الصفات المميزة لجنس *Bacillus spp.* هي الإنتاجية الايضية العالية في الأنظمة الطبيعية وخاصة المضادات الحياتية ،فضلا على إن بعض منتجاتها مقاومة للفعل الحراري Thermo resistance ،وكذلك لها القدرة على الاستجابة

للمطفرات الوراثية من حيث الإنتاج الأيضي وسعته وخاصتا للسلالات البرية Wild Strains التي تعطي كميات كبيرة من المضادات الجرثومية من خلال الايض الثانوي وبعد التطفير مباشرة .

يمكن عزل الأنواع التابعة لجنس بكتريا *Bacillus*من التربة بكل سهولة وبالتقنيات البسيطة المستخدمة بالمختبر حيث من الممكن بسترة عينة التربة المراد عزل بكتريا *Bacillus* منها بدرجة 80 مْ و لمدة 15 دقيقة للتخلص من الأنواع البكتيرية الأخرى وكذلك الخلايا الخضرية لبكتريا *Bacillus* ومن ثم أجراء سلسلة من التخافيف للعينة وزرع التخفيف الأخير في وسط Nutrient agar . (Todar , 2004) . أشارت المصادر العلمية إلى إن اغلبية الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* من الممكن إن تتواجد في التربة أو بداخل أنسجة الجذور أو في مناطق المحيط الجذري (Coombs) والتي تسمى Rhizosphere إذ تتواجد بالتربة بواقع 10^3 ــ 10^6خلية /غم ومن أهم الأنواع التابعة لهذا الجنس والمنتشرة في التربة الزراعية هي *B. subtilis* و *B. cereus* و *B. mycoides* و *B. circulans* و *B. megaterium* (Nicholson , 2002).

1.7.2.الخصائص العامة والتصنيفية لبكتريا *Bacillus subtilis*

وهي أحد الأنواع الشائعة لجنس *Bacillus* وتسمى كذلك عصيات العشب أو القش Hay *Bacillus* or grass *Bacillus*،خلايا هذه البكتريا عصوية موجبة لاختبار صبغة كرام تكون هوائية اجبارية وأحيانا تكون اختيارية لا هوائية مكونه للسبورات وهذه الصفة تعطيها القدرة على تحمل الظروف القاسية كارتفاع درجات الحرارة والجفاف ، تكون ذات قوام لزج و تتواجد في المياه والتربة وجوف الحيوانات المجترة وفي الإنسان وتكون منتجة للإنزيمات ،تنمو بدرجات حرارة معتدلة Mesophilic تكون درجات الحرارة المثلى لنموها 25-30م (Bandow *el al* ,2002).

تستخدم بكثرة في التقانات الاحيائية وسميت قديما *vibrio subtilis*من قبل العالم Christian Gottfried Ehrenberg (Ehrenberg G ،1835)، بعد ذلك سميت *Bacillus subtilis* من قبل Ferdin and cohn عام 1872(cohn،1872).

تعزل من التربة بواسطة عمليات البسترة ثم صبها في الأوساط الزرعية. المستعمرات النموذجية تكون بيضاء و لزجة المظهر (White and dry or past looking)، مخاطية

القوام ولماعه، ذات شكل مستطيل، عادتا تتشكل بهيئة سلاسل أو أزواج، وتظهر تحت المجهر بشكل منقط بسبب السبورات الداخلية التي تكونها (Nester،2001).

بين Swain وأخرون (2012) الى إن التلقيح ببكتريا *Bacillus subtilis* أدى الى زيادة في ذوبانية الفسفور وزيادة في نشاط إنزيم الفوسفاتيز في منطقة الرايزوسفير للتربة المزروعة بنبات اللوبيا(vigna unguiculata) ،كذلك سببت الزيادة في الطول الجذري ،وارتفاع النبات، وزيادة الكتلة الحيوية لنبات اللوبيا أعلى في التربة المعالجة بالبكتريا منها في التربة الغير معالجة ،تثبت هذه النتائج إن سلالات *Bacillus subtilis* يمكن استخدامها بنجاح في الزراعة من أجل اذابة البوتاسيوم والمحافظة على صحة التربة.

إن استعمال الاسمدة الحيوية تعد أحد افضل الطرائق لتجهيز النباتات عن طريق افرازها للأحماض العضوية والتي تؤدي إلى خفض ال PH لمنطقة الرايزوسفير حيث تم استخدام أنواع مختلفة من البكتريا ومن ضمنها *B. subtilis* كسماد حيوي لإذابة وتجهيز المغذيات الصغرى بصورة مترسبة ،واثبتت الكثير من الدراسات إن بكتريا *Bacillus* هي الافضل في التسميد الحيوي لتجهيزها وتحرير الزنك في التربة من المركبات مثل Zno,ZnCo3,Zns (Mishra and Dash,2014).

اوضحت احدى الاوراق البحثية إن أعلى قيمة للعناصر في أوراق النبات حدثت بعد مرور90 يوم من الزراعة وبنسبة زيادة مئوية في المعاملات الملقحة ببكتريا *Bacillus* والفطر *Mycorrhiza* والسماد العضوي 9.96%,31.52%,4.02%,41.72%,21.63% لكل من العناصر Zn,Fe,K,P,N بالتتابع بالمقارنة مع معاملات المقارنة التي كانت بدون تسميد (Al-karboly *el al*,2017).

كما اوضح Rafique وأخرون (2018) هناك تأثير كبير على نمو وإنتاجية محصول الباميا عند المعاملة ببكتريا *Bacillus* اذ تم تسجيل زيادة بمقدار 21% في غلة القرنة عند المعاملة ببكتريا *Bacillus* .

تؤثر بكتريا *Bacillus* على نمو النبات بصورة مباشرة أوتكون غير مباشرة من خلال دعم النباتات بواسطة مواد خاصة تفرزها هذه البكتريا كالهرمونات النباتية و منظمات نمو النباتات و التسهيل من امتصاص المواد الضرورية في البيئة و تحسين تركيب التربة و

المعالجات الحيوية للترب الملوثة بواسطة عزل الأنواع السامة و تحفيز مقاومة الممرضات (Refish *et al*, 2016).

أما أهميتها صناعيا فتتمثل بإنتاجها لعدد كبير من الإنزيمات ذات الوظائف الأيضية Metabolicو المحللة Hydrolyzing والمؤكسدة Oxidizing والمختزلة Reducing ولكن كميات هذه الإنزيمات تكون مختلفة بين الأنواع و حتى ضمن سلالات نفس النوع وتعتبر إنزيمات الأمليزAmylase واللاييز Lipase والبروتيز Protease و السليلوز Cellulase من أهم الإنزيمات التي تستعمل في الصناعات الغذائية والصيدلانية و صناعة النسيج و صناعة الجلود و الصناعات الأخرى حيث تشكل هذه الإنزيمات المنتجة بواسطة هذا الجنس ما يقارب 50 % من مجموع الإنزيمات المتواجدة في الأسواق العالمية كاستعمال *B. subtilis* في اليابان لتخمير فول الصويا(Lyngwi and Joshi, 2014).

8.2.إنزيم التانيز Tannase enzyme

تلعب الأنزيمات دورًا فعالا و مهمًا في العديد من التفاعلات الكيميائية الحيوية، فهي تعد محفزات حيوية انتقائية محددة يمكنها الإسراع بشكل كبير من معدل وخصوصية التفاعلات الأيضية، وهي منتجات اولية طبيعية آمنة وغير سامة تستخدم في العديد من التطبيقات الصناعية مثل إنتاج الأغذية والمشروبات ومستلزمات التنظيف والملابس والمنتجات الورقية ووقود النقل والأدوية والمعالجات الحيوية، وقد ادى التقدم في التكنولوجيا الحيوية الى الحصول على أنواع مختلفة من الإنزيمات ذات صفات جديدة لها القدرة على التكيف مع الظروف الجديدة وذلك بسبب زيادة استخدامها في الأغراض الصناعية(Niyonzima, 2019).

غالبية الأنزيمات المستخدمة لأغراض التطبيقات الصناعية يكون افرازها خارج الخليةExtracellular،يرجع السبب إلى سهولة استخلاصها وتنقيتها بشكل أرخص للاستخدام التجاري كما يمكن الحصول على كمية كبيرة من الإنزيم، حاليًا يتم تصنيف الأنواع السائدة من الإنزيمات في التطبيقات الصناعية على إنها "Hydrolase"، والتي تستخدم في تحلل المواد الطبيعية المختلفة، تشمل الإنزيمات المحللة للإسترات، التي تحفز الانقسام وتشكيل روابط الأستر والمعروفة باسم α / β-Hydrolases ينتمي إنزيم الـ Tannase إلى هذه الفئة من الإنزيمات (Alves *et al*,2014).

إنزيم الـ Tannase أو ما يسمى (Tannase or tannin acly hydrolase E.C.3.1.1.20)هو إنزيم ميكروبي يحفز التحلل المائي لروابط الأستر والروابط بين المادة الاساس مثل gallo-tannin, epigallocatechin-3-gallate, gallic acid esters ويحلل التإنين ليحرر gallic acid وglucose (Jana *et al*., 2014).

من أهم الإنزيمات البكتيرية إنزيم التانيز Tannase وهو من الإنزيمات المهمة الخارج خلوية في التكنولوجيا الحيوية، يمكن إنتاجه من مصادر إحيائية ميكروبية مختلفة. يمتلك إنزيم التانيز مزايا عديدة كسهولة إنتاجه بطريقة المزارع المغمورة أو عن طريق تخمرات الحالة الصلبة باستخدام المخلفات الزراعية منخفضة التكلفة وتحمله لمدى واسع من درجات الحرارة وأسس هيدروجينية وقدرة عالية على التحلل المائي للتانينات السامة وتحويلها الى مركبات ابسط واقل ضررا وهي الكلوكوز والـ Gallic acid، لذا استخدم على مستوى عالمي واسع في تطبيقات صناعية وغذائية مثل ترويق المشروبات وازالة الطعم المر، تحسين جودة الاعلاف، رفع القيمة الغذائية فضلا عن ازالة المركبات الفينولية المتعددة من مياه الصرف الصحي..... الخ (Albuquerque *et al* , 2020).

يمكن الحصول على إنزيم الـ Tannase من النباتات الغنية بالتانين القابل للتحلل بالماء مثل فاكهة (*Terminalia chebula*) mrobalan ، كما يوجد في اوراق نبات (*Anogessus latifolia*)،ونبات السنديان English oak (*Quercus robur*) كما سجل وجوده في لحاء النباتات التي تحتوي على التانينات المكثفة كما في نبات الأكاسيا العربية(*Acassia Arabica*) واثبتت التقارير الواردة من العديد من الباحثين تواجد إنزيم الـ Tannase في الأنسجة الحيوانية كما في الحشرات مثل Gall larva التي تتطفل على الاورام الموجودة في النباتات حيث تعمل على تحليل حامض التانيك Tannic acid المتواجد في هذه الاورام، ولكن للأغراض الصناعية تفضل المصادر الميكروبية لأن هذه الإنزيمات عادة ما تكون أكثر استقرارا من نظرائها الموجودة في النباتات أو الحيوانات، فضلا عن إن عملية التخمير يمكن إن تنتج كميات كبيرة من الإنزيمات في بيئة يمكن التحكم بها بسهولة أكبر (Rodriguez-Duran, *et al*, 2011) وقد اثبتت منظمة الغذاء والدواء الأمريكية إن إنزيم الـ Tannase المنتج من قبل الفطريات والبكتريا اكثر الأنواع امانا واستخداما في مجال الصناعات الغذائية (Govindarajan, *et al*, 2016).إن المصادر الرئيسية للـ Tannase تشمل ما يأتي:

1. الفطريات: تم اكتشاف إنزيم الـTannase لأول مرة في عام 1897 حيث تم استخلاصه لأول مرة من سلالة الفطر *Aspergillus niger*، بعد ذلك سجل وجوده في عدة

سلالات فطرية مثل *Aspergillus*، *Penicillium*، *Trichoderma* و *Fusarium* و *Paecilomyces* و *Rhizopus* (Belur, *et al*, 2011).

2. البكتيريا: على مدى السنوات الـ 25 الماضية تبين إمكانية استخلاص إنزيم التانيز من خلال العديد من العزلات البكتيرية ومنها *Bacillus*، *Lactobacillus*، *Staphylococcus*، *Serratia* وPseudomonas وتعد الأجناس التي تقع في عائلة Enterobacteriaceae هي السائدة (Jana, *et al*.,2014).
3. الخمائر: تمثل الخمائر غير التقليدية بديلاً للكائنات الحية الدقيقة القادرة على إنتاج إنزيم التانيز حيث تتمتع بنشاط إنزيمي عالي مثل *Saccharomyces cerevisiae, Issatchenkia* ،*Pichia sp., Debaryomyces hansenii Candida sp., terricol*(López, *et al*, 2020).

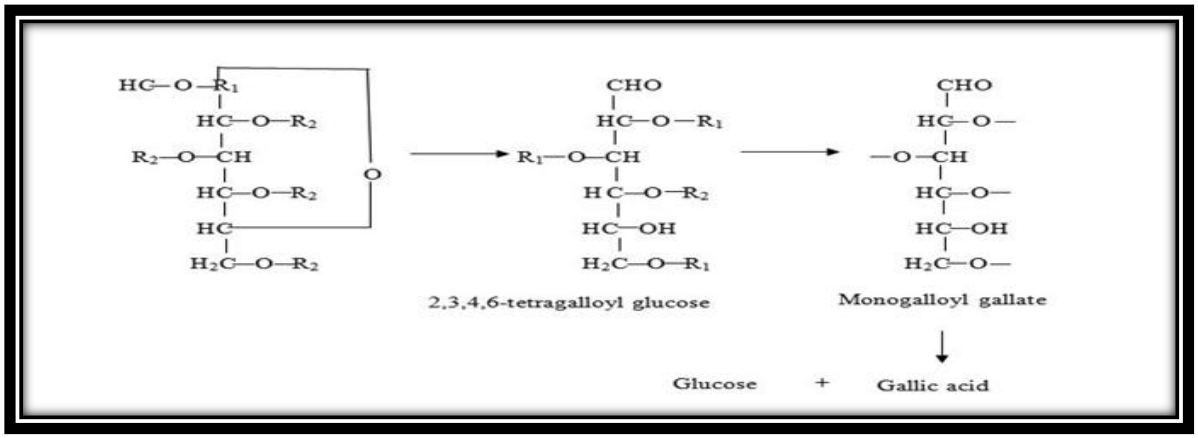
1.8.2.المادة الاساس لعمل إنزيم التانيز (التانينات)

التانينات Tannins (C76H52O46) من المركبات الطبيعية المتعددة الفينول Polyphenoles ذات أوزان جزيئية مختلفة ،وقد اكد Bhat (1998) إن التانينات ثاني اكثر Polyphenoles وفرة بعد اللكنين أذ توجد بشكل طبيعي في المملكة النباتية في الاوراق والأزهار والجذور والثمار واللحاء والخشب وتعد من النواتج الطبيعية الثانوية للنباتات لآنها تلعب دورا مهما في أيض النبات وتنتج استجابة لهجوم الحيوانات العاشبة وتعد وسيلة دفاع ضد الحشرات والطفيليات والمسببات المرضية (لأنها سامة)، كما إن بعض العوامل تؤدي إلى زيادة نسبة التانينات في النبات مثل البرد أو ارتفاع درجة الحرارة والإجهاد المائي والترب الفقيرة ، كما إن الأشجار طويلة العمر تحتوي على نسبة اعلى من التانين مقارنة بالأشجار قصيرة العمر، يعزى الاساس الكيميائي الذي تسلكه التانينات كوسيلة دفاعية إلى قدرتها على ترسيب البروتينات، وما يدعم المذكور إنفا إن مركب التانين البروتيني يمنع غزو أنسجة العائل بواسطة الميكروبات كما أنه يمنع نموها عن طريق تقليل توافر الايونات المعدنية اللازمة لعملية التمثيل الغذائي لها (Frutos, *et al*., 2004)، ولا بد من التأكيد على إن معقد التانين البروتيني يعمل على حماية النبات من الحيوانات العاشبة عن طريق عدم استساغة الحيوانات لطعمه اللاذع القابض القوي. ومن المصادر الرئيسة للتانينات جوز الكولا Cola vera (kola nuts) والشاي Camellia sinensis والقهوة .Coffea spp والكاكاو Theobroma cacao الذي يدخل في صنع الشوكولاتة والايس كريم ، ويعد محصول الشاي والقهوة والكاكاو من اكثر المحاصيل انتشارا إذ يتم زراعتها في جميع إنحاء العالم، و من المثير للدهشة إن التانينات يتم استهلاكها من

قبل 80 % من سكان العالم بشكل أو بآخر خصوصاً من قبل الاطفال والبالغين عن طريق المشروبات مثل الشاي والقهوة والعصائر والنبيذ حيث توجد كما ذكر أنفا بكميات كبيرة في جوز الكولا الذي يضاف في المشروبات الغازية في أمريكا والبرازيل (Kumar, 2018). استخدمت التانينات قديما في معالجة الزحار والاسهال والجروح عن طريق استخدام المحاليل المخففة من التانينات على الجرح المفتوح حيث تعمل على ترسيب بروتين الجرح وبذلك تصنع غطاء واقياً وتمنع النزيف للمساعدة
في الشفاء بشكل أسرع فضلا عن تأثيرها المضاد للميكروبات وبذلك تمنع التهاب الجرح (Sharma, *et al*, 2019).

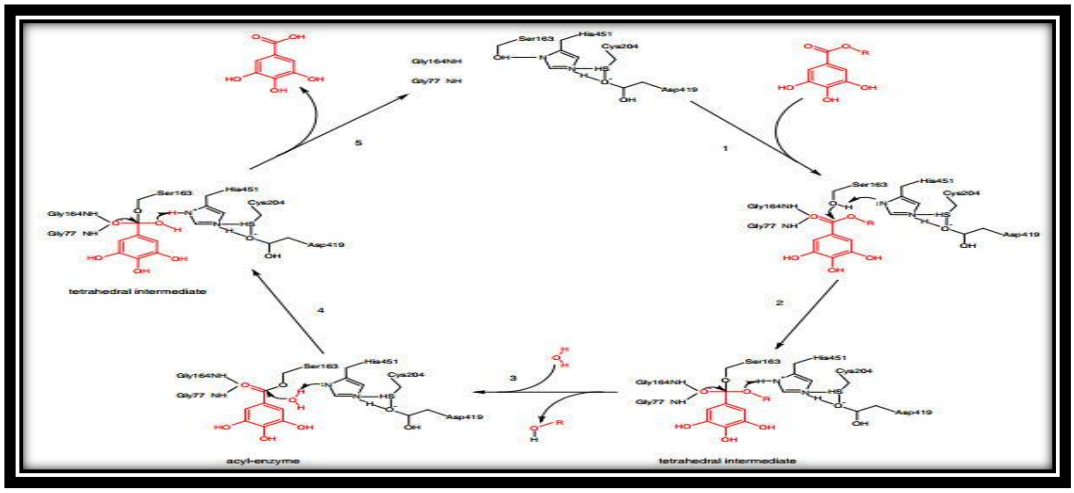
2.8.2.الية عمل إنزيم التانيز Mechanism of tannase action

يعمل التانيز على روابط الاسترات القوية (acyl bond) مثل C-O في التانينات القابلة للتحلل بالماء ولاسيما الكالوتانين حيث يتحلل الـ Tannic acid مائيا الى Gallic acid و Glucose فضلا عن تأثير التانيز على روابط الاستر الموجودة في ال Methyl gallate كما إنه يؤثر على روابط الكاربون كاربون C-C وهذا ما يفسر عدم قدرته على التحلل المائي للتانينات المكثفة condensed tannins، يوجد إنزيم التانيز في مصادر مختلفة مثل الفطريات والخمائر والبكتريا ويمتلك أوزانا جزيئة متباينة وهو عبارة عن بروتينات سكرية وغالبًا ما تشكل أوليغومرات غير متجانسة أو متجانسة مع اثنين إلى ثماني وحدات فرعية. يحلل الـ Tannase فقط الركائز التي تحتوي على مجموعتين من مجموعات OH الفينولية اما مجموعة COOH المؤسترة يجب إن تكون على حلقة البنزين المؤكسد ويجب ألا يكون متوافقًا مع أحد مجموعات OH (Lekha and Lonsane, 1997).



الشكل (2-1) التحلل المائي للـ Tannic acid بواسطة إنزيم التانيز

إن اهم ما يميز هذا الإنزيم إن له نطاقاً واسعاً من الركائز النوعية كما يعد من الإنزيمات المتوازنة تعتمد هذه الخصوصية على المصدر والطرق المستخدمة لإنتاج هذا الإنزيم فضلا عن العزلة التي تنتجه، يعود إنزيم التانيز الى عائلة استرات السيرين مع محفزات ثلاثية تحتوي على بقايا السيرين موجودة في شكل خماسي الببتيد (-Gly-X-Ser-X-Gly-) وهي ضرورية لتحفيز نشاطه، تتلخص الية عمل إنزيم التانيز بما يأتي: بعد إن ترتبط المادة الاساس بالإنزيم تبدأ مجموعة الهيدروكسيل من Ser163 هجومًا على وحدة الكربونيل في وحدة الكالويل galloyl unit هذا الهجوم يتم بمساعدة His451 الذي يعمل كقاعدة للتفاعل هذه الخطوة تسبب تشكيل وسيط رباعي السطوح الذي يستقر عن طريق الرابطة الهيدروجينية التي تتكون من التفاعلات مع Gly77 و Gly164 التي تشكل ثقب الأكسدة. يعمل His451-H باعتباره حامضاً عاماً على انهيار الوسيط رباعي السطوح لإنتاج الكحول وإنزيم الأسيل الوسيط، ثم يتم تنشيط جزيء الماء بواسطةHis451 لمهاجمة إنزيم الأسيل لتشكيل وسيط رباعي السطوح الثاني، والذي ينهار ليطلق Gallic acid و Glucose.



الشكل (2-2) الية عمل إنزيم التانيز (Ren, *et al* , 2013)

3.8.2.تطبيقات إنزيم التانيز Applications of tannase enzyme

لقد أصبح التزايد السريع في أعداد السكان وتسارع وتيرة الحياة والاقبال الهائل على المواد الغذائية المصنعة غير الصحية مثل المعلبات والمشروبات الغازية والعصائر وغيرها سببا في زيادة ظهور العديد من الأمراض مثل الزهايمر والشيخوخة المبكرة والاضطرابات الهضمية وأنواع السرطانات وغيرها ناهيك عن الارتفاع الهائل للنفايات السامة التي تطرح إلى البيئة كل يوم جزافا بسبب النشاط الصناعي و هيمنة البشر على الموارد الطبيعية للأرض، كل ذلك فرض

علينا حقيقة وهي إن استهلاك المواد الكيميائية اصبح امرا لا مفر منه في الوقت الحالي (Kozarski, *et al*, 2015)، مما دفع المختصون والباحثون في هذا المجال الى اللجوء الى طرائق أمنة بعيدة عن المواد الكيميائية وتطبيقها في مختلف المجالات الصناعية وأهمها الإنزيمات المنقاة من مصادر طبيعية مثل البكتريا والطحالب والخمائر والفطريات وجاء إنزيم التانيز في مقدمة هذه الإنزيمات الذي حاز على أهتمام العديد من الباحثين لما له من أهمية في التطبيقات الصناعية الصديقة للبيئة، الصناعات الغذائية، المعالجة الحيوية، المجالات الطبية.

تتعرض التربة للتلوث بسبب تراكم المعادن الثقيلة والفلزات عن طريق الانبعاثات من المناطق الصناعية سريعة التوسع، ومخلفات المناجم، والتخلص من النفايات المعدنية، والبنزين المحتوي على الرصاص، والدهانات، واستخدام الأسمدة ومبيدات الآفات، والمركبات الفينولية عالية السمية بسبب الري بمياه الصرف الصحي، وإمكانية وصول هذه الملوثات الخطيرة إلى الأنسان عن طريق السلسلة الغذائية، تم اللجوء في مجال تلوث التربة إلى المعالجة الاحيائية من خلال استخدام إنزيم التانيز الميكروبي لإزالة المركبات الفينولية ذات الأوزان الجزيئية الكبيرة والتركيب المعقد والتي يصعب تحللها، إحدى ميزات المعالجة الحيوية مقارنة بالطرائق الأخرى في إنها تحول الملوثات الى مركبات أقل سمية بواسطة العمليات الايضية (الإنزيمات)للكائنات الحية والتي تسمى علميا بالـ (Biodegradation) (Tork, *et al*.,2020)، كما إنها منخفضة التكلفة نسبيًا مقارنة بطرائق الإزالة الأخرى (Ransing, *et al*, 2020).

استخدم إنزيم التانيز في ترويق النبيذ والمشروبات والعصائر ذات المحتوى العالي من التانينات، يمتلك هذا الإنزيم مزايا عديدة في ازالة الطعم المر غير المستساغ بشكل فعال وازالة تعكر لون العصائر والنبيذ والرواسب والطعم القابض غير المرغوب به عند تخزينها لمدة طويلة مما يقلل من استهلاكها ومن ثم التقليل من قيمتها التجارية (Silva, *et al*, 2017).

ذكر Hidayathulla وأخرون 2018 إن إنزيم التانيز المنقى جزئيا من عزلة الفطر *Aspergillus nidulans* يمتلك فعالية بايولوجية مضادة للبكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام بالمقارنة مع المضادات الحيوية عن طريق التحكم في تكوين الأغشية الحيوية لأنواع بكتيرية مختلفة علاوة على ذلك أظهر نشاطًا تآزريًا مع المضادات الحيوية مثل Streptomycinو Ceftazidime في الوقت نفسه.

3.المواد و طرائق العمل

1.3.الأجهزة والأدوات المستعملـة

جدول (3-1) الأجهزة والأدوات المستعملـة في تنفيذ البحث

الأجهزة	الشركة المصنعة	المنشا
أطباق بتري Petri dis	Unisonics LTD	England
جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis	Shandon	England
جهاز طرد مركزي Eppendrofe centrifuge	Hettich EBA	Germany
حمام مائي Water bath	Taffa Hanover	Germany
خلاط كهربائي Blender	National	Japan
دوارق Flaskes	Unisonics LTD	England
شريحة العد Haemocytometer	Unisonics LTD	Germany
فرن كهربائي Electric oven	Heraeus	Germany
مازج Vortex	Griffin	Germany
ماصات دقيقة بأحجام مختلفة	Unisonics	England

	LTD	
U.S.K	UVP,IN	U.V.transilluminatorمصدر الأشعة فوق البنفسجي
Germany	Sartoris	Balance ميزان عادي
England	Grant	Electric shaker هزاز كهربائي
Lab Tech	Korea	Autoclave المؤصدة
Met	Switzerland	Sensitive balance ميزان حساس
Leitz	Germany	Compound light microscope مجهر ضوئي مركب
Heraens	Germany	Centrifuge الطرد المركزي
Techne	UK	Inoculation Chamber كابينة تلقيح
Gallen Kamp	England	Water Distillater جهاز تقطير الماء
Vulkan	Germany	Incubator حاضنة ثابتة
Gallen Kamp	England	Shaker incubator حاضنة هزازة
Leybold	Germany	Vacuum pump مضخة تفريغ
Gallen Kamp	England	Magnetic stirrer محرك مغناطيسي
Cole-parmer	USA	Water bath حمام مائي
Gallenkamp	England	Electrical oven فرن كهربائي
Shimadzu	Japan	Spectrophotometer المطياف الضوئي
Major-Ms-300v Science	Taiwan	Electrophoresis جهاز الترحيل الكهربائي

Germany	BÜHLER	Rotary evaporator المبخر الدوار
USA	Sigma-Aldrich	Gel filteration كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي Chromatography
USA	Labent international	Power Supply مجهز القدرة الكهربائية
Japan	LC20-Shimadzu	HPLC كروماتوكرافيا السائل فائق الاداء
Turkey	Arcelik	Laboratory refrigerator ثلاجة مختبرية
Brand	Germany	Millipore filter المرشح الدقيق
Germany	Janetzki	Cork Porer ثاقب فليني
USA	Sigma-Aldrich	PCR-eppendroff tubes انابيب ابندروف
USA	Sigma-Aldrich	Micropipetes P(20,100,1000) ماصات دقيقة
FSLAB	China	Separation funnel اقماع فصل
Sigma	USA	Dailysis أكياس ديلزة
Sail Brand	China	Glass slides شرائح زجاجية
Janetzki	Germany	Scalpel مشرط
Afco- dispo	Jordan	Test tube انابيب اختبار
Janetzki	Germany	Tweezers ملاقط

Sony	Japan	Digital Camera كاميرا رقمية

جدول (3-2) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

المادة	الشركة المصنعة	المنشأ
أزرق المثيلين Methylene blue	Hoechst	Germany
صوف زجاجي	_	_
أنزيم البروتنيز Protinase K enzyme	Bioneer	America
الأنزيم الحال lysozyme	Bioneer	America
سليكا جل	Fluka	Switzerland
السم القياسي Standard AFB_1	Promega	America
صفائح الترحيل الكروماتوغرافي TLC	Fluka	Switzerland
الترس القاعدي Tris Base	Merck	Germany
كبريتات الصوديوم الامائيه	BDH	England
زايلول Xylole	Fluka	Switzerland
شمع البارافين Paraffin wax	BDH	England
صبغة الايوسين Eosin stain	Riedle	Germany
TE buffer	Bioneer	America
صبغة الهيماتوكسيلين Haematoxyline stain	Riedle	Germany
صبغة بروميد الأثيديوم Ethidum bromide stain	Bioneer	U.S.A

England	Oxoid	Gram ’s stains صبغة كرام
Switzerlad	Fluka	Formalin فورمالين
England	BDH	Ethanol alcohol كحول الايثانول
England	BDH	Methanol alcohol كحول الميثانول
England	BDH	بنزين
Switzerlad	Fluka	Cholorophorm كلوروفورم
England	BDH	كلوريد الصوديوم Sdium chloride
England	BDH	Glycerol كليسرول
Germany	Mercy	Balsam Candia كندا بلسم
Iraq	Samarra	كاربونات الكالسيوم
Iraq	تجاري	هايبو كلورات الصوديوم
England	BDH	هكسان

جدول(3-3) الاوساط الزرعية المستخدمة

اسم الوسط الزرعي	الشركة المصنعه	المنشأ
اكار-اكار	Himedia	الهند
وسط اكار البطاطا والدكستروز P.D.A	Himedia	الهند
وسط الاكار المغذي Nutrient agar	Himedia	الهند
وسط المرق المغذي Nutrient broth	Himedia	الهند
وسط جوز الهند	تصنيع مختبري	

وسط الذرة	تصنيع مختبري	
وسط الشعير	تصنيع مختبري	
وسط الحنطة	تصنيع مختبري	

1.1.3.الحيوانات المختبرية Laboratory animals

تم استخدام ذكور الجرذ الأبيض المختبرية Rattus rattus بعمر (10) أسابيع تراوحت أوزانها بين 200-250غم تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية الصيدلة/ جامعة كربلاء، تم تهيئة الظروف الملائمة لها من حيث التهوية والإضاءة والتغذية ودرجة الحرارة المثلى التي تتراوح بين (25-30) م° لغرض إجراء دراسة السلامه الغذائية.

2.3.طرائق العمل

1.2.3.تحضير المحاليل والصبغات المستخدمة في الدراسة

1. محلول صبغة كرام Gram Stain

حضرت بإذابة واحد غم من البلورات البنفسجية والسفرانين كلا على حدة في100 مل من الماء المقطر وتركت لمدة24ساعة من دون استعمال لضمان تخمر الصبغة وتجانس المحلول ومن ثم وضعت في قناني معتمة لمنع التأكسد وتركت في أماكن مظلمة للاستعمال المتكرر لغرض تصبيغ الخلايا البكتيرية (1996) ,.Collee *et.al*.

2. صبغة ازرق القطن Cotton blue stain

حضرت بأخذ 0.05 غم من أزرق القطن (Cotton blue) و 20 غم من بلورات الفينول و 40 مل كليسرول مع 20 مل حامض اللاكتيك (Lactic acid) وأضيف إليها 20 مل من الماء المقطر، وحفظت الصبغة في قنينة معتمة لحين استعمالها في تصبيغ الفطر في أثناء الفحص ألمجهري (Collee *et. al*, 1996).

3. محلول الفصل لصفائح الكروماتوغرافي

حضر هذا المحلول باستخدام كلوروفورم: ميثانول / 5:95 واستخدم لفصل بقع السموم على صفائح الكروموتوغرافي (ألجميلي،1996) .

4. السم القياسي $Aflatoxin\ B_1$

تم الحصول على سم الافلاتوكسين القياسيB_1 بشكل متبلور في عبوة بلاستيكية معتمة من شركة Hi-media بوزن واحد ملغم لكل عبوة وأذيب في خمسة مل من محلول الكلوروفورم ليصبح التركيز 200مايكرو غرام /مليلتر ، واعتبر محلول الأساس (Stock Solution) ووضع في قنينة زجاجية معقمة وأغلقت بإحكام وغلفت بورق الألمنيوم (Aluminium foil) لإبقائها بعيدا عن الضوء وحفظت في حرارة – 18 °م لحين الاستعمال .

2.2.3. تحضير الأوساط الزرعية

حضرت جميع الاوساط الزرعية المذكورة في جدول (3-3) جميعها بحسب تعليمات الشركة المصنعة بدرجة حرارة ° 121 °م وضغط 1 جو لمدة 15 دقيقه.

1.2.2.3.تحضير وسط جوز الهند

اخذت كمية 200غم من مجروش جوز الهند من الأسواق المحلية واضيف اليها 250 مل من الماء المقطرثم وضعت على مصدر حراري لمدة 30 دقيقة بعدها فصل الراشح بواسطة شاش الترشيح ثم اكمل الحجم الى 250 مل بواسطة ماء مقطر ومن ثم يضاف اليها خمسة غم لكل 250 مل من مادة الاكار المصلبة في حال كان الوسط المطلوب صلبا ..ويترك بلا اضافة ان كان الوسط المطلوب سائلا ثم عقمت بدرجه حرارة 121 °م وضغط واحد جو ولمدة 15 دقيقه.

2.2.2.3.تحضير وسط الذرة والشعير

تم تحضير الأوساط مختبريا وذلك بأخذ 250 غم من الحبوب ثم جرشها جيدا وتنقيعها لمدة 24 ساعة بماء مقطر معقم وبمقدار 250مل ثم تصفية الراشح واضافة 10غم من سكر السكروز لكل 250مل من المستخلص ثم عقمت بدرجه حرارة 121 °م وضغط 1 جو ولمدة 15 دقيقه.

3.2.3.جمع العينات و تحضيرها Samples Collection

تم جمع عينات من المكسرات والحبوب الجافه المختلفة من الأسواق المحلية في محافظة كربلاء بتاريخ 2022/2/1 بمعدل 250غم من كل نوع وبصورة عشوائية ووضعت العينات في أكياس نايلون ونقلت إلى مختبر بحوث الدراسات العليا في كلية العلوم الطبية التطبيقية / جامعة كربلاء.

1.3.2.3.عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لبعض انواع المكسرات و الحبوب المحلية

عقمت كمية من كل عينة (مكسرات وحبوب) سطحيا كلا على حدة بمادة هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 2%لمدة دقيقتين بعدها غسلت بماء مقطر معقم ثم نقلت مباشرة إلى إطباق حاوية على ورق نشاف لتجفيفها ثم زرعت في إطباق قطرها 9 سم حاوية على وسط (PDA) معقم بدرجة حرارة 121 °م وضغط 1جو لمدة 15 دقيقة بعدة تبريده لقح بواقع أربع بذرات عند محيط الطبق والبذرة الخامسة في مركز الطبق، حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25-37مْ لمدة 7 أيام. (الاسدي، 2013)، بعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية عزلات الفطريات بنقل قرص قطره 5 ملم من كل مستعمرة وزرع في طبق اخريحتوي على الوسط ألزرعي نفسه، وكررت العملية مرات عدة للحصول على عزلات نقية للفطريات وشخصت الفطريات مظهريا تبعا للصفات المظهرية بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المظهرية (Alis and Pitt,2009)، (Rapper and Finall،1965) وبمساعدة الاستاذ الدكتور سامي عبد الرضا الجميلي، بعدها تم حساب نسبة ظهور وتردد كل فطر حسب المعادلات التالية:

$$\text{نسبة الظهور\%} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الفطر}}{\text{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

$$\text{نسبة التردد \%} = \frac{\text{عدد عزلات الفطر}}{\text{العدد الكلي للعزلات}} \times 100$$

2.3.2.3. حفظ عزلات الفطريات

حفظت عزلات الفطريات في أنابيب زجاجية نظيفة ومعقمة حاوية على وسط (PDA) بصورة مائلة حيث زرعت أقراص منها على الوسط ألزرعي في كل أنبوبة وحضنت لمدة أسبوع بدرجة حرارة 37-25 م° بعدها حفظت في الثلاجة لحين الاستعمال.

3.3.2.3.اختبار قدرة عزلات الفطريات على إنتاج سموم الافلاتوكسينات

اولا / اختبار الامونيا

تم الكشف عن الفطريات المنتجة لسموم الافلا بتنميتها على وسط جوز الهند المحضرمسبقا ولقح بمستعمرات نقية نميت على وسط PDA بعمر سبعة ايام من الفطريات

المعزولة وحضنت لمدة عشرة ايام في الحاضنة بدرجة حرارة 25-27 م° وبعد ظهور الغزل الفطري تم وضع أوراق ترشيح مبللة بقطرات من محلول الامونيا بتركيز 20% على غطاء الاطباق التي نمت عليها الفطريات واعيد حضنها لمدة أربعة أيام بصورة مقلوبة وتم تمييز الفطريات المنتجة للسموم من غيرها بتلون قواعد المستعمرات بالون الأحمر أو البرتقالي بدلا من اللون الشفاف. (Saito &Machida , 1999) .

ثانيا / الكشف عن الافلاتوكسينات باستعمال تقنية صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (Thin Layer Chromatography TLC)

تم تنمية عزلات الفطريات على وسط (P.D.A) وذلك بوضع أقراص من الفطريات المدروسة وبقطر 5 ملم بعمر أسبوع في مركز كل طبق وكررت العملية ثلاث (مكررات) لكل عزلة فطرية بعدها حضنت عند درجة حرارة 25- 37 م° لمدة أسبوع بعدها اختير طبق من كل عزلة وتم تقطيع الوسط ألزرعي المنمى عليه عزلة الفطر بوساطة سكين معقمة على شكل قطع صغيرة بعدها نقلت القطع بوساطة إبرة معقمة إلى خلاط كهربائي حاوي على 20مل من الكلوروفورم وثم مزج الخليط لمدة 10 دقائق بعدها تم ترشيح المزيج بواسطة ورق ترشيح ثم أخذ الراشح ووضع في دورق نظيف ومعقم ووضع في فرن كهربائي بدرجة حرارة 40 °م حيث ركزت الكمية إلى ما يقارب 1مل فقط . تم الكشف عن وجود سم الافلاتوكسين B_1 , باستخدام تقنية صفائح الكروماتوغرافي الرقيقة(TLC) ذات إبعاد (20×20) سم حيث نشطت الصفائح في الفرن الكهربائي بدرجة (120) م° لمدة ساعة قبل الاستعمال حيث اتبعت طريقة (الجميلي ، 1996) . واستخدم نظام الفصل كلوروفورم: ميثانول 98 : 2 .

تم عمل خط مستقيم خفيف على صفيحة TLC يبعد بمسافة (1.5) سم من قاعدة الصفيحة ، وأخذ15 مايكروليتر بواسطة أنبوبة شعرية من السم القياسي AFB_1 ووضع على الخط بمسافة 2 سم من الحافة اليسرى للصفيحة وعلى مسافة 2 سم من البقعة الخاصة بالسم القياسي الأول ثم وضعت عينات مستخلص الفطر *Aspergillus* spp على نفس المسافة وبكميه مساوية لكمية السم القياسي ، وبنفس الأسلوب السابق لباقي الفطريات، بعدها تركت البقع لتجف ثم وضعت في حوض الفصل الحاوي على مزيج الكلوروفورم والميثانول وبنسبة 5:95 حجم/حجم وتمت مراقبتها لحين وصول المحلول إلى مسافة تقارب 2 سم من النهاية العليا للصفيحة ، أخرجت الصفائح وجففت تحت ضروف المختبر ولمدة 5دقائق ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية

وبطول ألموجي 360نانوميتر وتم الكشف عن وجود الافلاتوكسين B_1 بمطابقة معامل الترحيل Rf ولون التألق للسم القياسي (Sobolev and Dorner,2002).

ثالثا / التشخيص الجزيئي Molecular Identification

لقد تم اجراء التشخيص الجزيئي للفطريات المعزولة في هذه الدراسة باستعمال طريقتين هما:

أولا: التشخيص الجزيئي باستعمال الواسم الجينية Internal transcribed spacer (ITS)

ثانيا: التشخيص الجزيئي بتحديد الجينوم الكامل للفطر المعزولة باستعمال تقنية تتابع الجيل التالي Next Generation Sequencing

أولا: استخلاص و تنقية الـ DNA DNA Extraction and Purification

جرت عملية استخلاص وتنقية للـDNA من مستعمرات الفطر النقية باستخدام العدة التجارية DNeasy Plant Kits المجهزة من شركة QIAGEN الألمانية ومن خلال اتباع الخطوات التالية:

1.جمعت 100-200 ملغم من المستعمرة النقية للفطر بعمر 10 أيام ونقلت الى أنبوب اختبار (Eppendrof tube) معقم سعة 1.5مل واضيف اليها 400 مايكروليتر من المحلول الدارئ AP1 بعدها سحقت العينة باستخدام المدقة البلاستيكية الصغيرة (Micropestle) المعقمة مع رج العينة عدة مرات باستخدام جهاز الهزاز (Vortex) والتأكد من سحق العينة بصور جيدة. لقد كان الغرض من هذه الخطوة هو تحطيم الخلايا الفطرية.

2. حضنت الانبوبة الحاوية على الخليط في حمام مائي بدرجة حرارة 65 م° لمدة 10 دقائق مع الحرص على رج الانبوبة يدويا 2-3 مرات اثناء فترة التحضين وكانت هذه الخطوة لغرض تحليل الخلايا الفطرية.

3.إضيف 130 ميكرولتر من المحلول الدارئ P3 إلى الانبوبة الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات بصورة جيدة باستخدام جهاز الهزاز وحضنت بعدها لمدة 5 دقائق على الثلج. ان هذه الخطوة تترسب فيها المنظفات الخاصة بالمحاليل الدارئ والبروتينات والسكريات المتعددة الخاصة بالفطر.

4.أجريت عملية طرد مركزي للأنبوبة بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم نقل المحلول الطافي الى انبوبة نوع QIAshredder Mini spin column ذات اللون الارجواني التي تحوي على مرشح خاص وأيضا أجريت لها عملية طرد مركزي بنفس السرعة أعلاه ولكن لمدة دقيقتين. ويعمل مرشح هذه الانبوبة على إزالة معظم الرواسب وحطام الخلايا الفطرية.

5.نقل الراشح إلى أنبوب اختبار جديدة معقمة سعة 2 مل واضيف اليه 700 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW1 ومزجت المحتويات مباشرة بواسطة الماصة الصغيرة.

6.نقل بعدها 650 ميكرو لتر من الخليط بواسطة الماصة الصغيرة إلى انبوبة نوع DNeasy Mini spin column ذات الون الأبيض والتي تحوي أيضا على مرشح خاص لغرض تنقية الـDNA وأجريت للأنبوبة عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة، تم التخلص بعدها من الراشح ونقل المتبقي من الخليط الى نفس الانبوبة وأجريت عملية طرد مركزي بنفس السرعة والفترة الزمنية مع التخلص من الراشح أيضا.

7.أضيف 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 الى نفس الانبوبة أعلاه مع أجراء عملية طرد مركزي لها بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح ثم اضيف مرة أخرى لنفس الانبوبة 500 ميكرو لتر من المحلول الدارئ AW2 وأجريت لها عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة دقيقتين وأيضا تم التخلص من الراشح. أن الغرض من هذه الخطوة هو لتنقية الـDNA العالق بالمرشح.

8.وضعت الانبوبة DNeasy Mini spin column بداخل انبوبة اختبار معقمة سعة 2 مل واضيف الى غشاء مرشح الانبوبة مباشرة 100 ميكرو لتر من المحلول الدارئ TE وحضنت بعدها الانبوبة لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الراشح الذي يحوي على الـDNA الكلي. ان الغرض من هذه الخطوة هو إزالة الـ DNA العالق بغشاء مرشح الأنبوبة ليكون مع الراشح.

9.حفظت الأنبوبة الحاوية على الـDNA الكلي تحت درجة حرارة 20-م° لحين الاستخدام.

جدول (3-4) البوادئ المستخدمة في تقنية Polymerase chain reaction (PCR)

Primer	Sequence 5 ⟶ 3		PCR product size
ITS1	F	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	500-800 bp
ITS4	R	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	

لقد كان برنامج التضاعف الخاص بالـ PCR يبدأ بخطوة التفككDenaturation ، لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 95 مْ ثم 35 دورة تتكون من ثلاثة مراحل: تبدأ بالتفكك لمدة 40 ثانيه وبدرجة حرارة 95مْ ثم الالتصاق Annealing لمدة 40 ثانيه بدرجة حرارة 55مْ بعدها التمدد Extensionلمدة دقيقة بدرجة حرارة 72 مْ. بعدها تبدأ الخطوة الأخيرة للتفاعل المتمثلة بالتمدد النهائي Final extension لمدة 5 دقائق بدرجة حرارة 72 مْ. ناتج التفاعل رحل باستخدام الترحيل الكهربائي على وسط Agrose تركيز 1.5% بعد إضافة 5مايكرو ليتر من صبغة بروميد الاثيديوم وبعدها استخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية لغرض فحص نتائج التفاعل.

ثالثاً: تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية

بعد اجراء عملية التضاعف الـPCR أرسلت النواتج إلى شركة Macrogen في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النيتروجينية لكل عينة فطرية، ولغرض معرفة التشابه بين الفطر المدروس والفطريات المسجلة عالميا تم الاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية نتائج البحث National Center for Biotechnology Information .

4.2.3.عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus Subtilis*

تم اختيار ثلاث مناطق في محافظة كربلاء في مناطق الجرية والعطيشي و الحسينية اذ أخذ من كل منطقه محددة عينه من التربة وبحجم 250 غم وبأعماق مختلفة ، 5سم، 10سم،15 سم ولكل موقع من المواقع، وضعت العينات في علبة بلاستيكية وتم ترقيمها ،ثم وضع 50غم من كل عينة في دورق زجاجي وعرضت لدرجة حرارة 80 مْ لمدة عشر دقائق لتخلص من الخلايا

الخضرية.بعد ذلك أخذت كمية مقدارها 1غم من كل عينة من عينات التربة وعملت منها سلسله تخافيف من10^{-1}-10^{-12} سحب واحد مل من التخفيف الأخير ووزع على ثلاثة إطباق بتري تحتوي على 20مل من الوسط ألزرعي Nutrient agar (المعقم بدرجة حرارة 121مْ وضغط 1 جو لمدة 15دقيقه) ونشر بطريقة التخطيط بواسطة ناشر زجاجي ومن ثم حضنت الإطباق بالحاضنة بدرجة حرارة 25-37 مْ ولمدة 24ساعة كررت هذه العملية لكل عينه من عينات التربة ولكل موقع وتم دراسة مايلي .(الاسدي,2013).

1.4.2.3.دراسة الخصائص المظهرية لبكتريا *Bacillus*

تمت المعاينة العينية ودراسة الخصائص المظهريه لمستعمرات بكتريا *Bacillus* وتحديد حجم المستعمرة ولونها ودراسة قوامها بعد التأكد من إن تلك المستعمرات مشابهه لمستعمرات بكتريا *Bacillus* .

2.4.2.3.دراسة الخصائص المجهرية لبكتريا *Bacillus*

تم اختيار عينه من المستعمرات المماثلة لصفات بكتريا *Bacillus* وذلك بأخذ مسحه بواسطة لوب الزرع ونشره وتثبيته على شريحة زجاجية معقمة وتصبيغه بصبغة كرام ومعاينة شكل الخلية البكتيرية وموقع السبور فيها،تلون الخلايا بالصبغة الزرقاء البنفسجية دليل على إن البكتريا المتصبغه بهذا اللون عائده إلى مجموعه البكتريا ألموجبه لصبغة كرام،إما الخلايا البكتيريه التي تأخذ الصبغةالحمراءفهي سالبه لصبغة كرام، (الجبوري، 1990: collee وجماعته، 1996).

3.4.2.3.تشخيص عزلة بكتريا *Bacillus* لتحديد النوع

بعد غربلة العزلات البكتيرية العائدة لجنس *Bacillus* واختيار العزلة الأكفأ من بينها تم تشخيص ألعزله مختبريا باستخدام جهاز فايتك VITEKS الجيل الثاني الاكثر تطورا.

4.4.2.3.حفظ عزلات البكتريا *Bacillus*

حفضت العزلات على وسط Nutrient agar بشكل مائل Slant وأيضا بشكل سائل في وسط Nutrint broth وذلك لغرض استخدامها بشكل متكرر في الاختبارات الأخرى ووضعت العزلات في الثلاجة وحفظت تحت درجة حرارة 4 مْ.

5.4.2.3.اختبار فعالية عزلات البكتريا *Bacillus* في تثبيط نمو الفطريات قيد الدراسة على وسط P.D.A و وسط Nutrient agar و وسط اكار جوز الهند

تم تنمية عزلات البكتريا *Bacillus* في وسط المرق المغذي والمحضر بحسب ماجاء في الفقرة(2.2.3) وبواقع 100مل لكل عزلة بكتيرية حضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة بعدها تم تهيئة وسط P.D.A وباقي الاوساط وكما جاء في الفقرة(2.2.3) موزع في اربعة دوارق زجاجية حجم 250 مل وبعد تعقيمه وتبريده لدرجة حرارة 40 مْ اظيف لكل دورق 1مل من لقاح إحدى عزلات البكتريا *Bacillus* وتم مزج اللقاح مع الوسط بالتحريك المستمر لمدة خمس دقائق بعدها صبت مكونات كل دورق في اثنى عشر طبق وتركت حتى يتصلب الوسط بعدها لقحت ثلاثة إطباق بأقراص من P.D.A المنمى عليها الفطر*A.flavus* ولاطباق الأخرى بأقراص وبنفس الحجم منمى عليها باقي الانواع الفطرية قيد الدراسة فضلا عن تهيئة نفس العدد من الإطباق فقط كمعاملة سيطرة لقحت بالفطريات فقط دون اضافة البكتريا وهكذا عوملت جميع العينات قيد الدراسة.و كررت العملية مع كل عزله من عزلات البكتريا *Bacillus*,بعدها حضنت جميع الإطباق بدرجة حرارة 25-30 مْ لمدة أسبوع ثم حسبت أقطار مستعمرات الفطريات في جميع الإطباق باستخدام مسطرة مدرجه ومقارنتها مع أقطار نفس الفطريات في معاملة السيطرة ومن ثم حددت الفعالية التضادية لكل عزلة من عزلات البكتريا *Bacillus* وعلى أساسها اختيرت ألعزله الأكفأ لاستخدامها في تصنيع المستحضر الحيوي(الاسدي،2013). وتم تكرار هذه الطريقة على وسط اكار جوز الهند وكذلك وسط Nutrint agar لغرض التاكد من النمو الفعال لكل من الفطريات والبكتريا وملائمة الأوساط لها .

5.2.3.مراحل تصنيع المستحضر الحيوي من لقاح بكتريا *B .subtilis* B1

1.5.2.3.تحديد الوسط ألتخمري المناسب لتنمية عزلة البكتريا *B.subtilis* B1

تم اختبار كفاءة ثلاث أنواع من مستخلصات حبوب الحنطة و الشعير و الذرة الصفراء لاستخدامها كأوساط تخمريه لتنمية لقاح البكتريا *B.subtilis*

1.أخذ 250غم من حبوب الذرة الصفراء والشعير والحنطة كلا على جانب ثم جرشت في إناء معدني وأضيف أليها 250 من الماء المقطر وتركت 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة.

2.رشح المزيج واخذ الراشح بحجم 250 مل وأضيف إليه 10 غم سكر السكروز ثم عقم المزيج بالموصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1 جو ولمدة 15دقيقة وتركت الأوساط لتبرد .

3. لقح كل دورق بخمس مستعمرات من البكتريا *B. subtilis* المنماة على وسط Nutrient agar وبعمر 24ساعة لكل من هذه الأوساط التخمرية وكلا على حده ثم حضنت الأوساط التخمرية لمدة 24ساعة وبدرجة حرارة 37م° . بعدها عملت سلسلة من التخافيف (10^{-1}-10^{-12}) لكل وسط من هذه الأوساط وأخذ 0.1 مل من التخفيف الأخير لكل وسط تخمري وزرع على وسط Nutrient agar وبواقع ثلاث مكررات لكل وسط ومن ثم تم حضنها بدرجة حرارة 37م° لمدة 24ساعة. وحسب معدل أعداد البكتريا في كل طبق ثم استخرج التركيز النهائي للبكتريا في المليلتر الواحد حسب معادلة Clark (1965).

عدد خلايا البكتريا (مل) = معدل عدد المستعمرات في كل طبق ×مقلوب التخفيف

2.5.2.3.اختبار ملائمة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة

تم اختبار كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم بوصفها مادة حاملة للقاح البكتريا *B.subtilis* وذلك بوضع 100غم من مادة كاربونات الكالسيوم في إناء نظيف ومعقم ووضع في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 160م° ولمدة ساعة وتركت لتبرد . ثم أضيف إليها 100 مل من الوسط ألتخمري السائل لمحصول الذرة الصفراء المحضر مسبقا والمنمى عليه بكتريا *B.subtilus* بعمر 24ساعة والذي اثبت كفاءة عالية في تنمية لقاح تلك البكتريا ثم نقلت الأواني إلى مجفف كهربائي بدرجة حرارة 40م° لمدة 5 أيام لحين جفافها جيدا (تراقب مرحلة الجفاف يوميا للتاكد من عدم وجود رطوبة تماما)بعدها تم طحن المسحوق المحملة عليه البكتريا في غرفة معقمة (Hood)، بعد ذلك حضرت سلسلة تخافيف من العينة المحضرة(10^{-1}-10^{-12}) ثم نقل 0.5 مل من التخفيف الأخير للعالق البكتيري إلى أطباق معقمة حاوية على وسط Nutrient agar وبواقع ثلاث مكررات وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 24ساعة . (حميد ،2001) . بعدها تم تقدير أعداد البكتريا في الغرام الواحد من المادة الحاملة حسب معادلة (1965) . Clark

عدد خلايا البكتريا (مل) = معدل عدد المستعمرات في كل طبق ×مقلوب التخفيف

3.5.2.3.تحديد نسبة وسط التخمر إلى المادة الحاملة

بعد إن أثبتت مادة كاربونات الكالسيوم كفاءتها كمادة حاملة للقاح البكتريا *B.subtilis* B1 اجري اختبار لتحديد نسبة وسط التخمر إلى المادة الحاملة وذلك بأخذ5مل من وسط الاكفاء المنماة فيه البكتريا بعمر 24 ساعة واخذ5مل منه ومزجها مع 5 غم من مادة كاربونات الكالسيوم أي بنسبة 1:1 كمااخذ 5مل من البكتريا ومزجه مع 10غم من كاربونات الكالسيوم أي بنسبة 2:1 واخذ 10مل من البكتريا ومزجها مع 5غم من كاربونات الكالسيوم وبذلك تكون النسبة 1:2 ،مزجت هذه المعاملات كلا على حده ووضعت بالفرن بدرجة 40 مْ لحين الجفاف و بعد جفافها اخذ1 غم من كل معامله وعملت منه سلسله من التخافيف (10^{-1}-10^{-12}) واخذ0.5 مل من التخفيف الأخير ونشر على وسط المرق المغذي و المحضر مسبقا وعملت ثلاثة مكررات من كل تخفيف وتم حساب عدد المستعمرات النامية بعدها حسب التركيز باستخدام معادلة (1965) .Clark

4.5.2.3.انتاج المستحضر الحيوي النهائي من عزلة البكتريا *B.subtilis*

على ضوء الاختبارات السابقة تم اعتماد الوسط ألتخمري المحضر من محصول الذرة الصفراء لتنمية البكتريا *B. subtilis* B1 ومادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح البكتريا ذاتها وبنسبة 1:2 (وسط تخمري : مادة حاملة) للتحضيرة النهائية للمستحضر الحيوي المصنع .

5.5.2.3.تقييم كفاءة المستحضر الحيوي في تثبيط نمو الفطريات قيد الدراسة

نفذ هذا الاختبار بطريقتين هما: -

اولا.طريقة المزج

حضر الوسط ألزرعي (potato dextros agar ووسط جوز الهند ووسط nutrient agar) بالطريقة نفسها الموضحة في ألفقره(2.2.3).ووزع في ثلاثة دوارق سعة 500 مل وبمعدل 250 مل لكل دورق(لكل وسط غذائي) ، عقمت الدوارق في جهازالمؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 مْ وضغط 1 جوولمدة 15 دقيقه ثم تركت قليلا لتبرد ، وبعدها أضيف إلى الدورق الأول كمية 0.5 غم من المستحضر الحيوي لبكتريا *B. subtilis* B1 ، والدورق الثاني 1غم وترك الدورق الثالث دون أضافه للمقارنة، ثم صبت محتويات

كل دوارق في 12 طبق بتري . وحضنت الإطباق الحاوية على البكتريا بدرجة حرارة 30 - 25 مْ ولمدة 24 ساعة (Leben *et. al*,1987) . لقح 12 طبق بالفطر *A. flavus* المنتج للافلاتوكسين B1 (تسعة إطباق) منها حاوية على البكتريا *B. subtilis* والثلاثة الأخرى غير حاوية على البكتريا للمقارنة وكررت العملية نفسها مع باقي العزلات الفطرية. ، وذلك بوضع قرص واحد قطره 5 ملم مأخوذ من طرف مستعمرة نامية بعمر أسبوع واحد في منتصف كل طبق ، حضنت الإطباق بدرجة حرارة 30 مْ ولمدة سبعة أيام . بعدها تم حساب مقدار التثبيط للنمو ألشعاعي لكل عزلة من العزلات المدروسة وذلك بأخذ معدل قطرين متعامدين وبتطبيق معادلة Abbott الواردة في كتاب المبيدات (شعبان و الملاح، 1993) .حسبت نسبة التثبيط

$$\textbf{Inhibition percentage} = \frac{R1-R2}{R1} \times 100$$

R1 = أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على أطباق لا تحوي على البكتريا (معاملة السيطرة) .

R2 = أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر النامي على الأطباق الحاوية على البكتريا.

ثانيا.طريقة التخطيط

حضر الوسط ألزرعي (PDA ووسط جوز الهند ووسط N.agar) بالطريقة نفسها الموضحة في ألفقره (2.2.3) ، وبمعدل 250 مل لكل دورق ، عقمت الدوارق في جهازالمؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 م وضغط 1 جوولمدة 15دقيقه ثم تركت قليلا لتبرد ،ثم لقحت الاطباق ببكتريا منماة بعمر 24 ساعه في وسط NB ثم حضنت لمدة 24 ساعه بعدها لقحت بأقراص من الفطريات قيد الدراسة قرص واحد (5)ملم لكل طبق وضع في مركز كل طبق،بعدها حضنت جميع الإطباق تحت درجة حرارة 25 مْ لمدة أسبوع .

وبعدها تم احتساب نسبة التثبيط حسب طريقة (Gamliel and Katan 1993)

$$\textbf{النسبة المئوية للظهور (\%)} = \frac{\textbf{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\textbf{عدد العينات الكلية}} \times 100$$

6.2.3.اختبار السلامة الصحية للمستحضر الحيوي

لغرض التعرف على مدى سلامة المستحضر الحيوي على النضم الحيوية للحيوانات المختبرية ليكون مؤشر على سلامته للإنسان نفذت تجربة استعملت فيها حيوانات الجرذ الأبيض وكما يلي:

1- تهيئة الحيوانات المختبرية

هيئ (12) حيوان من ذكور الجرذ الأبيض وبوزن 200-250 كيلوغرام وبعمر عشرة أسابيع وقسمت إلى أربعة مجاميع ضمت كل مجموعة 3 حيوانات وتم معاملتها عن طريق التجريع الفموي

2- معاملة الحيوانات تم معاملة الحيوانات وفقا لما موضح في الجدول (3-5).

جدول (3-5) جدول معاملة الحيوانات المختبرية

المعاملات	توصيف المعاملات
معاملة السيطرة	عدم تجريع الحيوانات
معاملة المستحضر الحيوي فقط	جرعت الحيوانات بالبكتريا المحملة فقط وبجرعة مقدارها0.5غم /كغم وزن الحيوان
معاملة لقاح البكتريا B1 *B.subtilis*	جرعت الحيوانات بلقاح البكتريا B1 *B.subtilis* فقط المنماة بالوسط المغذي NB بمقدار0.5مل/كغم (1.5×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة /مل)
معاملة الوسط المغذي فقط	جرعت الحيوانات بالوسط المغذي فقط وبمقدار 1مل /كغم وزن الحيوان

كررت هذه المعاملات ثلاث مرات وعلى مدار أسبوعين تركت بعدها الحيوانات لمدة اسبوع وتم خلال هذه المدة متابعة الأعراض السريرية التي يمكن ظهورها على الحيوانات المعاملة وبعد انتهاء مدة التجربة تم التضحية بالحيوانات بعد أن خدرت بمادة الكلوروفورم وشرحت عن طريق فتح التجويف ألبطني وسحب الدم بطريقة طعنة القلب (Heart Pincture) ووضع الدم المسحوب في أنابيب اختبار حاوية على مادة (EDTA) لإجراء فحوصات الدم

الفسيولوجية ، ثم أخذت عينات من أعضاء الكبد والكلى والأمعاء وحفظت في الفورمالين بتركيز10% لدراسة التغيرات النسيجية فيها (الاسدي،2013).

1.6.2.3.المعايير الفسلجية للدم

تمت عملية قياس معايير الدم باستخدام جهاز Automated Hematology analyzer المصنع من قبل شركة Japan/Sysmex KX – 21N وشملت الدراسة الفسلجية الاختبارات التالية

1. حساب اعداد كريات الدم الحمراء
2. حساب اعداد كريات الدم البيضاء
3. حساب كمية الهيموغلوبين
4. معدل مكداس الدم PCV

2.6.2.3.الدراسة النسجية

تحضير المقاطع النسجية Histological Section Preparation

حضرت المقاطع النسجية في مستشفى الصدر التعليمي في محافظة النجف الأشرف، إذ اتبعت طريقة Bancroft and Stevens (1982) والتي تضمنت ما يلي:

1- **الأنكاز (Dehydration) :** مررت النماذج في تراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي(70، 80، 90، 95، 100و 100%) لمدة1.5_2 ساعة في كل تركيز و ذلك لإزالة الماء منها.

2- **الترويق (Clearing) :** روقت العينات بالزايلين مرتين و لمدة 1_1.5 ساعة لكل مرة و ذلك لإزالة محلول الأنكاز من الأنسجة .

3- **التشريب (Infiltration):**شربت العينات بشمع البرافين المنصهر بدرجة حرارة 56م و ذلك بوضع العينات فيها مرتين و لمدة 1_1.5 ساعة لكل مرة .

4- **الطمر (Embedding) :** طمرت العينات في قوالب خاصة حاوية على شمع البرافين المنصهر و تركت لتتصلب.

5- **التقطيع(Sectioning) :** حضرت مقاطع نسيجية متسلسلة بسمك 5مايكرومتر باستعمال جهاز المشراح الدوار (Rotary microtome) و ثبتت النماذج على شرائح

زجاجية باستعمال لاصق البومين مايرMeyer ’s albumine)) بعدها وضعت الشرائح في الفرن بدرجة 56 م^{o} بصورة عمودية لمدة 20دقيقة لإزالة الشمع الزائد .

6- **التصبيغ (Staining):** صبغت المقاطع بصبغة الهيماتوكسلين إذ مررت الشرائح في (زايلين-كحول أثيلي مطلق 100%- كحول 95%- 90% -70%- صبغة الهيماتوكسلين) لمدة دقيقتين لكل منها ، ثم غسلت المقاطع بماء الحنفية ، و غطست في صبغة الآيوسين لمدة دقيقتين و غسلت بعدها بماء الحنفية ثم مررت بتراكيز تصاعدية في كل من الكحول الأثيلي (70%-90%-95%-100%) و الزايلين و لمدة دقيقتين لكل تركيز.

7- **التحميل (Mounting) :** وضع غطاء الشريحة باستعمال كندا بلسم . وبعدها تم تشخيص مدى سلامة المقاطع النسيجية

وتم تشخيصها من قبل الدكتور حيدر جبر كحيوش، استشاري الفحص النسيجي والخلوي في مدينة الامام الحسين (ع) الطبية، مدير وحدة الفحص النسيجي والحاصل على شهادة MBch.b ,FIBMS,consultant pathologist

7.2.3.تقيم كفاءة المستحضر الحيوي المصنع من بكتريا *Bacillus subtilus* B1 في حماية حبوب الحنطة من الاصابه بالفطريات *A.flavusDB1* والفطر *Rhizopus.MicrosporumDB1* والفطرDB3 *Talaromyce columbinus*

نفذت هذه التجربة وفقا للخطوات التالية_

اولا. تحضير لقاح الفطريات المدروسة المنتجة للافلاتوكسين B_1

تم تنمية الفطريات على وسط PDA المعقم إذ حضر الوسط PDA كما مبين في ألفقره (2.2.3) بعدها تم تحضير لقاح الفطريات كلا على حده وذلك بإضافة 20 مل من الماء المقطر المعقم لكل طبق ومن ثم حصاد الابواغ بواسطة قضيب زجاجي معقم بعدها تم حساب إعداد الابواغ بواسطة Haemocytometer .

ثانيا.تهيئة حبوب الحنطة تم جلب عينات من حبوب الحنطه من سايلو محافظة كربلاء المقدسة بتاريخ 2022/3/25 وبواقع 10 كغم بعدها تم إجراء اختبار أولي عن مدى تلوث تلك الحبوب بالأفلاتوكسينات .

تنفيذ المعاملات

نفذت المعاملات الاتيه على حبوب الحنطة قيد الدراسة وكما في الجدول(3-6)

جدول(3-6) تنفيذ المعاملات للتجربة الخزنية

رمز المعاملة	توصيف المعاملة
A.F1 فقط	**حبوب ملوثه بلقاح الفطر*A.flavus DB1* دون إضافة المستحضر الحيوي**
R.C	**حبوب ملوثه بلقاح *Rhizopus.spp* دون إضافة المستحضر الحيوي**
T.c	**حبوب ملوثه بلقاح الفطر*Taloromyces columbinus* دون إضافة المستحضر الحيوي**
B1+AF1	**حبوب ملوثه بلقاح الفطر*A.flavus* DB1 معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز0.5غم/كغم حبوب**
R+B1	**حبوب ملوثه بلقاح الفطر*Rhizopus.microsporum DB1* معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز0.5غم/كغم حبوب**
T+B1	**حبوب ملوثه بلقاح الفطر *Talaromyces. columbinus* DB3 معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز0.5غم/كغم حبوب**
B_1	**حبوب معامله بالمستحضر الحيوي بتركيز0.5غم/ كغم حبوب**
Control	**حبوب بدون تلويث بلقاح الفطر وغير معامله بالمستحضر الحيوي**

B1=عزلة بكتريا *Bacillus subtilis* B1 المعزولة من التربة*

نفذت المعاملات أعلاه وذلك بوضع 100 غم من حبوب الحنطة في كيس نايلون نضيف وأضيف إليه10 مل من لقاح الفطر*A.flavus* DB1 مع رج الكيس لتوزيع لقاح الفطر بعدها مباشرة أضيف 0.5غم من المستحضر الحيوي ورج الكيس جيدا لتوزيع المستحضر على أسطح

الحبوب ،كررت العملية ثلاث مرات (ثلاثة مكررات) لكل معامله ونفذت نفس الخطوات السابقة في حال استخدام لقاح *T.colompinus* في تلويث حبوب الحنطة بدلا من لقاح الفطرDB1 *A.flavus* .واتبع نفس الأسلوب في تنفيذ باقي المعاملات.بعدها وضعت حبوب كل معامله بثلاث أكياس من البولي فينايل كلورايد وبواقع 100 غم /كيس أعقب ذلك خزن الأكياس تحت ظروف المختبر ولمدة ستة أشهروبعد مرور ستة من الخزن حسبت المؤشرات التالية:

اولا / تقدير إعداد البكتريا في الغرام الواحد من الحبوب:

تم اخذ عينات من الحبوب المخزونة عشوائيا من كل مكرر من مكررات كل معامله عوملت بالمستحضر الحيوي وكلا على حده ثم وضع هذا الوزن واحد غم من الحبوب في أنبوبة اختبار زجاجيه معقمه بحجم 20مل حاوية على 9مل ماء مقطر معقم رجت محتويات كل أنبوبه جيدا واخذ منها 1مل وأضيف إلى أنبوبة اختبار أخرى حاوية على الكميه نفسها من الماء المقطر المعقم وهكذا تم عمل سلسلة تخفيفات عشريه حتى 10^{-12} تحت ظروف التعقيم التام مع استعمال ماصة نضيفة معقمه لكل تخفيف على انفراد.نقل 1مل من كل تخفيف من التخافيف (10^{-6}, 10^{-8} , 10^{-10} ،10^{-12}) إلى إطباق بتري معقمه قطرها 9ملم حاوية على الوسط ألزرعي (NA) وبثلاثة إطباق لكل تخفيف حضنت الإطباق بدرجة حرارة 35مْ لمدة 24 ساعة (حميد،2001) وبعد فترة التحضين حسبت إعداد المستعمرات في كل طبق وطبقت معادلة Clark (1965) لحساب إعداد البكتريا المتواجدة على أسطح البذور.

عدد خلايا البكتريا/غم=معدل عدد المستعمرات × مقلوب التخفيف

ثانيا / حساب كمية سم الافلاتوكسين بطريقة HPLC بعد مرور ستة اشهر من تخزين الحبوب المعاملة

اتبعت طريقة AOCO (2005) لكشف وقياس تركيز AFB1 حيث اتبعت الخطوات التالية

1. اخذت كمية 25غم من الحبوب المجروشة ووضعت في دورق سعة 250 مل واضيف اليها 25 مل ميثانول و25 مل كلوروفورم وتركت على جهاز الهزاز Shakerلمدة ساعة.
2. رشحت العينة بورق ترشيح نوع Whatman No.4واضيف اليه 25مل ميثانول 90% وفصلت بقمع الفصل.
3. نقل الراشح الى قمع فصل واضيف اليه 25مل هكسان و25مل ميثانول 90%، اخذت الطبقة السفلى الحاوية على الميثانول والتي جففت فيما بعد بالحمام المائي .

4. اضيف للعينة كلوروفورم : ماء مقطر بنسبة 25:25مل وفصلت بقمع الفصل اذ مررت الطبقة السفلى خلال ورق ترشيح حاوي على 10غم من كبريتات الصوديوم الامائية، أخذ الراشح وجفف بالحمام المائي على درجة حرارة (50م).
5. حفظت العينات في المجمدة لحين قياس تركيز AFB1بتقنية HPLC.

اجري الفحص في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا – دائرة البيئة والمياه باستخدام جهاز كرموتوغرافيا السائل ذو الاداء العالي موديل (سيكام - SYKAMN) الماني المنشأ ، حيث استخدم الطور الناقل : اسيتونترايل : ماء مقطر (70 : 30) وكان عمود الفصل : (C18 – ODS (25cm * 4.6 mm) لفصل السموم الفطرية واستخدم كاشف الفلورة (ex=365nm , em= 445nm) للكشف عن السموم الفطرية ، اذ كان سرعة جريان الطور الناقل هي : 0.7 ml / min .

ثالثا / قابلية المستحضر الحيوي للخزن

بعد الانتهاء من عملية إنتاج مسحوق المستحضر الحيوي الجاف تم تخزينه في قناني نايلون (بولي اثلين) في ظروف المختبر وبعد مرورشهرواحد من الإنتاج تم تقدير إعداد البكتريا في الغرام الواحد وكررت العملية أيضا بعد مرور (3) أشهر من إنتاج المستحضر الحيوي وبنفس الأسلوب الوارد سابقا وكررت بعد مرور ستة أشهر. (الاسدي، 2013 والعاشور ،2009) .

8.2.3.تنقية إنزيم التانيز

يستخدم إنزيم التانيز على نطاق واسع في التطبيقات الصناعية والغذائية والطبية وهذا يتطلب تنقيته لغاية التجانس، ويمكن تحقيق التنقية بسلسلة من الخطوات المتعاقبة بغض النظر عن نوع الإنزيم والكائن المنتج. **اجري الفحص في مختبرات وزارة العلوم والتكنولوجيا**

1.الترسيب بكبريتات الأمونيوم: من المسلم به أن يتم فصل الراشح الأنزيمي من مزرعة البكتريا بعد مرور 3 أيام على التحضين في المزارع السائلة في أولى خطوات التنقية والتي يتم فيها معاملة الراشح الأنزيمي الخام بعد تثبيت حجمه بكبريتات الامونيوم وبنسبة اشباع 75 % والذي يضاف بصورة تدريجية في حمام ثلجي مثبت على محرك كهربائي مع التحريك المستمر لمدة 24 ساعة. أعقبها نبذ الراشح الأنزيمي المعامل بكبريتات الامونيوم بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 14000 دورة /دقيقة لمدة 15دقيقة.

2.الديلزة Diylasis: يؤخذ الراسب من الخطوة السابقة ويضاف اليه كمية من المحلول الدارئ Sodium acetate ذو الأس الهيدروجيني 5 مع تثبيت الحجم النهائي، يوضع المزيج في أكياس الديلزة وتربط نهايتي الكيس بخيط بإحكام، تغمر الأكياس في بيكر زجاجي حاوي على المحلول الدارئ سعة 1 لتر مثبت على محرك كهربائي وتترك لمدة 24 ساعة مع الأخذ بنظر الأعتبار تبديل المحلول الدارئ كل 8 ساعات. بعد إنتهاء المدة الزمنية تقدر الفعالية الأنزيمية وكمية البروتين .

3.كروماتوكرافيا المبادل الأيوني DEAE-Cellulose: تسهم هذه الخطوة بتحقيق تنقية جزئية للأنزيم وتتم غالبا بأخذ 20 غم من حبيبات المبادل الأيوني ومزجها بـ 500 مل من المحلول الدارئ ووضعها في حمام مائي عند درجة حرارة تتراوح ما بين (80-90) °م مع التحريك المستمر ولمدة ثلاث ساعات. يترك بعدها المزيج ليبرد في درجة حرارة الغرفة يعقبها غسل الهلام المنشط بالمحلول الدارئ ويعلق بالمحلول الدارئ نفسه وتجرى له عملية طرد الغازات Degassing بتمريره على جهاز Vaccum. يسكب الهلام في عمود الكروماتوكرافي ذو الأبعاد (20×2.5) سم بهدوء على الجوانب العليا منه. يضاف المحلول الأنزيمي باستخدام محقنة طبية سعة 10 مل بهدوء على الجوانب العليا للعمود وتتم عملية الموازنة والاسترداد باستخدام المحلول الدارئ نفسه وبسرعة جريان 30 مل /ساعة وبواقع 3 مل /جزء. جمعت الأجزاء المستردة من الأنزيم في أنابيب أختبار وقدرت بها الفعالية الأنزيمية وتركيز البروتين.

كرست خطوة التنقية الأخيرة التي يتم فيها تنقية الأنزيم لغاية التجانس باستخدام هلام السيفادكس من النوع Sephadex –G150، تحققت الخطوة بتعليق 20 غم من الهلام في 500 مل من المحلول الدارئ الذي جرى تنشيطة كما في الخطوة السابقة، كما تم غسل الهلام ولمرتين بذات المحلول الدارئ، بعدها عُبئ الهلام في عمود التنقية ذو الابعاد (1.5 ×40) سم. أعقبها إضافة 10 مل من الأنزيم المستحصل عليه من الخطوة السابقة بهدوء على الجوانب العليا للعمود مع مراعاة ترك مسافة 2 سم من العمود. جرى استرداد الأجزاء المنقاة المفصولة بالمحلول الدارئ عند سرعة جريان 30 مل / ساعة. جمعت الأجزاء المستردة من الأنزيم في انابيب إختبار. استخدم جهاز التجفيد للحصول على الإنزيم بشكل مسحوق صلب لدراسة خصائصه البايوكيميائية واستخدامه في التطبيقات المختلفة (Whitaker and Bernard, 1972).

1.8.2.3.إختبار السمية الخلوية لأنزيم الـ Tannase

إستخدمت كريات الدم الحمراء للإنسان للتحري عن السمية الخلوية للأنزيم، إذ حضرت عدة تراكيز 25، 50، 75 و 100 مايكروغرام / مل من الأنزيم المنقى في محلول الفوسفات المنظم الملحي Phosphate buffer saline (إستخدم لوحده كمعاملة سيطرة) . وضع 0.8 مل من كل تركيز من التراكيز المجهزة اعلاه في أنبوبة أختبار معقمة واضيف أليها 0.2 مل من الدم بحيث يصبح الحجم النهائي 1 مل في كل أنبوبة. تركت الأنابيب في الحاضنة عند درجة حرارة 37 °م لمدة 3 ساعات، تم بعدها عمل شرائح زجاجية من كل أنبوبة وملاحظة تحلل كريات الدم الحمراء ام لا ودونت النتائج (Xian-guo and Ursula,1994).

2.8.2.3.إختزال سم الافلاتوكسين AflatoxinB1

للبرهنة على قابلية أنزيم التانيز الخام والمنقى على إختزال سمية وتركيز الافلاتوكسين المنقى تجاريا من العزلة البكتيرية *B. subtilis* B1. إستخدمت أنابيب أختبار معقمة وضع 1 مل من الانزيم المنقى والخام في كل أنبوب كلا على حده، اضيف لكل انبوبة 0.2 مل من الافلاتوكسين بتركيز 10 مايكروغرام/مل مع المزج اليدوي. وضعت الانابيب في حاضنة هزازة عند سرعة رج 150 دورة / دقيقة ودرجة حرارة 15°م لمدة تحضين 72 ساعة. سحبت الأنابيب من الحاضنة الهزازة بعد إنتهاء مدة التحضين وسكبت مكوناتها في قمع فصل واضيف لكل أنبوب ضعف الحجم من المذيب العضوي الكلوروفورم مع الرج بحذر. أعيدت عملية الأضافة لثلاث مرات وملاحظة تكون طبقتين. سحبت الطبقة العليا وركزت بالمبخر الدوار للحصول على مسحوق جاف. حفظ المسحوق المستحصل عليه في قناني زجاجية معتمة في الثلاجة عند درجة حرارة 4 °م. لاحقا تم التشخيص بحقن 20 مايكروليتر من مزيج التفاعل في عمود جهاز كروماتوكرافيا السائل فائق الأداء، نوع العمود المستخدم C18 ذو الأبعاد (2.4×250) سم، الطور المتحرك Acetonitrile: Water بنسبة (70:30) بمعدل سرعة جريان 1 مل في الدقيقة.

التحليل الإحصائي: حللت جميع التجارب بحسب التصميم العشوائي الكامل وحيد العامل وتم تحويل النسب المئوية تحويلا زاويا وتمت مقارنة المتوسطات وفقا لاختبار اقل فرق معنوي L.S.D وعند مستوى احتمال 0.05 . (الراوي وخلف الله ، 1980) .

1.4.عزل وتشخيص الفطريات المرافقة لاصناف المكسرات والحبوب المحلية

في هذه الدراسة تم الحصول على 440 عزلة تعود إلى خمسة أجناس من الفطريات الخيطية فضلا عن الخمائر كما مبين في الجدول (4-1) حيث كانت عدد عزلات الفطر *Aspergillus* spp. هي الأكثر سيادة بين الأنواع المعزولة حيث بلغت نسبة ظهوره 260 عزلة ووهذا يتفق مع الأسدي (2013) و(2013) Nyirahakizimana etal حيث اكدا ان هذا النوع هو الأكثر سيادة في المكسرات والبذور.

جدول (4-1) يبين عدد عزلات الانواع الفطرية المعزولة من بعض أنواع المكسرات والحبوب المحلية

ت	الانواع الفطرية المعزولة	عدد العزلات
1	***A.flavus***	**96**
2	***A. niger***	**88**
3	***A.parasiticus***	**76**
4	***Penicillium* spp.**	**66**
5	***Rhizopus* spp.**	**54**
6	***Talaromyces columbinus***	**25**
7	***Yeasts***	**35**
المجموع		**440**

اضهرت نتائج العزل والتشخيص وجود وسيادة لعزلتي الفطر *A.niger , A.flavus* في جميع أنواع المكسرات والحبوب قيد الدراسة كما مبين في جدول رقم (4-2) حيث كانت أعلى نسبة ظهور للفطر *A.flavus* في فستق الحقل 90%أمافي الذرة الصفراء اللوز الجوز والشعير فقد كانت النسبة 60%في حين كانت النسبة في الجوز 60% وفي الكاجو 40% أماأقل نسبة ظهور للفطر كانت في البندق والذرة حيث بلغت 20% .أما*A.niger* فقد سجل أعلى نسبة ظهور في فستق الحقل 80% وفي الجوز 70% أما في الذرة والكاجو والشعير بلغت النسبة 40% أمافي باقي الأصناف تراوحت النسبة بين 20-30% .أماالفطر *A.parasiticus* سجلت أعلى نسبة ظهور له في الحنطه*واللوز* وفستق الحقل حيث بلغت النسبة 80% و80% و 90% أمافي باقي الاصناف كانت النسبة بين 30-70% وكانت أقل نسبة ظهور له في البندق 20%.

أمابالنسبة للفطر *Talaromyces columbinus* فقد كانت نسبة ظهوره قليلة جدا في الأصناف من المكسرات والحبوب المعزولة اذ تتجاوز اقصاها 50% في الذرة.حين سجل الفطر *Rhizopus* spp. في الذرة 60% وأقل ظهور له بلغ 10% في فستق الحقل .كما ظهرت في العينات بعض الخمائر وبنسبة تراوحت بين 10-30% .

أما بالنسبة لتردد الفطريات المشار إليها في الجدول (4-3) فقد كانت أعلى نسبة تردد للفطر *A.flavus* في فستق الحقل بنسبة 70% أمافي باقي الاصناف تراوحت بين 45-75% .أماالفطر *A.niger* كانت نسبة ترددة عالية في الذرة وفستق الحقل حيث بلغت 52% أمافي بقية الاصناف كانت النسبة 10-40% .أماالفطر *A.parasiticus* كان أكثر تردد في الحنطة 66.5 %وفستق الحقل بنسبة 65% وفي باقي الاصناف كانت النسبة 28.8-60.4% .أما الفطر*Penicillium* spp سجل أعلى تردد له في الجوز وبنسبة 65.1% وأقل تردد في الذرة 30% والكاجو بنسبة 26.8% وكانت أعلى نسبة ظهور للفطر *Talaromyces columbinus* في البندق وبنسبة 68.5% وفي باقي الاصناف كانت النسبة 17.4-35.1% .

أماالفطر *Rhizopus* spp. فقد كانت أعلى نسبة تردد له في الذرة 39.3% . أما تردد نسبة الخمائر تراوحت بين 3.2-24.8% .

نتائج الدراسة تتفق مع دراسة مماثلة Zohri (2006) اشار فيها إلى ان الفطر *A.flavus* ظهر في المكسرات والحبوب جميعها والمتمثلة بالجوز والفستق الحلبي والبندق والكاجو واللوز فضلا عن وجود الفطر *A.parasiticus* وتتفق هذه الدراسة مع الحدراوي (2011) التي اثبتت أن الفطريات التي تعود إلى *Aspergillus* و *Penicillum* هي الأكثر تواجد واصابة للعديد من بذور المحاصيل الستراتيجية تحت ظروف الخزن السيئة .

كذلك تتفق هذه الدراسة مع دراسة اجراها الحميري(2020) على حبوب الأرزفي الاسواق المحلية في كربلاء حيث سجلت الفطريات التالية نسبة ظهور وتردد عالية *Penicillium* spp ,*A.niger* , *Curvularia* spp. , *A. flavus*. *A.candidus*حيث تم الحصول على 50عينة من الفطر *A.flavus* وكانت جميعها منتجة لسم الافلاتوكسين B1 .

اشار الراوي وأخرون (2010) ان نسبة ظهور وتردد الفطر *A.niger* كانت أعلى من نسبة ظهور وتردد الفطر *A.flavus* المرافق لحبوب الذرة في مدينة الموصل .وفي دراسة

اجرتها الأسدي (2013) وجدت إن أكثر الفطريات سيادة وأكثرها ظهورا في الحبوب والبذور هي نوع فطريات *Aspergillus* spp .

وهذا يعتمد على الظروف البيئية من درجة حرارة ودالة هيدروجينية وطبيعة المادة الغذائية الملائمة لنمو الفطريات حيث بين Ababutain(2011) إن درجات الحرارة والرطوبة من العوامل المحددة في نمو الفطر *A.niger* ووجد (ALGarni *et al* ,2007) و (2008) Nawar إن نمو الفطر يزداد بزيادة الرطوبة النسبية وان الرطوبة المنخفضة تمنع نمو الفطر .كما وجد ALWakeel (2008) إن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر هي 30م ْ بينما وضح (ALGarni *et al*، 2007) إن درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر هي 25 م ْ.

إن سبب سيادة الفطر *Aspergillus* spp يعود إلى المتطلبات الغذائية البسيطة فضلا على القدرة العالية على انتاج وحدات تكاثرية لاجنسية (كونيدات) والقابلية العالية على تحمل الظروف البيئية الحرجة وامتلاكه لنظام انزيمي متعدد مكنته من استغلال المصادر الغذائية المختلفة (1997،العاني).

جدول(4-2) يبين النسبة المئوية لظهور الفطريات المعزولة من انواع المكسرات والحبوب

انواع المكسرات والحبوب	نسبة الظهور (%) للفطريات						
	A.flavus	***A.niger***	***A.parasiticus***	***Penicellium* spp**	***Rhizopus* spp**	***Talaromyces colombinis***	**بعض الخمائر**
الذرة	60	40	40	55	60	50	10
الحنطة	60	20	80	95	20	30	30
الشعير	60	40	70	50	30	30	20
فستق الحقل	90	80	90	85	10	40	25
اللوز	70	20	80	95	20	30	30
الكاجو	40	40	60	75	30	40	15
جوز	60	70	30	60	20	30	25
بندق	20	30	20	40	70	20	10

جدول(4-3) يبين النسبة المئوية لتردد الفطريات المعزولة من المكسرات والحبوب

انواع المكسرات والحبوب	نسبة التردد (%) للفطريات						
	A.flavus	***A.niger***	***A.parasiticus***	***Penicelliumm* spp**	***Rhizopus* spp**	***Talaromyces colombinis***	**بعض الخمائر**
الذرة	45	52	30.1	30	39.3	17.4	6.3
الحنطة	38	10.3	66.5	55.7	12.2	18.6	24.8
الشعير	42.5	45.1	60.4	38.7	10.9	21.3	19.3
فستق الحقل	70	52	65	50.8	7.8	20.2	14.5
اللوز	45	42.3	60.3	46.8	25.3	24.8	5.5
الكاجو	20	38.7	52.2	26.8	14.9	35.1	17.3
جوز	40	50	48.3	65.1	25.4	29.4	10.8
بندق	7.5	15.8	28.8	30.4	14.7	68.5	3.2

2.4.الكشف عن قدرة عزلات الفطريات على إنتاج سم الافلاتوكسين B_1

استخدمت تقنيات مختلفة في الكشف عن قدرة عزلات الفطريات المدروسة على إنتاج الافلاتوكسين وهي:

اولا/ طريقة الامونيا

بينت نتائج الكشف باستعمال وسط جوز الهند والأمونيا على قدرة بعض عزلات الفطر *Aspergillus* spp المعزولة من أنواع المكسرات والحبوب والمتمثلة بـ (فستق الحقل ، الجوز ، الكاجو ، اللوز ، البندق،الذرة،الحنطة والشعير) على انتاج الأفلاتوكسينات إذ ظهر تغير واضح في لون قواعد المستعمرات وظهور اللون الأحمر وبدرجات مختلفة وهذا التدرج في اللون ربما يعود إلى اختلاف قدرة العزلات على انتاج الافلاتوكسينات ، وهذا يتفق مع ما ذكره كل من Machida and Saito (1999) ، إذ أوضحا أن درجة اللون الأحمر تعود إلى الكميات المنتجة من الافلاتوكسينات ، فالعزلة ذات اللون الاحمر الغامق تدل على قدرتها في انتاج كميات أكبر من العزلات التي تكون قواعد مستعمراتها حمراء فاتحة او وردية .إذ بينت نتائج الدراسة الحالية إلى ان نسبة عزلات الفطر *Aspergillus.spp* في اغلب العزلات لها المقدرة على انتاج الافلاتوكسين بينما هناك عدد قليل جدا 5%غير قادرة على انتاج الافلاتوكسينات.

وهذه النتيجة مقاربة لدراسة أوضحت أن نسبة إنتاج الأفلاتوكسينات من قبل عزلات الفطر *A. flavus* المعزولة من مكونات المكسرات كانت 59.1% (الخلف ,2011) واشارت الجبوري (2012) ان نسبة انتاج الافلاتوكسينات لنفس الفطر المعزول من الأغذية المتداولة في الاسواق المحلية لمحافظة النجف الأشرف كانت 72.9%.وفي دراسة أجراها Abbas *et al*.(2004) أكد فيها أن 70 % من عزلات الفطر *A.flavus* منتجة للافلاتوكسينات.

وهذا لا يعني أن العزلات غير المنتجة للافلاتوكسينات *Aspergillus* spp غير قادرة على إنتاج هذه السموم بل ربما يعود إلى طبيعة مكونات الوسط أو درجة حرارة الحضن.(صالح وجماعته ،2009) وكذلك يعزى سبب ذلك إلى وجود المنافسة الحيوية بين الفطريات حيث ذكر (Cotty and Bayman,1993) ان الفطريات *A.niger, Penicillium spp* و *Fusarium* هي منافسات شديدة للفطر *A.flavus* لإنها تعمل على الحد من انتشاره في المادة الغذائية وتمنعه من انتاج الافلاتوكسين .إذ وجد Kumar *et al*.(2007) نسب اخطاء تحدث اثناء الكشف تصل إلى 8% ولكن كانت النسبة مختزلة إلى 7% لدراسة Abbas *et al*,(2004) .كما وجد Abdel-Hadi *et al*.(2011) لدراسة الافلاتوكسينات المتواجدة في 18 عزلة للفطر *A.flavus* في الفستق في مصر إن وسط جوز الهند فشل في الكشف عن 5 عزلات مقارنة بطريقة PCR التي اثبتت ان جميع العزلات كانت منتجة للافلاتوكسينات .

وعن طريق هذه النتيجة يتضح عدم كفاءة هذا الوسط للكشف عن الافلاتوكسينات بصورة دائمة حيث جاءت هذه الدراسة متوافقة مع ما توصل اليه Yazdani *et al*.(2010) الذي اختبر قدرة الفطرين *A.flavus* و*A.niger* على انتاج الافلاتوكسينات في وسط جوز الهند والامونيا و اعطى هذا الوسط نتائج سلبية لكلا الفطرين حيث ذكر إن وسط جوز الهند لا يعتمد علية في الكشف عن الافلاتوكسينات بسبب الحساسية العالية للفطر *Aspergillus* لمكونات هذا الوسط.

ثانيا/ الكشف باستخدام طريقة صفائح الكروماتوغرافيا الرقيقة (T.L.C)

اظهر الكشف الكيمياوي بتقنية TLC قدرة عزلات الفطريات على انتاج الافلاتوكسين B_1 وهذه النتيجة مقاربة لما وجدته العبيدي (2011) إذ حصلت على أربعة عزلات من الفطر *A. flavus*منتجة للافلاتوكسين من أصل خمسة عزلات تم الحصول عليها من الحنطه والذرة الصفراء كذلك تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما وجدته الساعدي (2012) إذ إنها حصلت على

اربعة عزلات من الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* منتجه لسموم الافلاتوكسين B_1 B2 .,

استنادا إلى التالق الشديد للعزلات المدروسة تم اختيار أقوى العزلات تالقا وكان عددها أربعة عزلات لاجراء الكشف الجزيئي لها وتاكيد تشخيصها جينيا.

ثالثا /الكشف باستخدام تقنية (P.C.R)

أ. تحليل تتابعات نواتج التضخيم

أرسلت نواتج الجينات المضخمة إلى شركة Macrogen الكورية ليتم تحديد تتابعات القواعد النتروجينية، وأعتمدت تلك التتابعات بمقارنتها مع ما يتوفر من المعلومات حول هذا الجين في الموقع الالكتروني للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI من خلال الموقع الالكتروني (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore) وحسب برنامج BLAST Nucleotide وذلك للتعرف على نوع العزلة المنتخبة، سجلت تتابعات القواعد في NCBI من خلال ملئ الاستمارة الخاصة بتسجيل جين ITS18 للحصول على رقم وصول Accession number خاص للعزلة المحلية، كما رسمت شجرة العلاقة الوراثية Phylogenetic tree للعزلة المحلية بعد مطابقتها لسلالات ذات الصلة القريبة منها في NCBI وبالأعتماد على برنامج Blast Tree View.

بينت نتائج العزلات نسبة تطابق 100% مع العزلات العالمية وقد اعتبرت أول تسجيل للعزلات في البنك الجيني واعطيت أرقاماً خاصة كما مبين في الجدول رقم (4-4)

جدول رقم (4-4) يبين الارقام المسجلة في البنك الجيني لعزلات الفطريات المشخصة جينيا

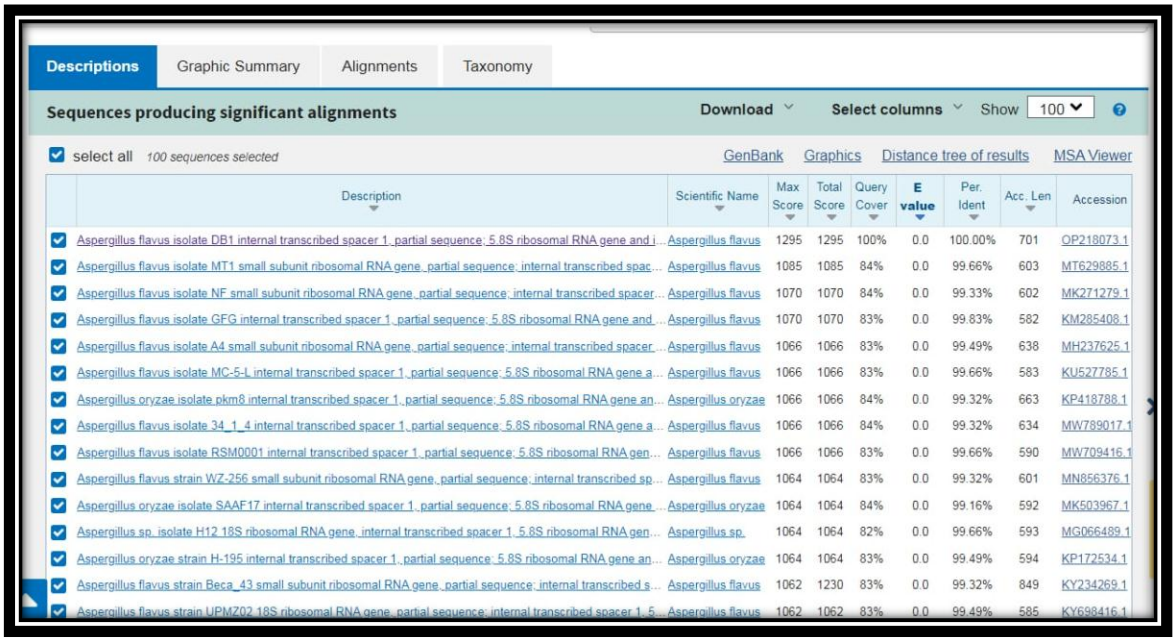
رقم العزلة في البنك الجيني	نوع الفطر	ملحق
OP218073	***Aspergillus flavus* DB1**	**1,2,3,4**
OP297961	***Aspergillus flavus* DB2**	**5,6,7,**
OP218074	***Talaromyces colompinus* DB3**	**8,9,10,11**
OP205376	***Rhizopus microspores* DB1**	**12,13,14,15**

حيث تعتبر المنطقة البينية الفاصلة ITS1 و ITS4في الجين الرايبوسومي S18 ثابتة وتستخدم بنجاح في تمييز انواع الفطريات المختلفة وتعطي نتائج حاسمة في التشخيص (Marciano *et al*,2005).

ب/ تحديد تسلسل القواعد النتروجينية وتحليل المعلوماتية الحيوية والشجرة الوراثية Phylogeny

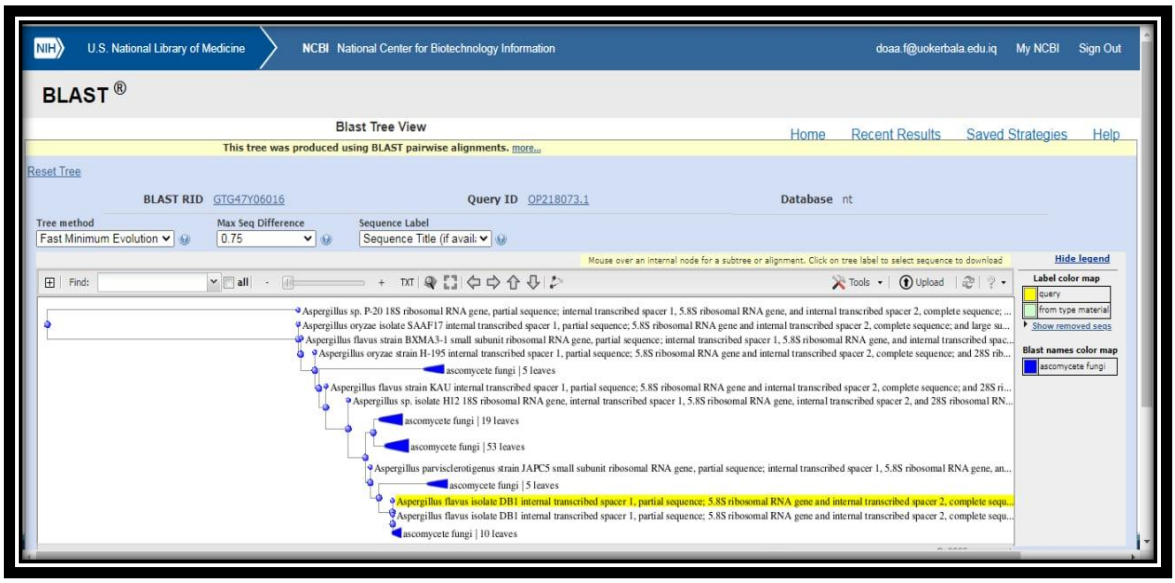
بينت نتائج تحليل تسلسل القواعد النتروجينية (Nucleotide sequence) لحزم الحامض النووي المضاعفة وباستعمال برنامج NCBI وبمقارنتها مع البيانات المتوفرة في المركز الوطني لمعلومات التقانة الاحيائية (NCBI). إن العزلات الأربعة المرسلة تعود كل منها إلى

العزلة التي تحمل الرقم OP218073 والمسجلة في البنك الجيني تعود إلى الفطر *Aspergillus flavus* DB1حيث كانت نسبة التطابق مع العزلات العالمية بنسبة 100% كما مبين في الشكل رقم(4-1)



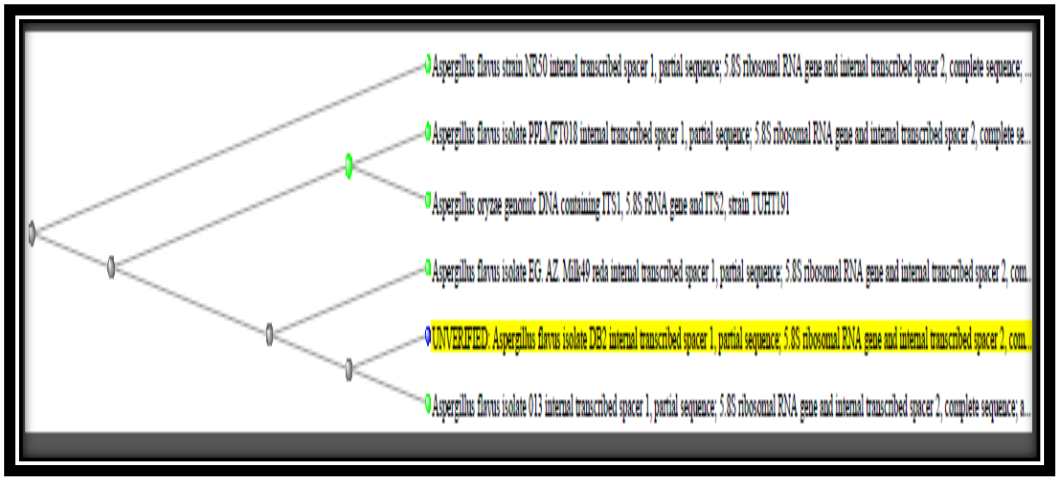
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Aspergillus flavus isolate DB1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and i...	Aspergillus flavus	1295	1295	100%	0.0	100.00%	701	OP218073.1
Aspergillus flavus isolate MT1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spac...	Aspergillus flavus	1085	1085	84%	0.0	99.66%	603	MT629885.1
Aspergillus flavus isolate NF small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Aspergillus flavus	1070	1070	84%	0.0	99.33%	602	MK271279.1
Aspergillus flavus isolate GFG internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Aspergillus flavus	1070	1070	83%	0.0	99.83%	582	KM285408.1
Aspergillus flavus isolate A4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer...	Aspergillus flavus	1066	1066	83%	0.0	99.49%	638	MH237625.1
Aspergillus flavus isolate MC-5-L internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Aspergillus flavus	1066	1066	83%	0.0	99.66%	583	KU527785.1
Aspergillus oryzae isolate pkm8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Aspergillus oryzae	1066	1066	84%	0.0	99.32%	663	KP418788.1
Aspergillus flavus isolate 34_1_4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Aspergillus flavus	1066	1066	84%	0.0	99.32%	634	MW789017.1
Aspergillus flavus isolate RSM0001 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gen...	Aspergillus flavus	1066	1066	83%	0.0	99.66%	590	MW709416.1
Aspergillus flavus strain WZ-256 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Aspergillus flavus	1064	1064	83%	0.0	99.32%	601	MN856376.1
Aspergillus oryzae isolate SAAF17 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene ...	Aspergillus oryzae	1064	1064	84%	0.0	99.16%	592	MK503967.1
Aspergillus sp. isolate H12 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gen...	Aspergillus sp.	1064	1064	82%	0.0	99.66%	593	MG066489.1
Aspergillus oryzae strain H-195 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene an...	Aspergillus oryzae	1064	1064	83%	0.0	99.49%	594	KP172534.1
Aspergillus flavus strain Beca_43 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Aspergillus flavus	1062	1230	83%	0.0	99.32%	849	KY234269.1
Aspergillus flavus strain UPMZ02 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5...	Aspergillus flavus	1062	1062	83%	0.0	99.49%	585	KY698416.1

شكل رقم (1-4)تطابق عزلة الفطر *Aspergilus flavus* DB1 التي تحمل الرقم OP218073 مع العزلات العالمية في البنك الجيني



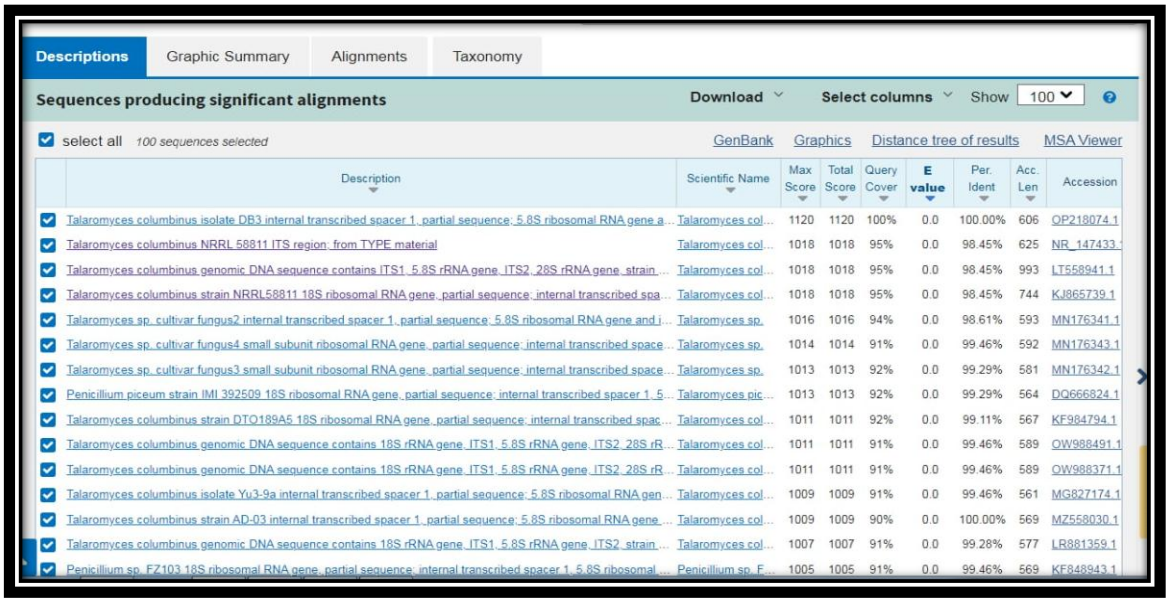
شكل (4-2): الشجرة الوراثية للفطر *Aspergillus flavus* isolate DB-1 التي تحمل الرقم OP218073 (محددة بالون الاصفر) والتي أنشئت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA فضلا عن تتابعات سلالات عالمية معروفة لنفس الفطرالممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. إن المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining.

العزلة التي تحمل الرقم OP297961 والمسجلة في البنك الجيني تعود إلى الفطر *Aspergillus flavus*DB2حيث كانت نسبة التطابق مع العزلات العالمية بنسبة 100% كما مبين في الشكل رقم (4-3)

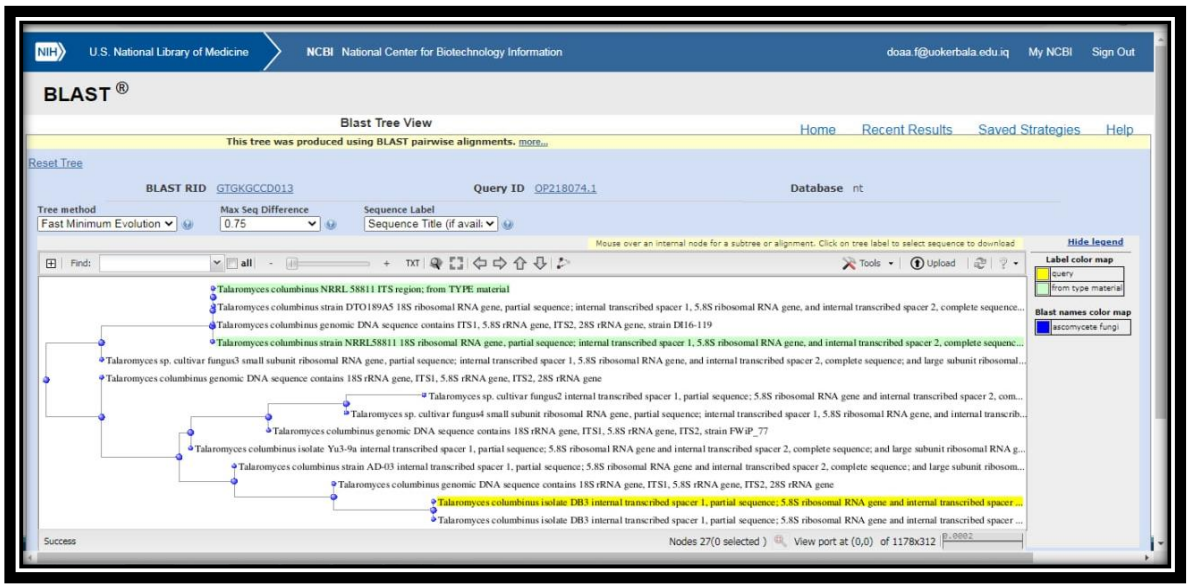


شكل (4-3): الشجرة الوراثية للفطر *Aspergillus flavus* DB2 التي تحمل الرقم OP297961 (محددة بالون الاصفر) والتي بنيت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA بالاضافة إلى تتابعات سلالات عالمية معروفة لنفس الفطرالممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining.

العزلة التي تحمل الرقم OP218074 والمسجلة في البنك الجيني تعود إلى الفطر *Talaromyces colombinus* حيث كانت نسبة التطابق مع العزلات العالمية بنسبة 100% كما مبين في الشكل رقم(4-4)

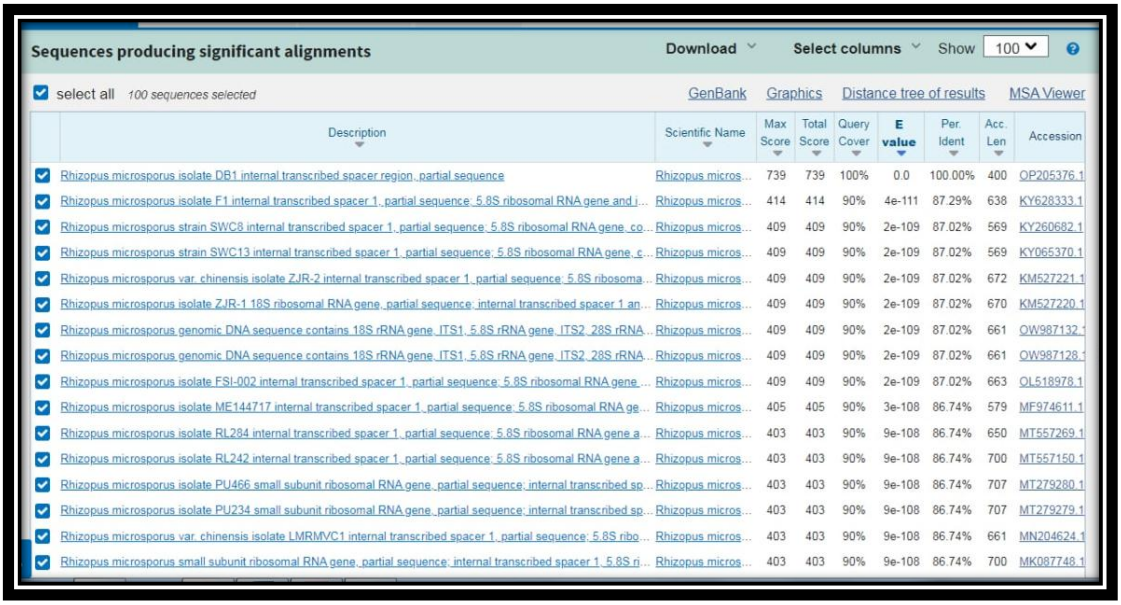


شكل رقم (4-4)تطابق عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3 التي تحمل الرقم OP218074 مع العزلات العالمية في البنك الجيني

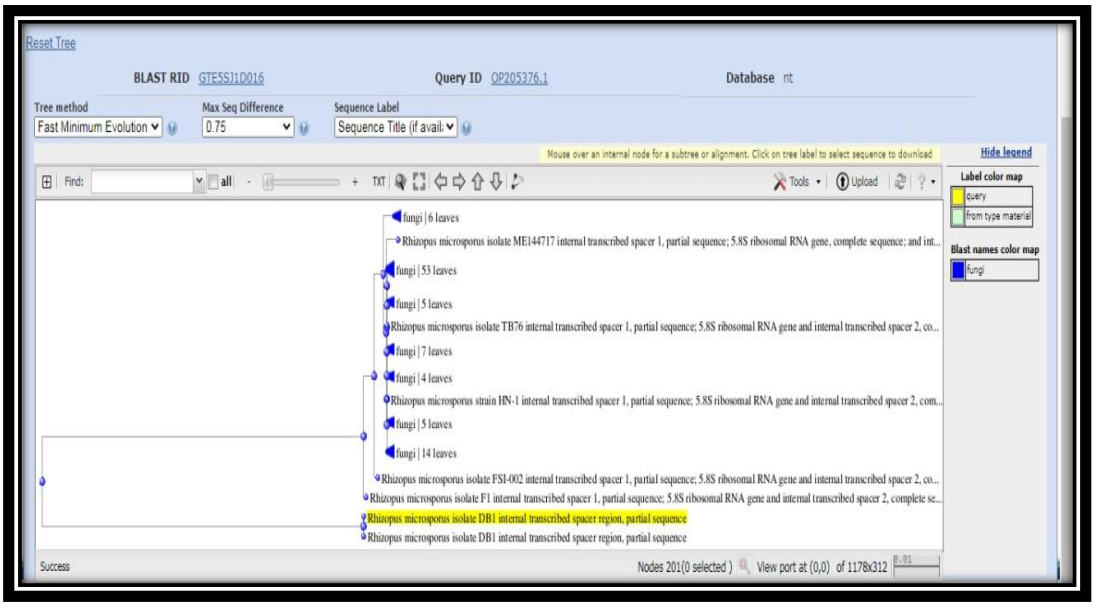


شكل (4-5): الشجرة الوراثية للفطر *Talaromyces columbinus* isolate DB3 التي تحمل الرقم OP218074 (محددة بالون الاصفر) والتي بنيت بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA فضلا عن تتابعات سلالات عالمية معروفة لنفس الفطرالممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining .

العزلة التي تحمل الرقم OP205376 والمسجلة في البنك الجيني تعود إلى الفطر *Rhizopus microspores* DB1 حيث كانت نسبة التطابق مع العزلات العالمية بنسبة 100% كما مبين في الشكل رقم(4-6)



شكل رقم (4-6)تطابق عزلة الفطر *Rhizopus microspres* DB1 التي تحمل الرقم OP205376 مع العزلات العالمية في البنك الجيني



شكل (4-7): الشجرة الوراثية للفطر *Rhizopus microspores* DB1 OP205376 (محددة بالون الاصفر) والتي تم انشائها بالاعتماد على تتابعات قواعدها النايتروجينية لمنطقة ITS-rDNA فضلا عن تتابعات سلالات عالمية معروفة لنفس الفطرالممرض تم الحصول عليها من مستوعب بيانات GenBank. ان المسافات الوراثية تم حسابها باستخدام طريقة neighbor-joining.

تضمنت الدراسة تشخيص أربع عزلات ذات كفاءة عالية في انتاج سموم الافلا. وسجلت في البنك الجيني العالمي، وقد وجد إن استعمال الطرائق التقليدية غير كاف في معظم الحالات، بسبب النمط الظاهري الغير متماثل وتعدد الاشكال فضلا عن اختلاف الظروف البيئية، فقد شخصت باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) اعتمادا على بواديئ معدة لغرض التشخيص الجزيئي.

بينت النتائج إن تسجيل هذه الفطريات يعد أول تسجيل في البنك الجيني العالمي بحسب ما موضح في معلومات التسجيل ودراسة التقارب والتشابه بين الفطريات المسجلة ، واستعملت الشجرة الوراثية لمعرفة ارتباط الانواع الخاصة بكل جنس مع النوع المراد تحديده فضلا عن الصفات والخصائص المظهرية كطريقة للحصول على التشخيص الدقيق اضافة إلى التشخيص التقليدي وان تحديد النمط الجيني مهم في تصنيف الفطريات .استخدمت منطقة SSU على نطاق واسع في التصنيف والتشخيص الجزيئي نظرا لسهولة تضخيمها وامتلاكها مدى واسعآ من التباين حتى في الأنواع ذات الصلة العالية تم استعمال تضخيم منطقة SSU الخاصة بrRna لغرض تحديد الأنواع وتم أولا فحص تسلسل الحامض النووي للتاكد من تسلسل النيوكليوتيدات ومن ثم مقارنتها مع السلالات العالمية الأخرى ،واستعمل برنامج NCBI-BLAST واعطى نتائج دقيقة بمقارنتها مع السلالات العالمية كما تم استعمال برنامج التحليل الوراثي التطوري الجزيئي (BLAST) وهو أحد التطبيقات المصممة للتحليل لمقارنة تسلسل الجينات المماثلة والعلاقات التطورية ونمط تطور الحامض النووي والبروتين.(Kumar *et al* ,2008).

يعزى سبب الانتشار الواسع لهذه الفطريات في أماكن مختلفة حول العالم إلى امكانية انتقالها عن طريق استيراد وتصدير المواد الغذائية المختلفة والبضائع كذلك امكانية انتقالها عن طريق الاشخاص الحاملين لها.

3.4.عزل وتشخيص بكتريا *Bacillus*

تم الحصول على ثلاث عزلات من بكتريا *Bacillus* وبواقع ثلاث مناطق من تربة محافظة كربلاء وتم الاعتماد في تشخيص العزلات على:

1.التشخيص المجهري Microscopic Identification

بينت نتائج الفحص ألمجهري لمستعمرات عزلات البكتريا المثبتة على شرائح زجاجيه والمصبغة بصبغة كرام،إنها خلايا عصوية قصيرة إلى متوسطة الطول بعضها سميك منتفخ

والأخر عصيات نحيفة نسبيا ذات نهايات متساوية موجبه لصبغة كرام مكونة للسبورات بعضها يكون انتفاخا حول موقع السبور يدعى الحافظة (Sporangia) والقسم الأخر لايكون محفظة وكانت بعض مواقع السبور مركزية (Central) ولأخر شبه طرفي (Sub terminal) تتطابق هذه الصفات مع ما أشار إليه كل من (collee *et.al*;1996) والعاشور(2009) من صفات مجهريه لإشكال خلايا بكتريا *Bacillus* وطبيعة انتظامها.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن جميع العزلات التي تم عزلها كانت موجبة لصبغة غرام ويمكن تفسير ذلك على أساس إختلاف تركيب الجدار الخلوي في البكتريا الموجبة حيث يتركب جدار البكتريا الموجبة من طبقة ببتيدوكلايكان مكونه من واحد الى اربعين طبقة مكونة من شبكة متماسكة من الخيوط الدقيقة وعند صباغتها بصبغة Crystal violet واليود فإنها تنفذ من فتحات الشبكة وتتصبغ باللون الأزرق أو البنفسجي وبعد غسلها بالكحول تنكمش فتحات الشبكة محتفظة بذلك بالون البنفسجي (صالح، 2005).

1.3.4.الصفات المظهريه لمستعمرات عزلة البكتريا *B. subtilis*

من خلال الفحوصات ألمختبريه لنمو البكتريا على وسط الأكار المغذي ظهرت مستعمراتها بشكل دائري وكبيرة نسبيا، ملساء ذات حافة مستديرة سرعان ما تتحول إلى حافة مفصصه بتقدم النمو ولونها أبيضآ إلى تبني باهت وتميل إلى اللون التبني الداكن بتقادم النمو ويتراوح قطر المستعمرة بين 1.5ملم_3.5ملم وهذا يتطابق مع ما جاء به Mcfadden (2002) والعاشور (2009).

اولا / الوصف ألمجهري لخلايا عزلة البكتريا *B. subtilis*

اظهرت نتائج الفحص المجهري للشرائح المثبتة والمصبوغة بصبغة كرام لمستعمرات بكتريا *Bacillus* إنها بكتريا عصويه قصيرة نسبيا موجبة لصبغة كرام ومكونه للسبورات وتتكون هذه السبورات بشكل واضح بعد مدة تحضين 24ساعة وتكون في وسط الخلايا الخضرية للبكتريا وعند استمرار النمو لفترة 48 ساعة تتحلل معظم الخلايا البكتيرية وتتحرر السبورات وهذه الصفات تتفق مع ما جاء به الغزي **(**2017**).**

ثانيا / التشخيص بواسطة نظام - VITEK الجيل الثاني

تم تشخيص عزلة البكتيريا بهذا النظام و باستعمال العدة التشخيصية BCL cards و أستعمل هذا الجهاز في التشخيص لقدرته على إعطاء النتيجة خلال مدة قصيرة و بشكل دقيق و هو مطور من قبل شركة Biomerieux الفرنسية و تستعمل هذه التقنية أيضا لإجراء فحص حساسية البكتريا للمضادات الحياتية ضمن مدة تتراوح بين 5 - 8 ساعات و لا يحتاج إلى إضافة أي مواد عدا المجهزة من قبل الشركة و المرفقة به أماطريقة عمله فهو يعمل أوتوماتيكيا دون الحاجة إلى تدخل العاملين عليه و يعطي النتائج بطريقة سهلة إذ يكون مرتبط بحاسبة إلكترونية يتم تسجيل النتائج عليها يستطيع الباحث الحصول عليها بسهولة و تصل نسبة تشخيصه إلى حوالي 99 .%.

الجيل الأول من هذا النظام Vietk BAC يسمح بتشخيص 17 نوع فقط من جنس *Bacillus* (Odumeru et al., 1999) مما أدى إلى تطوير نظام Vitek 2 اعتمادا على تخمر المصادر الكربونية والفعالية الإنزيمية والمقاومة للمضادات مثل Kanamycin وOleadomycin وPolymyxin B ويحتوي BCL card على 46 اختبار والذي يسمح بتشخيص 42 نوع من هذاالجنس وأي عزلة لم يتم تشخيصها بواسطة هذا النظام فإنها تشخص بطرق أخرى مثل الطرق الجزيئية (Halket *et al*., 2010)**.**

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed March 16, 2022 10:02:02 AM CDT

Patient Name: Patient ID: 153202210
Location: Physician:
Lab ID: 153202210 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
Selected Organism : Bacillus subtilis

Source: **Collected:**

Comments:	

Identification Information	**Analysis Time:**	13.92 hours	**Status:**	Final
Selected Organism	91% Probability **Bionumber:**	**Bacillus subtilis** 1373060615557671		
ID Analysis Messages				

Biochemical Details

1	BXYL	+	3	LysA	-	4	AspA	-	5	LeuA	+	7	PheA	+	8	ProA	-
9	BGAL	+	10	PyrA	+	11	AGAL	+	12	AlaA	+	13	TyrA	+	14	BNAG	(-)
15	APPA	-	18	CDEX	-	19	dGAL	-	21	GLYG	-	22	INO	+	24	MdG	+
25	ELLM	-	26	MdX	-	27	AMAN	-	29	MTE	-	30	GlyA	+	31	dMAN	+
32	dMNE	+	34	dMLZ	-	36	NAG	-	37	PLE	+	39	IRHA	-	41	BGLU	+
43	BMAN	+	44	PHC	(-)	45	PVATE	+	46	AGLU	+	47	dTAG	-	48	dTRE	+
50	INU	+	53	dGLU	+	54	dRIB	+	56	PSCNa	-	58	NaCl 6.5%	+	59	KAN	+
60	OLD	+	61	ESC	+	62	TTZ	+	63	POLYB_I	+						

شكل رقم (4-8) تشخيص عزلة البكتريا *Bacillus subtilis* B1 باستخدام جهاز فايتك

4.4. اختبار الفعالية التضاديه لعزلات البكتريا تجاه الفطريات محور الدراسة

أظهرت نتائج الجدول رقم (4-5) اختبار الفعالية التضاديه قدرة عزلات البكتريا *Bacillus subtillus* فعالية عالية في تثبيط نمو الفطريات .

جدول (4-5) الفعالية التضادية لعزلات البكتريا *Bacillus* المعزولة من عينات تربة محافظة كربلاء

(B_1) العزلة البكتيرية الأولى. (B_2) العزلة البكتيرية الثانية.(B3) العزلة البكتيرية الثالثة

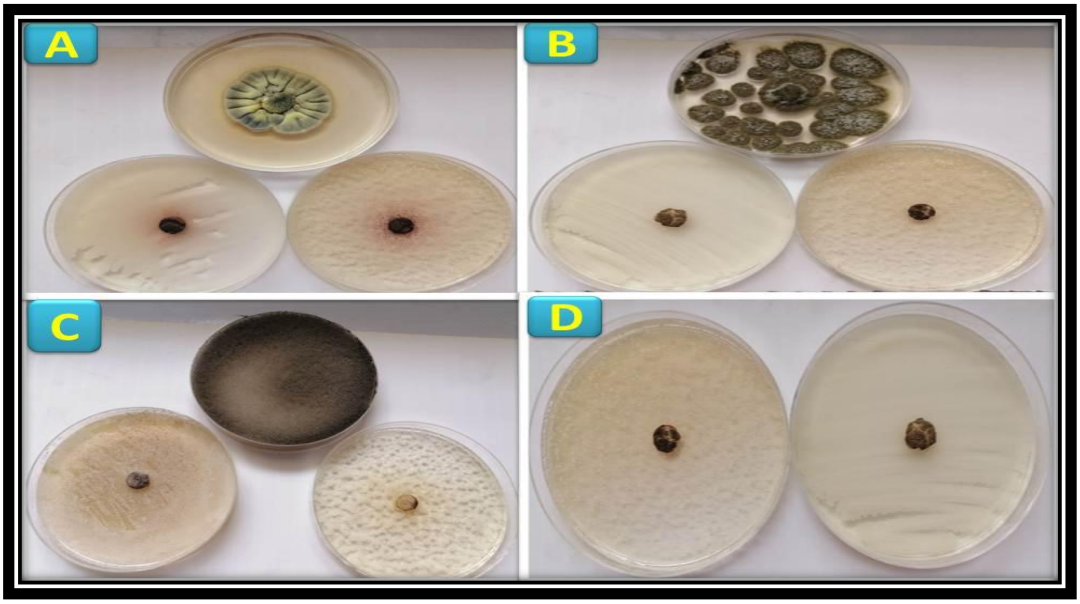
الفطر	العزلات البكتيرية	تثبيط نمو الفطريات%
A.flavusDB1	**B_1**	**100**
	B_2	**75**
	B_3	**50**
A.flavusDB2	**B_1**	**100**
	B_2	**60**
	B_3	**45**
T.colombinous DB3	**B_1**	**100**
	B_2	**75**
	B_3	**60**
R.microsporus DB1	**B_1**	**100**
	B_2	**80**
	B_3	**75**

على ضوء نتائج اختبار القدرة التضاديه والموضحة في الجدول (4-5) تم اختيار عزلة واحدة والتي أبدت فعاليه اكبر من بقية العزلات اتجاه الفطريات قيد الدراسة وهي B_1.

1.4.4.اختبار فعالية بكتريا *Bacillus subtillus* B1 في تثبيط نمو الفطريات محور الدراسة

1 .طريقة المزج والتخطيط

أثبتت نتائج هذه الاختبارات ألمبينة في الشكل (4-9) قدرة بكتريا *B.subtilis* B1 على تثبيط نمو الفطريات قيد الدراسة وبصورة تامة (100%) وقد يعود السبب إلى إن بكتريا*B.subtilis* B1 تنتج العديد من المضادات الحيوية مثل Bacillomycin D وهو مضاد أساسي في السيطرة على نمو الفطر *Aspergillus* spp والسيطرة على إنتاج سموم الافلاتوكسين (moyne *et.al*;2001) ومضاد Iturin وهو بروتين دهني له القدرة على تثبيط معظم الفطريات عند استعماله بتركيز 50 جزء بالمليون فضلا عن إفرازها للانزيمات المحللة لجدران الخلايا الفطرية كأنزيم chitinase المحلل للكايتين وانزيم proteasr المحلل للبروتين والذي يساهم في تثبيط النمو ألشعاعي للفطريات (الحيدري والمصلح،1989)،وهذا يتطابق مع ما توصل إليه ألعميدي (2009) من قدرة البكتريا*B.subtilis* على تثبيط نمو الفطرين *A.niger*و*A.flavus* على الوسط ألزرعيP.D.A حيث تمتلك هذه البكتريا مركبات مضادة للنمو الفطري.



شكل رقم (4-9) يوضح نسبة التثبيط لبكتريا *B. subtillus* B1

A/تثبيط الفطر *T. colompinus* DB3 B/تثبيط الفطر *A.flavus* DB1

C/تثبيط الفطر *R. microsporum* DB1 D/التثبيط *A.flavus* DB2

5.4.مراحل تصنيع المستحضر الحيوي

1.5.4. تحديد الوسط الزرعي الملائم لنمو البكتريا B_1 *B.subtilis*

اظهرت نتائج هذا الاختبار ملائمة وسط مستخلص الذرة الصفراء لنمو عزلة البكتريا *Bacillus subtilis* B_1 مقارنة بمستخلص الحنطة والشعير إذ بلغت إعداد البكتريا للعزلة في الوسط الأول (الذرة الصفراء) 12.50×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة في حين بلغ 7×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة في مستخلص الشعير أمامستخلص الحنطة فكانت إعداد عزلة البكتريا أقل بقليل من الإعداد التي وجدت في مستخلص الشعير.

قد يعود سبب تفوق وسط مستخلص منقوع الذرة الصفراء على احتوائه على العناصر المغذية الملائمة لنمو البكتريا كالسكريات والأحماض الامينيه والفيتامينات كفيتامينAوBوE وغيرها فضلا على احتوائه على العناصر المعدنية الكبرى والصغرى كالبوتاسيوم والحديد والصوديوم وغيرها والتي تحفز على زيادة سرعة انقسام الخلايا الخضرية للبكتريا وبالتالي زيادة ألكتلة الحيوية لهذه البكتريا (العاشور،2009).

2.5.4.تقيم كفاءة مادة كاربونات الكالسيوم كمادة حاملة للقاح البكتريا *Bacillus subtilis* B1

أوضحت نتائج الاختبار عدم وجود أثار سلبية لمادة كاربونات الكالسيوم على نمو البكتريا *B.subtillus* B1 وتجلى ذلك من خلال وجود إعداد كبيرة من خلايا البكترية في الغرام الواحد من هذه المادة إذا بلغت 10^{12}x10 وحدة تكوين مستعمرة/غرام وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره العاشور(2005)من ملائمة هذه المادة لحمل خلايا بكتريا *Bacillus cereus* .وتلعب مادة كاربونات الكالسيوم دورا مهما في زيادة فعالية المستحضرات الحيوية ألداخله في تصنيعها من خلال قدرتها على تثبيط نمو الفطريات الممرضة بتأثير غير مباشر مثل تغير طبيعة الوسط الغذائي وتغير الأس الهيدروجيني إذ إنها تغير الوسط الزرعي نحو القاعدية عند تحللها مائيا بإعطائها ايونات الهيدروكسيل السالبة (عواد،1986)، وبما إن الفطريات عموما تفضل في نموها الوسط المتعادل أو قليل الحامضية (انكلود،1980) فالتغير في قيمه PH للوسط يؤثر في جاهزية العناصر الغذائية التي تحتاجها الفطريات ومن ثم تثبيط معدلات نموها (بالكرامي وفيرما،1988)،فضلا على كونها مادة متوفرة محليا ورخيصة الثمن الأمر الذي يقلل من كلفة الإنتاج الواسع.

3.5.4.تحديد نسبة الوسط ألتخمري لمستخلص حبوب الذرة الصفراء إلى المادة ألحاملة CaCo3

بين هذا الاختبار إن أفضل نسبة إضافة الوسط ألتخمري إلى المادة ألحاملة (CaCo3)هي 1:2 إذ بلغت إعداد البكتريا في الغرام الواحد 150×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة/غم في حين تراجعت الإعداد عند النسبة 1:1 وسط تخمري:ماده حاملة إلى 90×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة/غم وكذلك الحال عند النسبة 2:1 وسط تخمري:ماده حاملة.

وتعتمد هذه النتائج بعض الدراسات التي أشارت إلى مثل هذه النتائج فالباحث العاشور (2005) والأسدي (2013) إن نسبة 1:2 وسط تخمري: مادة حاملة ذات فعالية في زيادة إعداد البكتريا في الغرام مقارنة بالنسب الأخرى كما تماثل ما توصلت إليها ألعبيدي (2011) والتي أشارت إلى إن النسب 1:1و1:2 وسط تخمري: ماده حاملة أعطت إعدادا فعاله من البكتريا *B. licheniformis* في الغرام الواحد من المادة الحاملة ولم يكن بين هاتين النسبتين فارق معنوي في إعداد البكتريا الموجودة في الغرام الواحد.

من هنا يتضح ان لزيادة تركيز البكتريا في الوسط المنماة عليه فعالية أكثر مما لو كانت النسبة متساوية للبكتريا إلى المادة الحاملة حيث ان مضاعفة حجم الوسط الحاوي على البكتريا أهمية في زيادة عدد الخلايا البكتيرية.

4.5.4.تقدير إعداد البكتريا في الغرام الواحد من المستحضر الحيوي

اظهرت النتائج إن إعداد خلايا البكتريا في الغرام الواحد بلغت 120×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة/غم بعد الإنتاج مباشرة في حين انخفضت قليلا بعد مرور ستة أشهر من الإنتاج إذ وصلت إلى 95×10^{12} وحدة تكوين مستعمرة/غم وهذا الانخفاض يعزى إلى تأثرها بدرجات الحرارة وانخفاض الرطوبة مما يؤدي إلى فقدان عدد من الخلايا الخضرية لحيويتها لان مقاومة الخلايا الخضرية لظروف درجات الحرارة المتطرفة أقل بكثير من مقاومة السبورات الداخلية (collee *et al*.1996) ونتائج هذه الدراسة تماثل ما توصلت إليها العديد من الدراسات السابقة(العاشور،2009 و الهاشمي،2014).

6.4.اختبار ألسلامة الصحية للمستحضر الحيوي.

اولا/تأثير المستحضر الحيوي في المعايير الفسلجية للحيوانات المختبرية

بينت نتائج الفحص الفسلجية عدم وجود فروق معنوية بين جميع المعاملات وحسب اختبار Tuky المشار اليه في الملحق رقم 16 في الصفحة رقم 126 .

1. تأثير المستحضر الحيوي في إعداد كريات الدم البيض

أظهرت النتائج عدم وجود فروق معنويه في معدل إعداد كريات الدم البيض بين المعاملات الأربعة (المستحضر الحيوي ووسط المرق المغذي وكاربونات الكالسيوم ومعاملة السيطرة) حيث بلغت 9.1. ،9.5 ،9.2 ،9.8 على التوالي إذ تقع ضمن الحدود الطبيعية لمعدل خلايا الدم البيض في الجرذ الأبيض .

2.تأثير المستحضر الحيوي في معدل ترسيب كريات الدم الحمر

أوضحت النتائج عدم وجود فرق معنوي في معدل ترسيب كريات الدم الحمراء للجرذان المعاملة بالمستحضر الحيوي والمادة الحاملة ووسط المرق المغذي ولقاح عزلة البكتريا *B. subtilis* B_1 كلا على حدة في معدلات اعداد كريات الدم الحمروالبالغه 7.7 ,7.45,7.42,7.60% مقارنة مع معامل السيطرة والبالغه 7.75 إذ كانت جميعا ضمن الحدود الطبيعية.

3.تأثير المستحضر الحيوي في معدل Hb

اظهر النتائج عدم وجود فروق معنوية في كمية الهيموكلوبين في دم الحيوانات المعاملة بالمستحضر الحيوي والمادة الحاملة ومعاملة لقاح البكتريا إذ بلغت 12.3 11.83,11.29,12,38 غم/100مل مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغه 12 وهذه الفروقات لم تكن فروقات معنويه فضلا عن كونها ضمن الحدود الطبيعية لمعدل هيموكلوبين الدم .

4.تأثير المستحضر الحيوي في معدل مكداس الدم PCV

اوضحت النتائج عدم وجود فروقات في معدلات قيم مكداس الدم لدى حيوانات الجرذ الابيض المعامله بكل من المستحضر الحيوي المصنع وكاربونات الكالسيوم ولقاح عزلة البكتريا

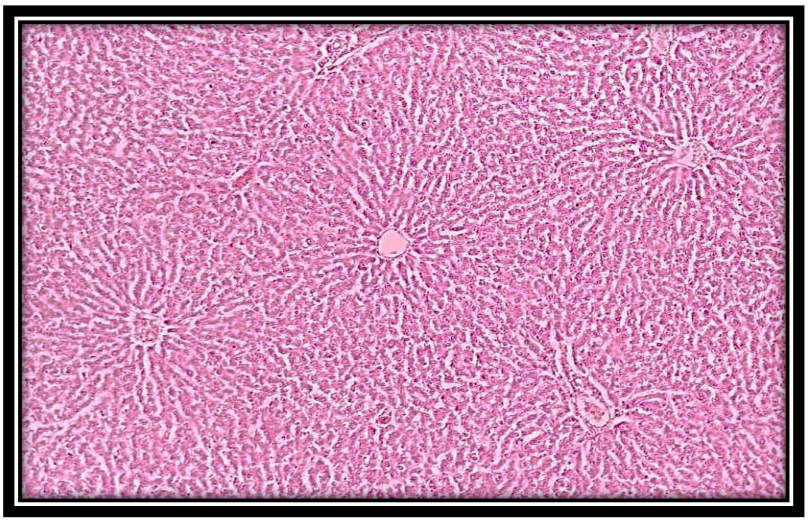
ووسط المرق المغذي وكلا على حدة إذ بلغت 38.3 ,39.55 ,38.46,40.45 % مقارنة بمعاملة السيطرة والبالغه 41.32 وهذه المعدلات تقع ضمن الحدود الطبيعية.

بينت نتائج هذه الاختبارات والمشار إليها سابقا ان جميع المعاييركانت ضمن الحدود الطبيعية (Titez,1995)وهي مماثله لما وجده عدد من الباحثين فقد ذكرت الأسدي(2013) إن المستحضر الحيوي المصنع من عزلة البكتريا *B.subtilis* كان امنا من الناحية الصحيه ولم يؤثر سلبا في معايير الدم كأعداد كريات الدم البيض وخلايا الدم الحمر ومكداس الدم وكمية الهيموكلوبين وحصلت الجبوري(2011)على نتائج مقاربة لنتائج هذه الدراسة ومن جانب أخر وجدت العبيدي (2011)ان المستحضر الحيوي المصنع من لقاح بكتريا *B.licheniformis* لم يظهر أي تاثيرات غير طبيعية في معايير الدم الفسيولوجية والنسيجية في أفراخ الدجاج.

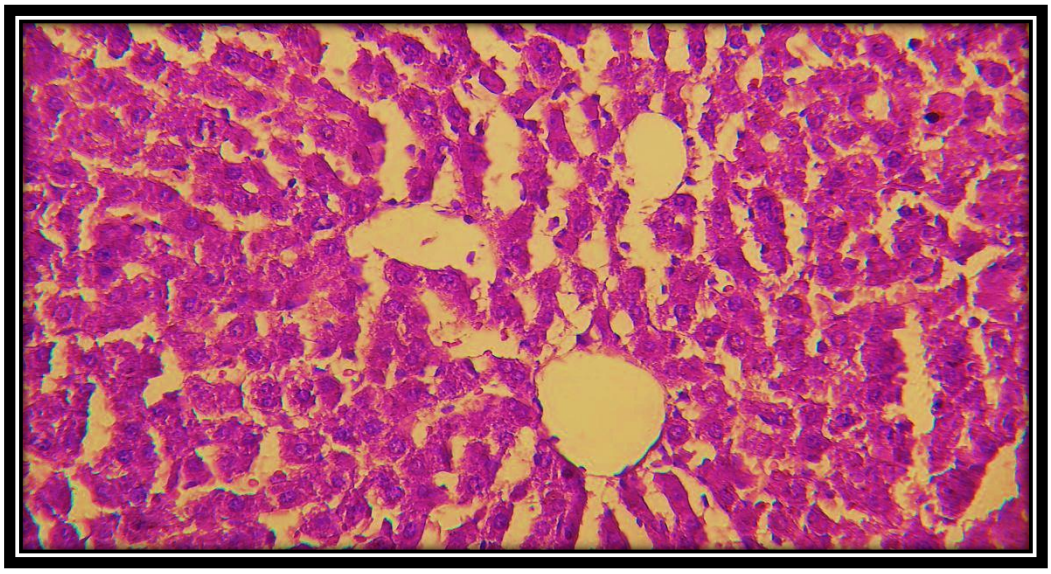
هذه الاختبارات بينت السلامة الغذائية عند استخدام هذه البكتريا في حفظ الأغذية خزنيا إذ تعتبر هذه البكتريا امنه غذائيا عند دخولها إلى الجسم إذ تعد من البكتريا غير المرضية.

ثانيا/ تأثير المستحضر الحيوي في المعايير النسيجية للحيوانات المختبرية

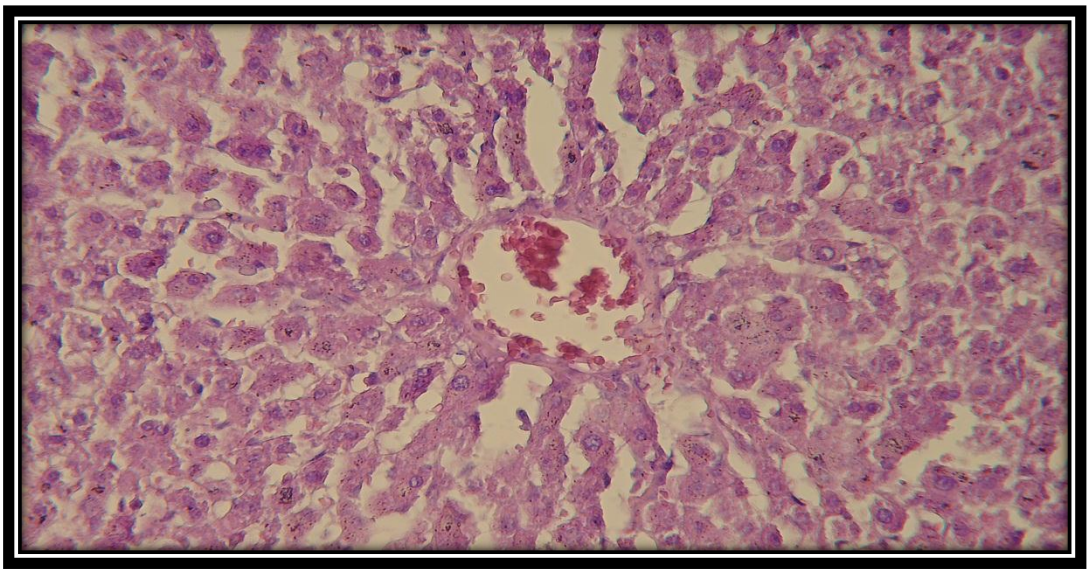
اظهرت نتائج الفحص والتشخيص ألمختبري للمقاطع النسيجية لأعضاء(الكبد والكلية والأمعاء الدقيقة)إلى عدم حدوث تغير نسيجي مرضي في تلك الأعضاء للحيوانات المعاملة.وهي تماثل تمأماالمقاطع النسيجية لمعاملة السيطرة التي أشارت إلى عدم وجود تغايرات مرضيه وهذه النتائج تتقارب مع دراسات سابقه على المستحضرات الحيوية لبكتريا .*Bacillus* spp والتي أثبتت سلامة تلك المستحضرات صحيا فمثلا دراسة اجرتها الأسدي(2013) على المستحضر الحيوي *B.subtilis* والمحمل على مادة كاربونات الكالسيوم اثبت سلامة المستحضر صحيا من خلال الاختبارات النسيجية التي أجريت على المقاطع النسيجية لذكور الجرذ الأبيض وكذلك دراسة أجرتها الجبوري(2011)أثبتت فيها ألسلامه الصحية للمستحضر الحيوي لبكتريا *B.subtilis* و*P.fluorescens* وبعد إجراء الفحوصات النسيجية لم تظهر أية مؤشرات مرضية أو خطورة على صحة الحيوانات المختبرة. حيث كانت المقاطع النسيجية ضمن الحدود الطبيعية للاعضاء المستهدفة .



شكل رقم (4-10) معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد أثر لالتهابات الخلايا الكبدية أو تفسخ ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين

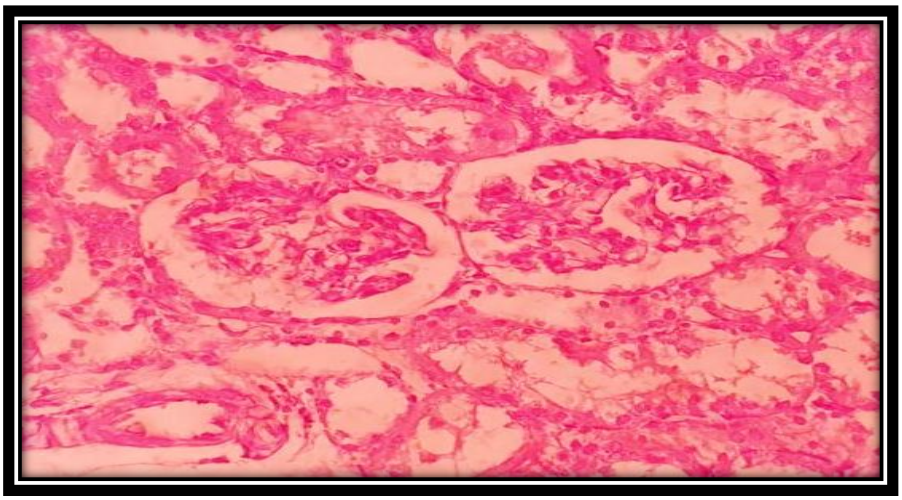


شكل رقم (4-11) معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد أثر لالتهابات الخلايا الكبدية أو تفسخ ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



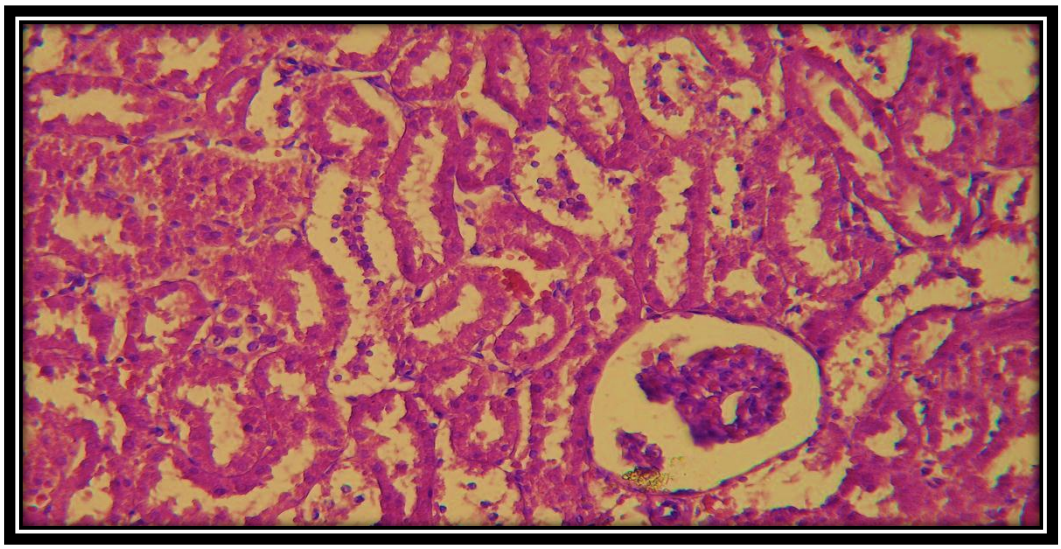
شكل رقم (4-12) معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي Nutrint broth للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد أثر لالتهابات الخلايا الكبدية أو تفسخ ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين

شكل رقم (4-13) معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم للجرذان المختبرية تبين الاحتفاظ بالشكل النسيجي الطبيعي لفصيصات الكبد والوريد الوسطي ولايوجد أثر لالتهابات الخلايا الكبدية أو تفسخ ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين

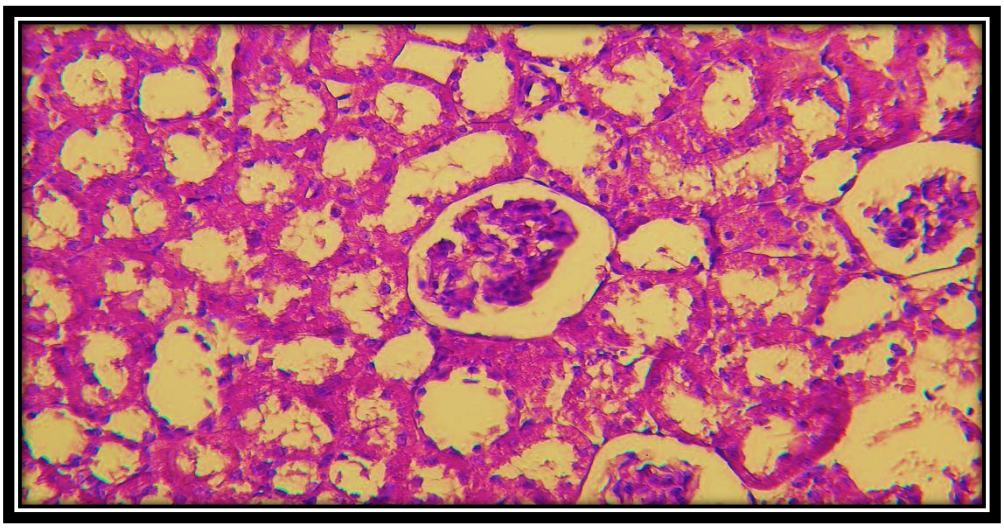


شكل رقم (4-14) معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وأنابيب الكلية وليس هناك أثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين

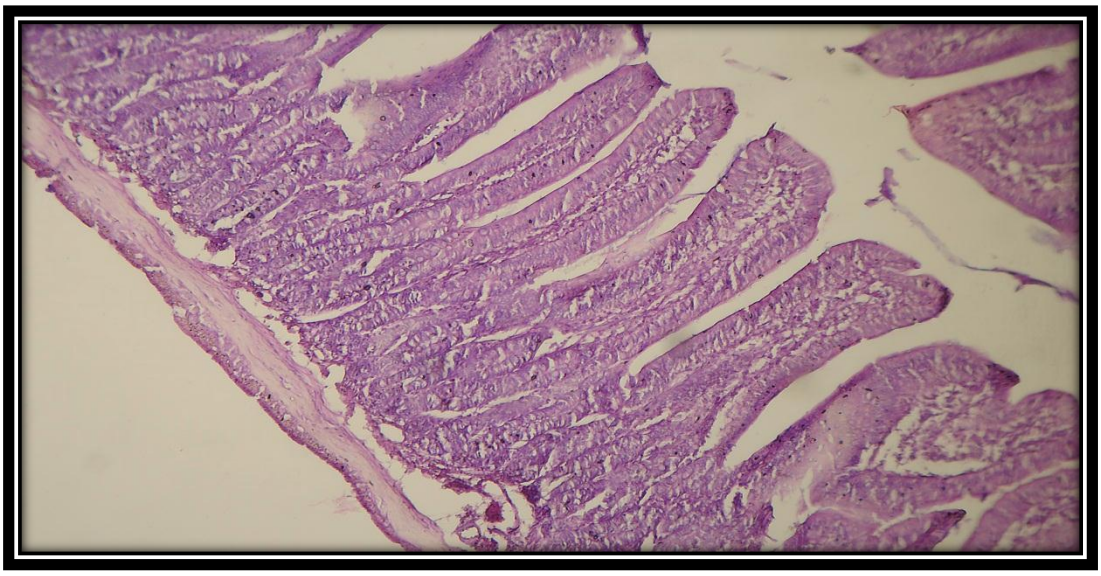
شكل رقم (4-15) معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وأنابيب الكلية وليس هناك أثر للالتهابات ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



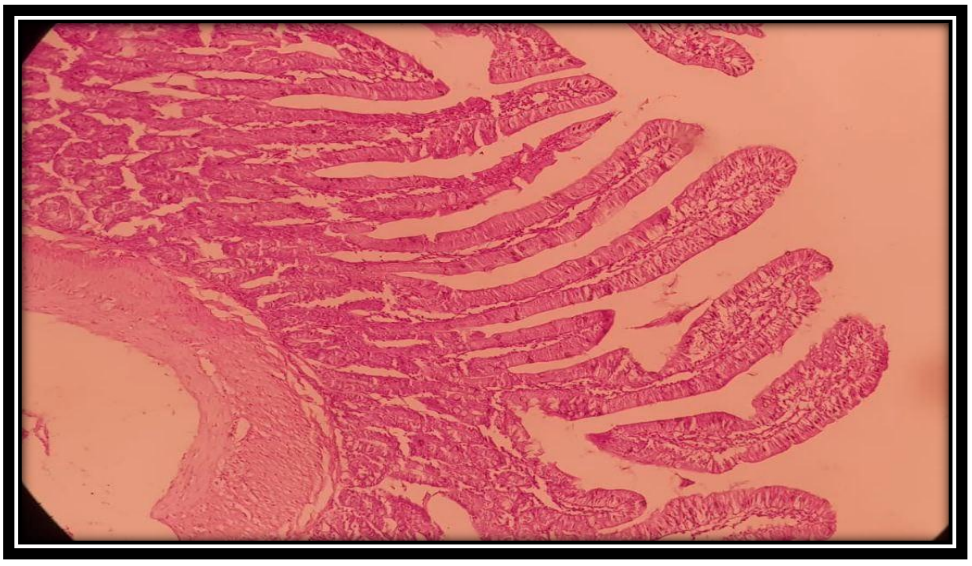
شكل رقم (4-16) معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وأنابيب الكلية وليس هناك أثر للالتهابات ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



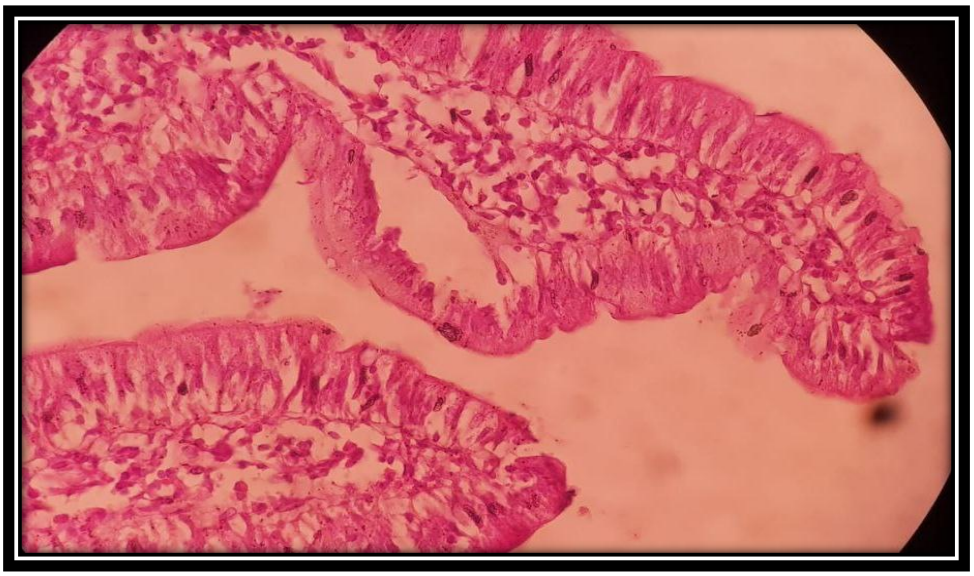
شكل رقم (4-17) معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للكلية من حيث الاحتفاظ بالشكل الطبيعي لكبيبات وأنابيب الكلية وليس هناك أثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



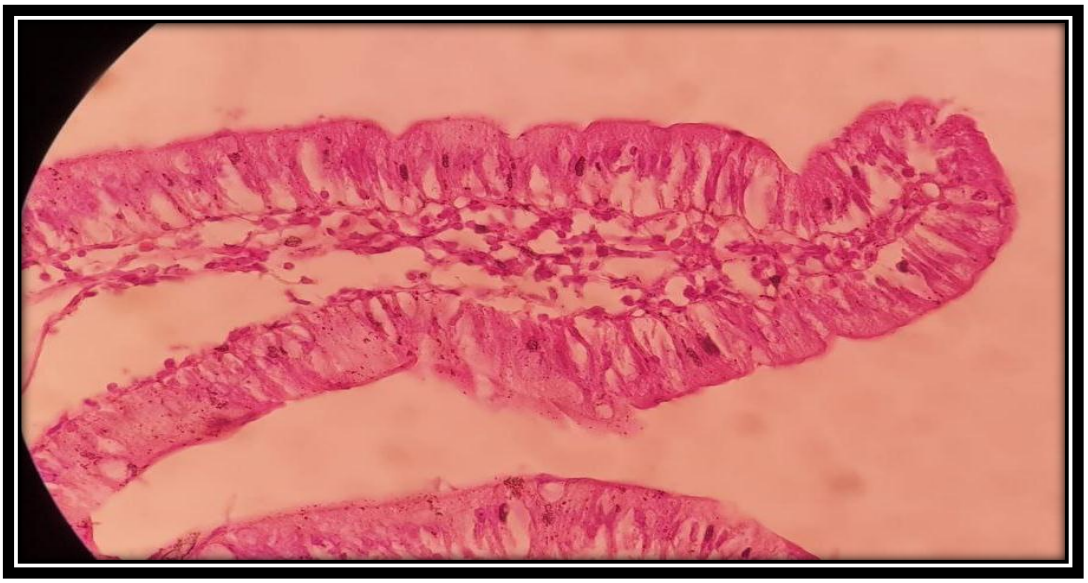
شكل رقم (4-18) معاملة السيطرة للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك أثر للالتهابات ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



شكل رقم (4-19) معاملة الوسط الغذائي Nutrint broth فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك أثر للالتهابات ولا أثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



شكل رقم (4-20) معاملة البكتريا المنماة في الوسط الغذائي فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك أثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين



شكل رقم (4-21) معاملة البكتريا المحملة على مادة كاربونات الكالسيوم فقط للجرذان المختبرية تبين الشكل الطبيعي للامعاء من حيث الشكل الطبيعي للزغابات المعوية بطول طبيعي وبدون ضمور ولاتوجد انسلاخات وليس هناك أثر للالتهابات ولا اثار لحالات مرضية /قوة التكبير 400 /الصبغة الهيماتوكسين مع الايوسين.

7.4.دراسة فعالية المستحضر الحيوي المصنع من لقاح البكتريا *Bacillus subtilis* B_1 في حماية بذور الحنطة من الاصابه والتلوث بسم الافلاتوكسين B_1

1.7.4.التجربة الخزنية

اجريت التجربة الخزنية للفترة من 2022/4/1ولغاية 2022/10/1 (ستة اشهر) وحفظت المعاملات في ظروف خزن طبيعية من حيث درجات الحرارة والرطوبة والضوء والتلوث الخارجي. حيث اخذت الفطريات قيد الدراسة جميعها وادخلت في المعاملات وكما هو مبين في الجدول رقم (4-6).

جدول رقم (4-6) يبين المعاملات في التجربة الخزنية

النوع الفطري	المعاملات	رمز المعاملة
Aspergillus flavus DB1	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**ADB1**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**ADB1+B1**
Talaromys colombinus DB3	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**TDB3**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**TDB3+B1**
Rhizopus microsporumDB1	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**RDB1**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**RDB1+B1**

بينت نتائج هذه الدراسة امتلاك الفطريات الضراوة العاليه تمثلت بأحداث نسب عالية من الاصابه في بذور الحنطة إذ وصلت إلى 100% على التوالي في حين كانت في معاملة السيطرة (بذور غير ملوثه باللقاح الفطري) 10% بعد مرور ستة اشهر من الخزن

أشارت العديد من الابحاث إلى قدرة أنواع الفطر *Aspergillus* spp. على إصابة الحبوب ومنها الحنطة فقد وجد سرحان(1995)أنواع تابعة لشبه جنس الفطر *Aspergillus* مرافقة لحبوب الحنطة والشعير والذرة الصفراء في سايلوات محافظة القادسية وإن نسب الإصابة تراوحت بين 34-95% ،وأشارت الحدراوي(2011) إلى إصابة بذور الحنطة المحلية بالفطر *A.flavus* وبنسبة تردد وظهور وصلت إلى 27.2 %و 71.4% على التوالي، ويرافق الإصابة إفراز انزيمات وسموم قاتلة للاجنه وهذا يؤدي إلى اختزال نسب الإنبات (ألجميلي 1996) . واظهر المستحضر الحيوي المصنع من البكتريا فعالية عالية في حماية بذور الحنطة من الإصابة بالفطريات. (الملوثة اصطناعيا) وتمثل باختزال نسب الإصابة 100% في البذور المعاملة في بالمستحضر الحيوي والملوثة باللقاح الفطريات كلا على حدة بعد مرور ستة أشهر من الخزن. كما إن المستحضر الحيوي وفر حماية تامة لبذور الحنطة المعاملة به من الإصابة الطبيعية في حين كانت نسبة الإصابة الطبيعية في بذور السيطرة (بذور غير معامله بالمستحضر ولم تلوث صناعيا) 10%، وتعود فعالية المستحضر الحيوي في اختزال نسب الإصابة في بذور الحنطة إلى امتلاك البكتريا *B.subtilis B1* لآليات عديدة تمكنها من تثبيط نمو الفطريات الممرضة ومن أهم هذه الآليات إنتاج المضادات الحياتية مثل mycobacillin و Bacillomycin و Fungistatin و subsporin وهذه المضادات تثبط من إنبات ونمو الابواغ الفطرية مما يؤدي إلى تقليل أو منع حدوث الإصابات الفطرية للحبوب ومنها الحنطة وخاصة في المخازن التي لا تتوفر فيها شروط الخزن الجيدة إذ إن الرطوبة النسبية ترتفع خلال فصول الخريف والشتاء والربيع عن مستوياتها في فصل الصيف وهذا يساعد البكتريا الموجودة على أسطح الحبوب بالنمو نتيجة حصولها على متطلباتها من الغذاء من نواضح الحبوب فتقوم بإنتاج المضادات الفطرية والإنزيمات المحللة والتي تقوم بتحليل العديد من المركبات البوليمريه المكونة للهايفات الفطرية كالمركبات البروتينيه والدهون والمركبات النشوية والكايتينيه ومنها إنزيم chitinase المحلل لمادة الكايتين والتي تعد المكون الأساسي لجدران خلايا معظم الفطريات الراقية ومنها الفطريات الناقصة وانزيم lecithinase الفعال في تحليل الدهون الفوسفاتية. كذلك لهذه البكتريا القدرة على إيقاف نشاط الفطريات الموجودة على أسطح الحبوب بفعل المضادات الفطرية التي تفرزها للبيئة ومن ابرز هذه المضادات Iturin ذو الفعالية العالية في كبح نمو ونشاط الفطر *A.parasiticus* وشل قدرته على إنتاج الافلاتوكسينات (العاشور 2009) كما تلعب إلية المنافسة على المكان والغذاء دورا مهما في كبح نشاط الفطريات الممرضة للحبوب فالبكتريا *B.subtilis* ذات قدرة عالية على منافسة الفطريات كونها أسرع نمو من بقية الكائنات الحية الأخرى والمتواجدة معها في نفس البيئة وبذلك تستحوذ على القدر الأكبر من الغذاء

والمكان على أسطح الحبوب (ألعميدي 2009) من جانب أخر تلعب مادة كاربونات الكالسيوم (المادة ألحاملة للقاح البكتريا *B.subtilis*) دور ايجابيي في زيادة فعالية المستحضر الحيوي في تثبيط نمو الفطريات وذلك من خلال قدرتها على خفض المحتوى الرطوبي للحبوب إلى المستوى الذي يمنع إنبات وتطور ابواغ الفطريات حيث تعمل هذه المادة على امتصاص الرطوبة من خلال اختلاف السعات الرطوبية بينها وبين الحبوب إذ إنها لا تتميأ بسهوله (الكبيسي 1989) .

و تتفق مع ماتوصل اليه Alzuhairi &Abbasi (2019) حيث اكدا الدورالفعال للقاح بكتريا *Bacillus* في المقاومة الحيوية وزيادة جاهزية عناصر التربة للنبات.

يرتبط انتاج السموم الفطرية بصورة عامة ومنها الافلاتوكسينات بعدة عوامل بيئية وكيميائية وحياتية فالعوامل البيئية تشمل درجه الحرارة والنشاط المائي والاس الهيدروجيني ومدة الحضانه أماالعوامل الكيميائيه فتشمل نوع المادة الاساس والعناصر الغذائية والمواد المضادة للفطريات في حين تشمل العوامل الحياتية السلاله وكمية اللقاح المستخدم والاحياء الدقيقه المنافسه. فإذا كانت هذه العوامل مناسبة لنمو الفطر المنتج للسموم فذلك يعني امكانية انتاجه للسموم تكون مؤكدة والعكس صحيح فأنتاج السموم يتطلب حدوث اصابة للمادة الغذائية من قبل الفطر المنتج واستعماره لهذه المادة الغذائية حيث تعمل معظم العوامل الحيويه المستخدمة في برنامج المكافحه الاحيائيه على تثبيط نمو الفطر المنتج للسم الفطري داخل المادة الغذائية دون قتله في أغلب الاحيان وبالتالي عند زراعة المادة الغذائية المصابة بالفطر السام (حبوب،بذور،مواد غذائية مصنعه)على وسط زرعي مثل P.D.A يظهر نمو للفطر وهذا يشير إلى اصابته للمادة الغذائية وبالتالي يبدو ان المادة الغذائية مصابة بالفطر ولكن عند الكشف عن السم بالمادة الغذائية المصابة تكون نتيجة الاختبار سالبة (عدم تلوث المادة بالسم الفطري) وهذا يعني ان الفطر يتواجد داخل المادة الغذائية ولكن بدون القدرة على استعمار المادة الغذائية (غزو اجزاء كبيرة من المادة الغذائية)أي ينحصر تواجده على منطقه صغيرة ومحدودة من المادة الغذائية (العميدي ,2009).

8.4.تقدير كمية السم B1 وكفاءة البكتريا *Bacillus subtilis* B1بمنع انتاج سموم الافلاتوكسين بعد مرور ستة اشهر من الخزن بتقنية HPLC

اظهرت نتائج الكشف عن وجود وتركيز سم الافلاتوكسين B1بجهاز HPLC في جميع معاملات التجربة الخزنية عن وجود فروق معنوية بنسبة تواجد سم الافلا AFB1 نتيجة استخدام بكتريا *B. subtilis* B1 في جميع المعاملات مقارنة مع معاملات السيطرة، كما هو مبين في الجدول رقم (4-7).

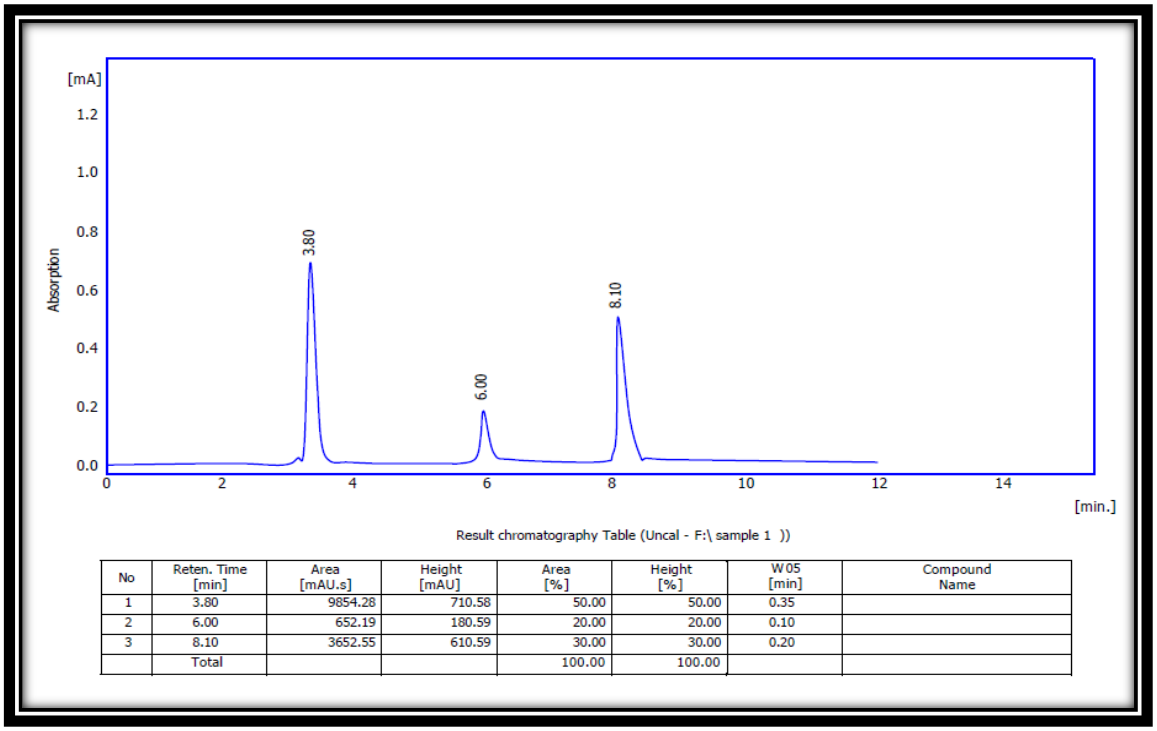
جدول رقم (4-7) يبين معاملات التجربة الخزنية ونسبة تركيز سم الافلاتوكسين B1 بعد مرور ستة أشهر من الخزن بتقنية HPLC

النوع الفطري	المعاملات	رمز المعاملة	كيز سم (ppb) Con AFB1
Aspergillus flavus DB1	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**	**0.98**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**FDB1**	**489.08**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**	**UDL**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**FDB1+B1**	**1.99**
Talaromys colombinusDB3	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**	**0.96**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**TDB1**	**401.22**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**	**UDL**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**TDB1+B1**	**UDL**
Rhizopus microsporumDB1	**الحبوب دون اي معاملة**	**Controle**	**0.98**
	حبوب ملوثه بالفطر فقط	**RDB1**	**395.19**
	حبوب ملوثة بالبكتريا فقط	**B1**	**UDL**
	حبوب ملوثة بالفطر+البكتريا	**RDB1+B1**	**UDL**

***UDL= تركيز السم PPb 0.25**

اظهرت نتائج التقدير الكمي بتقنية الكروماتوغرافيا السائل العالي الاداء HPLC ان عزلة الفطر *A. flavus* DB1 كانت منتجة لسم الافلاتوكسين B1 وبكمية489.08 ppm كما مبين في الشكل رقم (4-22) وهذا يتفق مع دراسات سابقة اكدت قدرة الفطر *Aspergillus*

spp. على انتاج سموم الافلا وبتراكيز عالية تصل إلى (PPM 740-18.6) على الرغم من معاملته بمعاملات تثبيطية فيزيائية أو كيميائية أو حيوية (الراوي،2017).



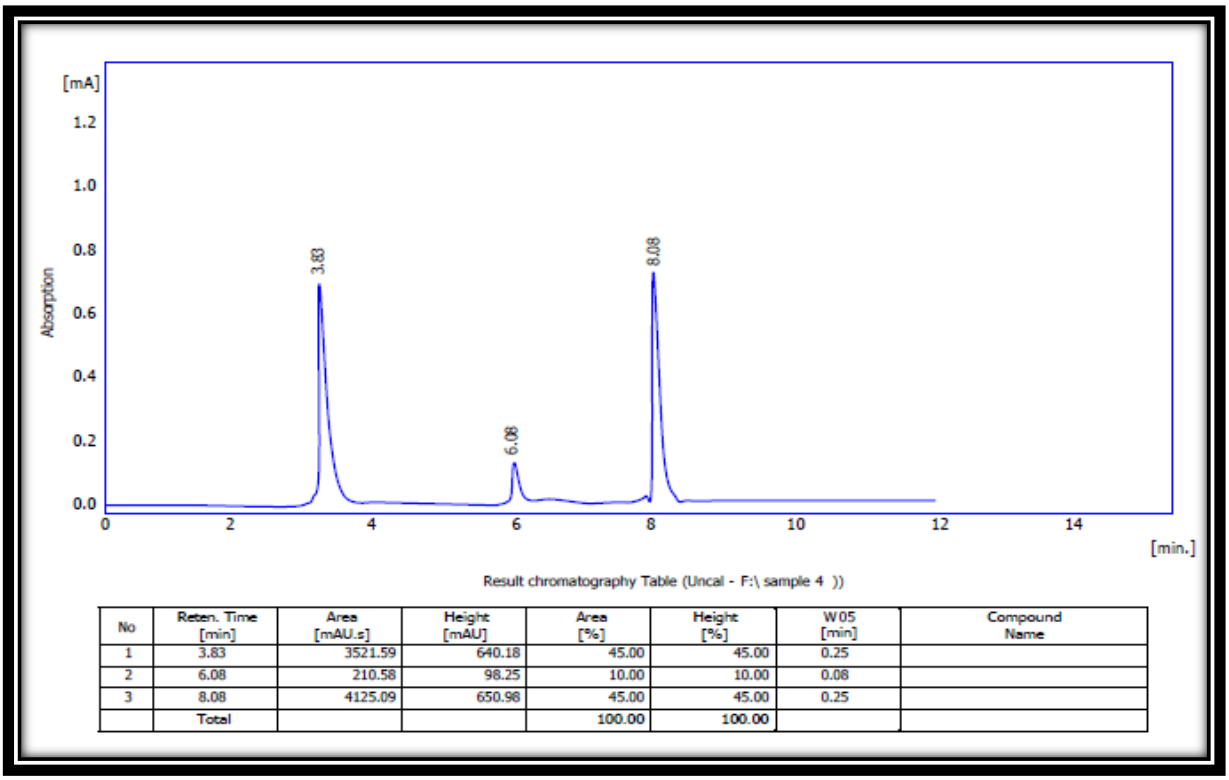
Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 1))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W 05 [min]	Compound Name
1	3.80	9854.28	710.58	50.00	50.00	0.35	
2	6.00	652.19	180.59	20.00	20.00	0.10	
3	8.10	3652.55	610.59	30.00	30.00	0.20	
	Total			100.00	100.00		

شكل رقم (4-22) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *A. flavus* DB1 فقط بواسطة HPLC

السبب يعود إلى القدرة العالية لفطر *Aspergillus spp* للنمو في بيئات مختلفة وبمديات حرارة و رطوبة متباينة ،فضلاً عن قدرته التثبيطية العالية لباقي الأنواع الفطرية والبكتيرية ومنافسته على الغذاء ،وسرعه انتشاره مقارنة بباقي لأنواع ،اضافة إلى القدرة العالية لانتاج تراكيز عالية من سموم الافلاتوكسين ،لما يمتلكه هذا النوع من مميزات مكنته من الانتشار الواسع المدى في مختلف الضروف والبيئات.

أما في الحبوب المعاملة بالفطر *A. flavus* DB1 والبكتريا *B.subtilis* B1 فقد كانت كمية السم المسجلة هي 1.99ppm ،هنا يتضح هناك تثبيط بنسبة 99% لنمو الفطر وإن هذه النسبة القليلة التي ظهرت هي نسبة ضعيفة جدا مقارنة بمعاملة السيطرة التي بلغت كمية السم فيها 0.98ppm (الحبوب الغير معاملة).يرجع السبب في ذلك كما ذكر مسبقا إلى كفاءة الفطر *Aspergillus spp.* بالنمو في ظروف مختلفة وقدرته على المقاومه العالية لما يفرزه من منتجات ايضية ثانوية تمكنه من المنافسة والانتشار.

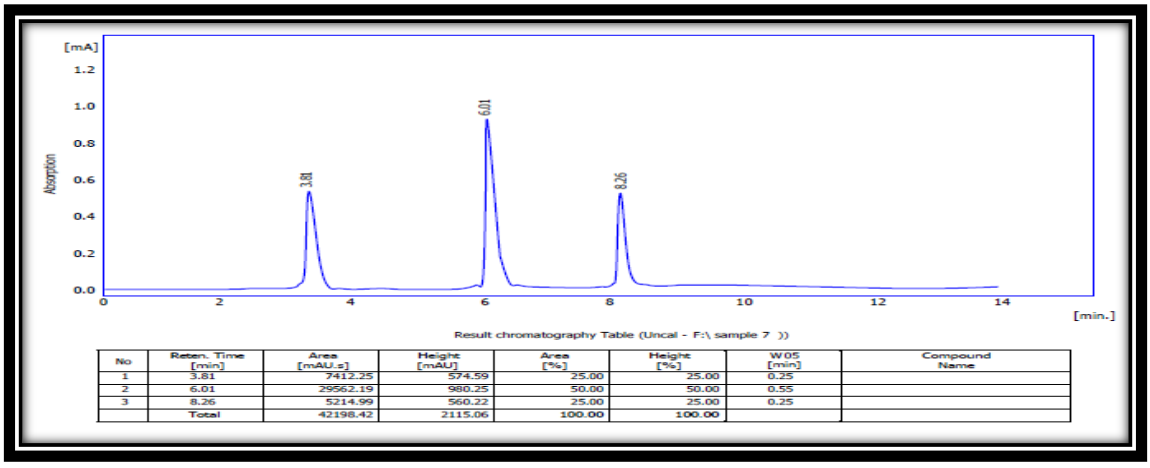


Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 4))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.83	3521.59	640.18	45.00	45.00	0.25	
2	6.08	210.58	98.25	10.00	10.00	0.08	
3	8.08	4125.09	650.98	45.00	45.00	0.25	
	Total			100.00	100.00		

شكل رقم (4-23) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 + *A.flavus* DB1 بواسطة HPLC

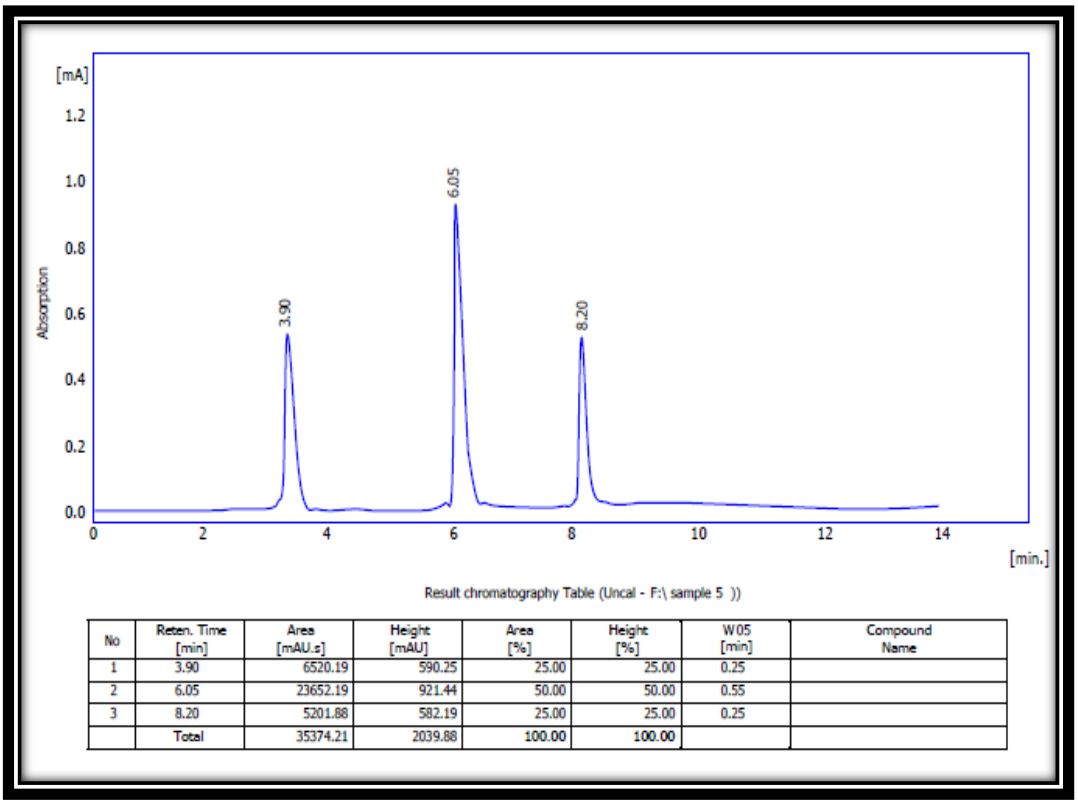
أما في المعاملات الملوثة بالفطر فقط لكل من *Talaromys colombinus* والفطر *Rhizopus microsporum* فقط بلغت السمية الفطرية 401.22)PPM , 395.19) على التوالي



Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 7))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.81	7412.25	574.59	25.00	25.00	0.25	
2	6.01	29562.19	980.25	50.00	50.00	0.55	
3	8.26	5214.99	560.22	25.00	25.00	0.25	
	Total	42198.42	2115.06	100.00	100.00		

شكل رقم (4-24)المخطط الكروماتوكرافي تركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *T.colombinus* DB1 فقط بواسطة HPLC

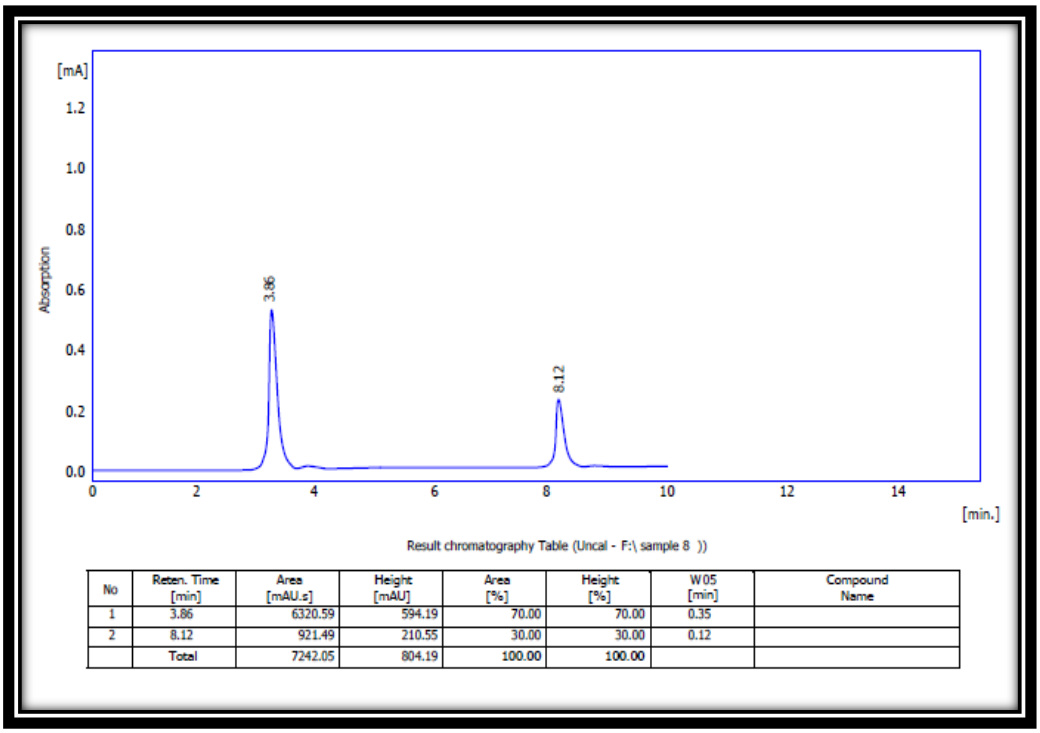


Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 5))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.90	6520.19	590.25	25.00	25.00	0.25	
2	6.05	23652.19	921.44	50.00	50.00	0.55	
3	8.20	5201.88	582.19	25.00	25.00	0.25	
	Total	35374.21	2039.88	100.00	100.00		

شكل رقم (4-25) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالفطر *R.microsporum* DB1 فقط بواسطة HPLC

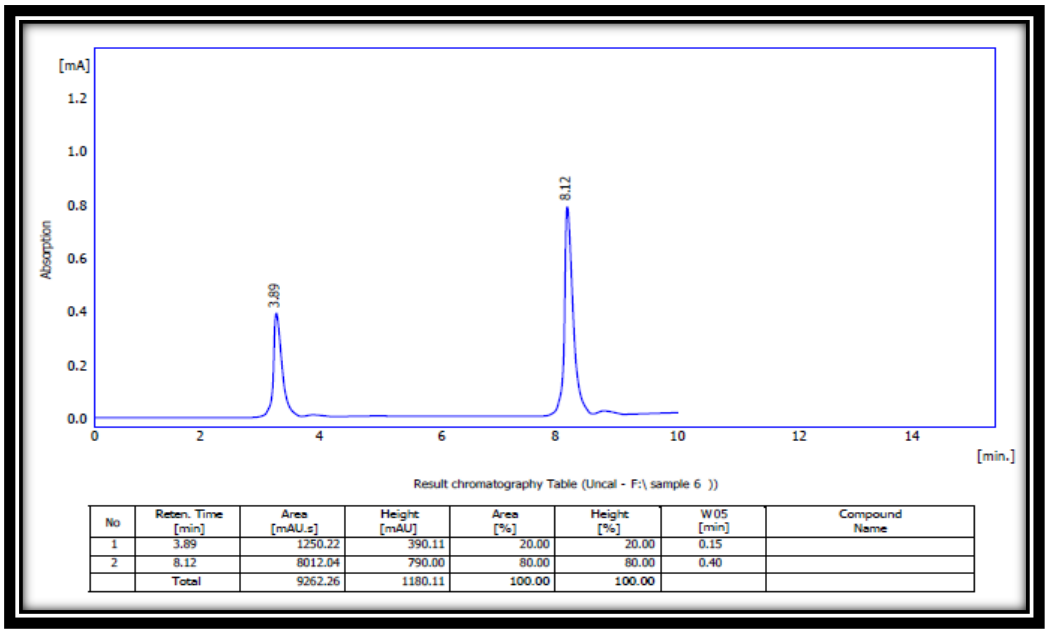
أماالمعاملات المعالجة بالبكتريا لكل من (*Talaromys* +*B. subtilis* B1 *colombinus* والفطر*Rhizopus microsporum* +subtilius B1.B) فقد بلغت كمية السم 0% أي عدم وجود السم في المعاملات نهائيا. هذا يدل على القدرة التثبيطية العالية لبكتريا *B. subtillus* B1 في منع نمو الفطرين اعلاه وتحطيم السم كاملا.



Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 8))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.86	6320.59	594.19	70.00	70.00	0.35	
2	8.12	921.49	210.55	30.00	30.00	0.12	
	Total	7242.05	804.19	100.00	100.00		

شكل رقم (4-26) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 + *T.colombinus* DB1 بواسطة HPLC

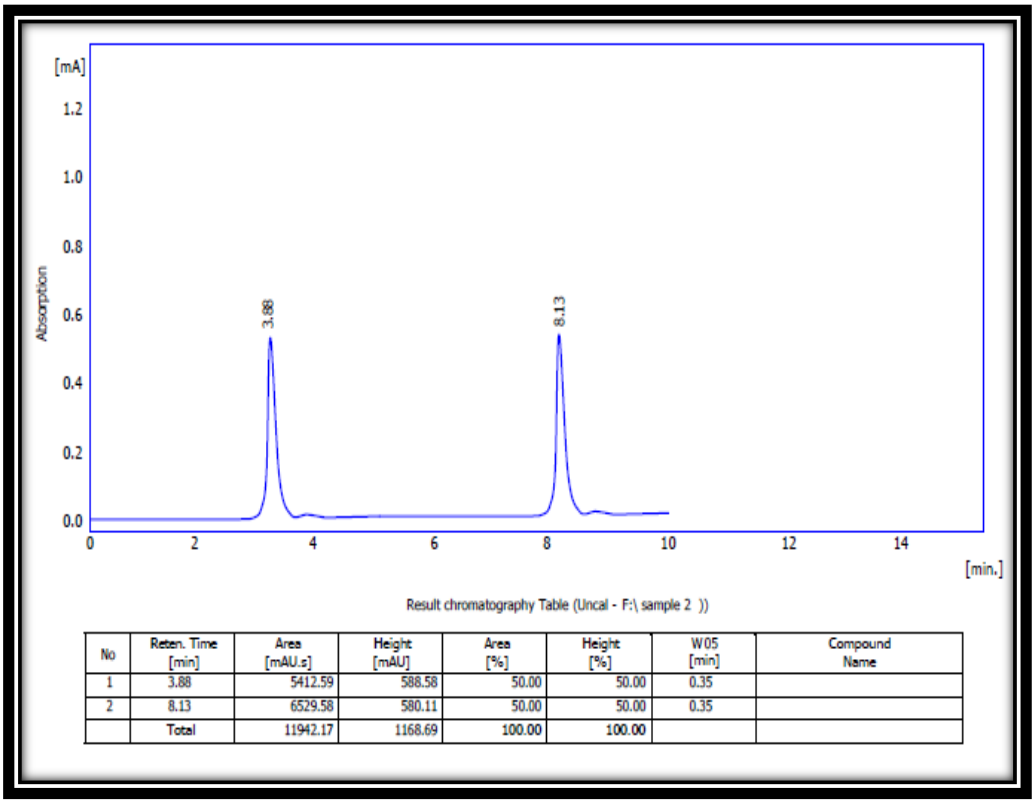


Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 6))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.89	1250.22	390.11	20.00	20.00	0.15	
2	8.12	8012.04	790.00	80.00	80.00	0.40	
	Total	9262.26	1180.11	100.00	100.00		

شكل رقم (4-27) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 + *R.microsporum* DB1 بواسطة HPLC

أمافي معاملة السيطرة للبكتريا فقط B.*subtillus* B1 فقد اعطت نتائج تثبيطة للنمو الفطري بنسبة 100% بسبب القدرة العالية للبكتريا بمنع وتثبيط نمو الفطريات بسبب القابلية الانزيمة العالية لها في التثبيط اضافة إلى القوة التنافسية في النمو والانتشار

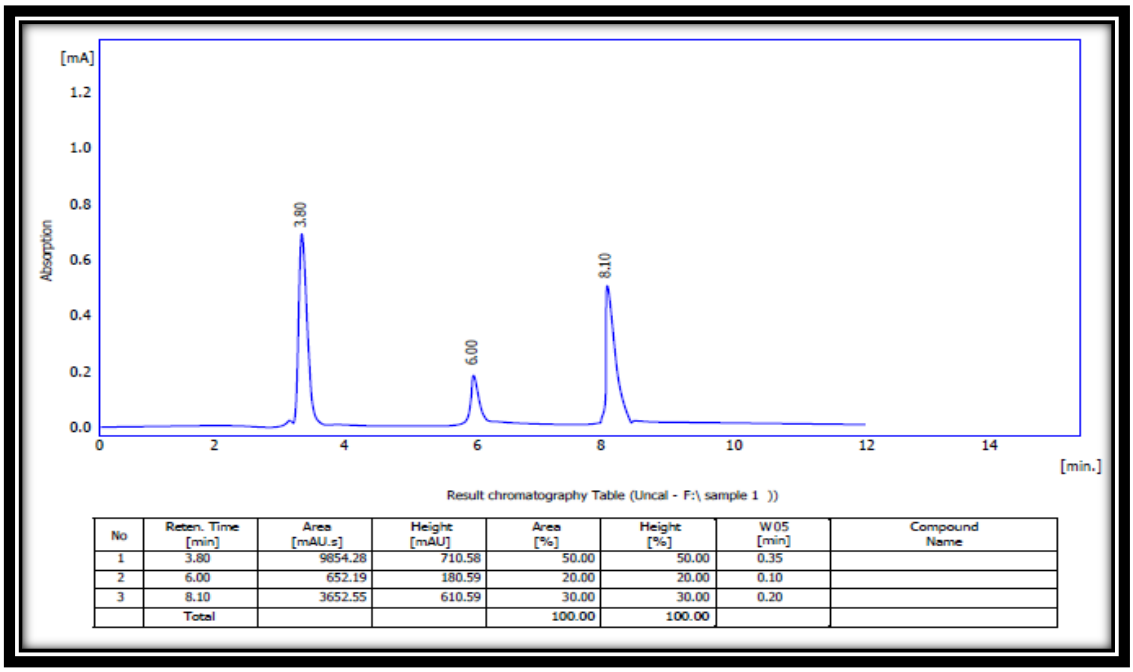


Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 2))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.88	5412.59	588.58	50.00	50.00	0.35	
2	8.13	6529.58	580.11	50.00	50.00	0.35	
	Total	11942.17	1168.69	100.00	100.00		

شكل رقم (4-28) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب المعاملة بالبكتريا *B.subtilis* B1 فقط بواسطة HPLC

أمامعاملة السيطرة في الحبوب الغير معاملة (حبوب السايلو فقط) فقد بينت النتائج بعد مرور ستة اشهر تلوثها بالسم الفطري وبنسبة 0.98 PPM هذا يدل على وجود التلوث الفطري وامكانية التلوث بالفطريات وانتقالها للمستهلك.

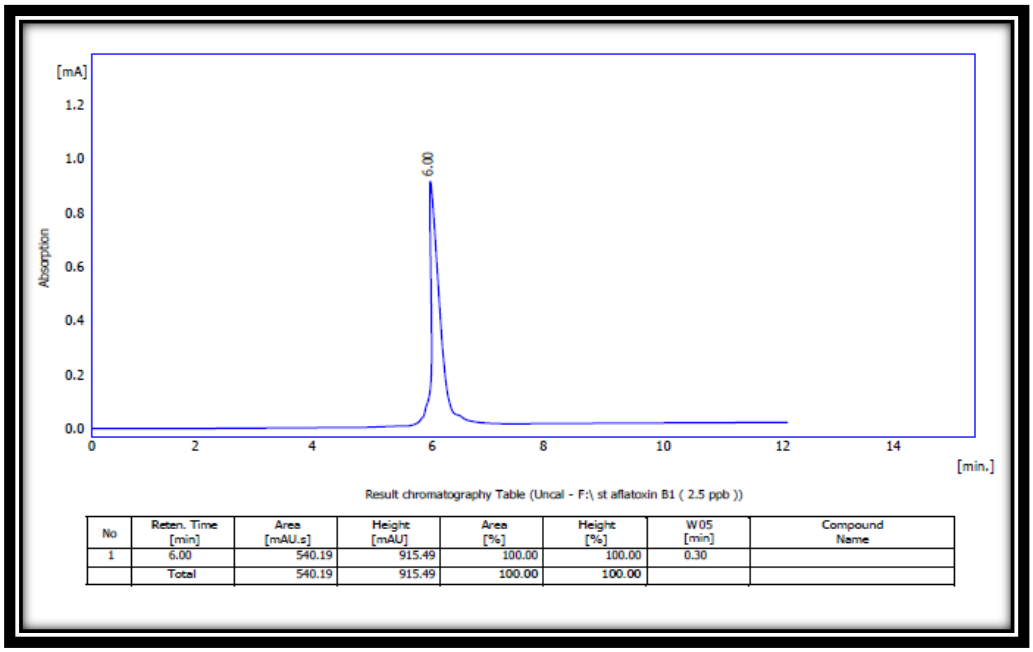


Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample 1))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	3.80	9854.28	710.58	50.00	50.00	0.35	
2	6.00	652.19	180.59	20.00	20.00	0.10	
3	8.10	3652.55	610.59	30.00	30.00	0.20	
	Total			100.00	100.00		

شكل رقم (4-29) المخطط الكروماتوكرافي لتركيز سم الافلاتوكسين B1 في الحبوب الغير معاملة (معاملات السيطرة) بواسطة HPLC

أماالشكل رقم (4-30) يوضح تركيز السم القياسي لسم الافلاتوكسين المحقون أولا في جهاز HPLCوالمعتمد عليه في قراءة تراكيز المعاملات كما هو واضح عند تركيز 2.5 ppb



Result chromatography Table (Uncal - F:\ st aflatoxin B1 (2.5 ppb))

No	Reten. Time [min]	Area [mAU.s]	Height [mAU]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Compound Name
1	6.00	540.19	915.49	100.00	100.00	0.30	
	Total	540.19	915.49	100.00	100.00		

شكل رقم (4-30) المخطط الكروماتوكرافي للستاندر القياسي لسم الافلا B1 عند تركيز 2.5PPb بواسطة HPLC

9.4. تنقية أنزيم التانيز

تتضمن الخطوة الأولى من خطوات تنقية الإنزيم من مصدره لاي من خلايا البكتريا *B. subtilis* B1 الذي تفرزه خارج الخلايا في وسط النمو هي أخضاع الإنزيم الخام لراشح العزلة البكتيرية للترسيب بكبريتات الامونيوم مع التبريد لمنع مسخ البروتين وبنسبة إشباع 75 % وتظهر النتائج ارتفاع في الفعالية النوعية للإنزيم بلغت 5.8 وحدة / ملغم بالمقارنة مع الإنزيم الخام وبحصيلة إنزيمية 81 % وعدد مرات تنقية 1.5 مرة. ويمكن ان تفسر الزيادة في الفعالية النوعية إلى اختزال في ذوبانية إنزيم التانيز ومن ثم ترسبه والتي جاءت نتيجة التراكيز الملحية العالية لكبريتات الأمونيوم التي عمدت إلى جذب جزيئات الماء القطبية حولها تاركة جزيئات الإنزيم لتتجمع وتترسب. يحدث الترسيب بسبب العرقلة التي تحدثها الأيونات الملحية وطبقة جزيئات الماء المحيطة بالبروتين أي خفظ درجة الذوبان وتبدأ عملية الترسيب عند ظهور عكارة للإنزيم.

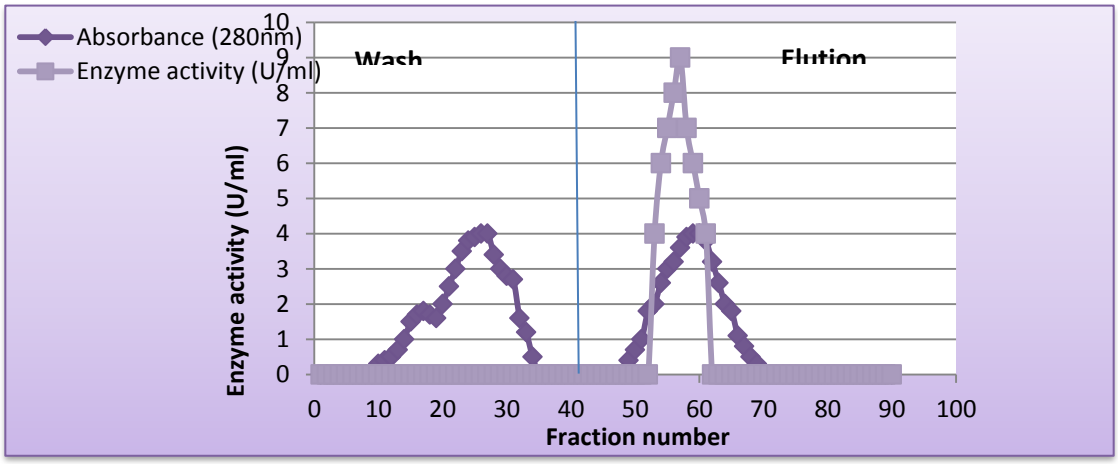
الخطوة الثانية من سلسلة خطوات التنقية المتعاقبة هي خطوة الديلزة التي اجريت للراشح الإنزيمي الخام باستعمال أكياس الديلزة والمحلول المنظم (خلات الصوديوم) ذي الاس الهيدروجيني 5.5 ولمدة 24 ساعة. تضمنت هذه الخطوة ازالة الاملاح عن البروتينات بعد عملية الترسيب بهذه الاملاح، مبدا العمل هو Osmosis حيث تنتقل جزيئات وايونات الملح من التركيز الأعلى إلى التركيز الادنى عبر طرفي غشاء نصف نفإذ. تم في هذه الخطوة تنقية جزئية للإنزيم إذ وصل عدد مرات التنقية 2.6 مرات وبحصيلة إنزيمية 53.3 % والتي أمكن خلالها التخلص من البروتينات ذات الأوزان الجزيئية الواطئة وخفض القوة الايونية للمستخلص الخام.

بتوفر المحلول المنظم (خلات الصوديوم) ذي الاس الهيدروجيني 5.5 اجريت خطوة التبادل الأيوني للمستخلص الإنزيمي المستحصل عليه من الخطوة السابقة وباستخدام المبادل الأيوني DEAE-Cellulose والذي يعتمد على اختلاف الشحنات كأساس لعملية الفصل الكروماتوكرافي. اسفرت عملية التنقية فيها بظهور قمة بروتينية واحدة في مرحلة الغسل Wash تركزت في الأجزاء المفصولة كما موضح في الشكل (4-31) كما ظهرت قمة واحدة في خطوة الإسترداد الذي تم باستخدام المحلول المنظم ذاته وبوجود تدرج ملحي (0-3) مولر لكلوريد الصوديوم، عند قياس الفعالية النوعية لإنزيم التانيز في القمة الواقعة في الاجزاء المستردة تبين حصول زيادة فيها بلغ27 وحدة / ملغم وارتفعت عدد مرات التنقية حتى بلغت 7.2 مرة وبحصيلة إنزيمية مقدارها 53.3 %. وحسب البيانات المتاحة في الجدول (4-8) جاءت التنقية إلى حد

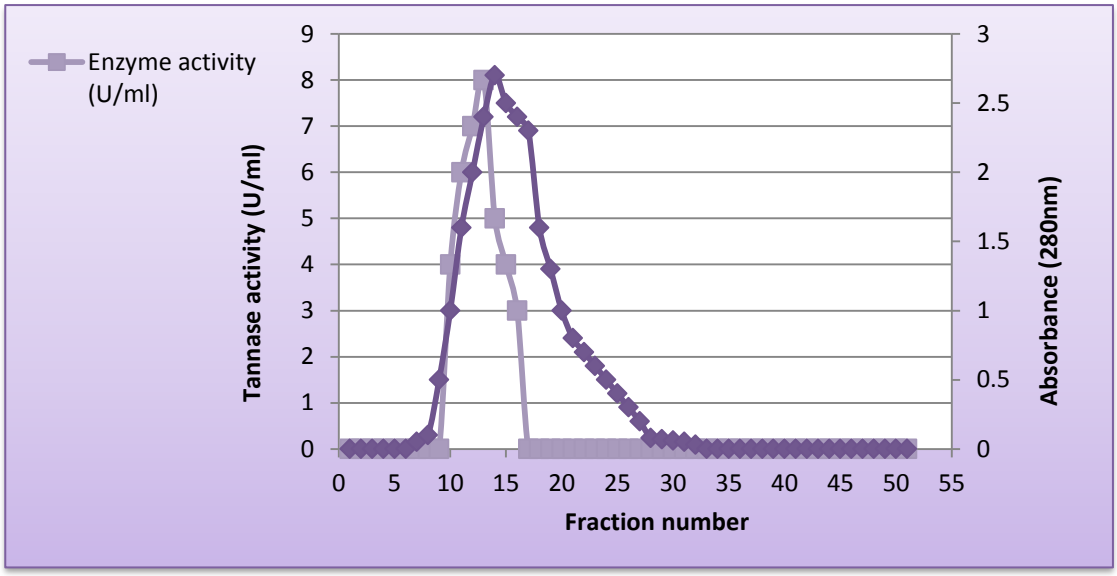
التجانس في الخطوة الأخيرة والتي جرت باستعمال كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي والتي جرى فيها تعبئة العمود بالهلام (Sephadex G-150). ويتضح من الشكل (4-32) ظهور قمة بروتينية لإنزيم التانيز ظهرت في الاجزاء المستردة المفصولة من العمود على اساس الحجم الجزيئي والتي بلغت الفعالية النوعية للإنزيم اقصاها عند الجزء 14 إذ بلغت 95 وحدة / ملغم بحصيلة إنزيمية 44.3 % ووصل عدد مرات تنقية الإنزيم إلى 25.33 مرة.

الجدول (4-8)خطوات تنقية إنزيم التانيز من المستخلص الإنزيمي الخام للعزلة البكتيرية

خطوة التنقية	الحجم (مل)	الفعالية الإنزيمية (وحدة / مل)	البروتين (ملغم/ مل)	الفعالية الكلية (وحدة)	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم)	عدد مرات التنقية	الحصيلة الإنزيمية %
الإنزيم الخام	100	3	0.8	300	3	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم 75 %	70	3.5	0.6	245	5.8	1.5	81.6
الديلزة	40	4	0.4	160	10	2.6	53.3
المبادل الأيوني DEAE-Cellulose	32	5	0.18	160	27	7.2	53.3
الترشيح الهلامي Cephdex G-150	14	9.5	0.1	133	95	25.33	44.3



شكل (4-31)تنقية الإنزيم التانيز بإستخدام المبادل الأيوني DEAE Cellulose في عمود ابعاده 20× 2.5سم اجريت الموازنة والإسترداد بالمحلول الدارئ خلات الصوديوم بتركيز 10 ملي مولر بسرعة جريان 30مل /ساعة وبمعدل 3 مل /جزء



شكل (4-32) تنقية إنزيم التانيز بإستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي في عمود Sephadex G-150 في عمود ذو الأبعاد 1.5×40 سم، جرت الموازنة والإسترداد بالمحلول الدارئ خلات الصوديوم بتركيز 10 ملي مولر بسرعة جريان 30 مل /ساعة وبمعدل 3 مل /جزء

لا بد من الاشارة إلى أن تركيز إنزيم التانيز بواسطة كبريتات الأمونيوم تعد الطريقة الأكثر شيوعا لإنها تمتلك قابلية ذوبان سريعة وبالتالي تركد البروتينات بالإعتماد على تركيز ونوعية الأملاح المستخدمة في خطوة تركيز الإنزيم الخام، يعود سبب ركود البروتينات إلى تعادل شحناتها بشحنات كبريتات الأمونيوم يؤدي ذلك إلى تجمع البروتينات وانفصالها في ظاهرة خاصة يطلق عليها التمليح الخارجي.

في دراسة أخرى اجراها (Hafiz *et al* ,2022) اكدت على امكانية استخدام أوراق الذرة لانتاج انزيم التانيز بأقل التكاليف الاقتصادية. حيث تم عزل الانزيم من بكتريا *Bacillus subtilus* باعتبار لها القدرة العالية على انتاج الانزيم مقارنة مع باقي الأنواع ضمن الدراسة.

1.9.4.إختبار السمية الخلوية لإنزيم الـTannase

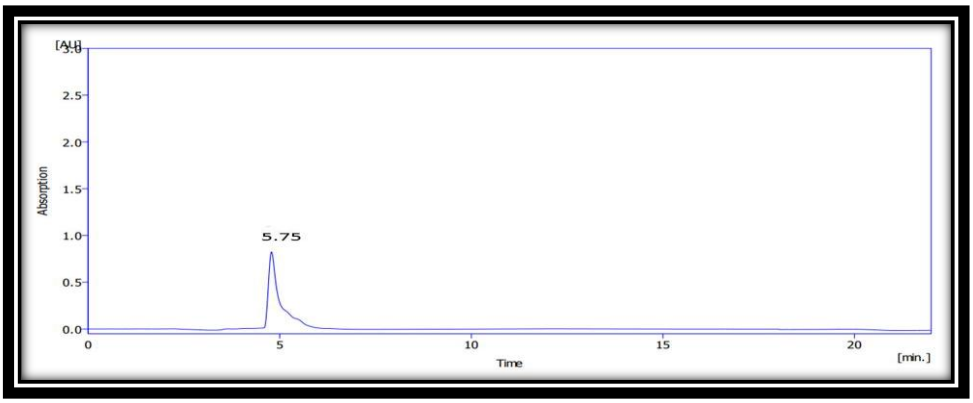
لم تظهر التراكيز المستخدمة 25 , 50, 75, 100 مايكروغرام/مل من إنزيم التانيز المنقى ومعاملة السيطرة (Phosphate buffer saline) اية قدرة على تحلل كريات الدم الحمراء.

كما اكدت الورقة البحثية المنشورة من قبل (Govindarajan *et al* ,2021) عند اختبار السمية الخلوية لإنزيم التانيز المنقى من العزلة البكتيرية *Bacillus subtilis* KMS2-2على خط الخلايا الطبيعية Vero cells فضلاً عن اختبار السمية الخلوية داخل جسم الجرذان وبتراكيز مختلفة، إن الإنزيم لم يبدي أي تأثير سمي على الخلايا المذكورة آنفاً وبجميع التراكيز المدروسة، إذ بلغت النسبة المئوية لحيوية الخلايا المختبرة 97 %عند أعلى تركيز من إنزيم التانيز128مايكروغرام /مل، وقد افاد التقرير المزود من قبل الباحث بان إنزيم التانيز اعتبر و لأول مرة أمنا GRAS (Generally Regarded as Safe) واعتمادا على النتائج امكن استغلاله في صناعة الأدوية والأغذية.

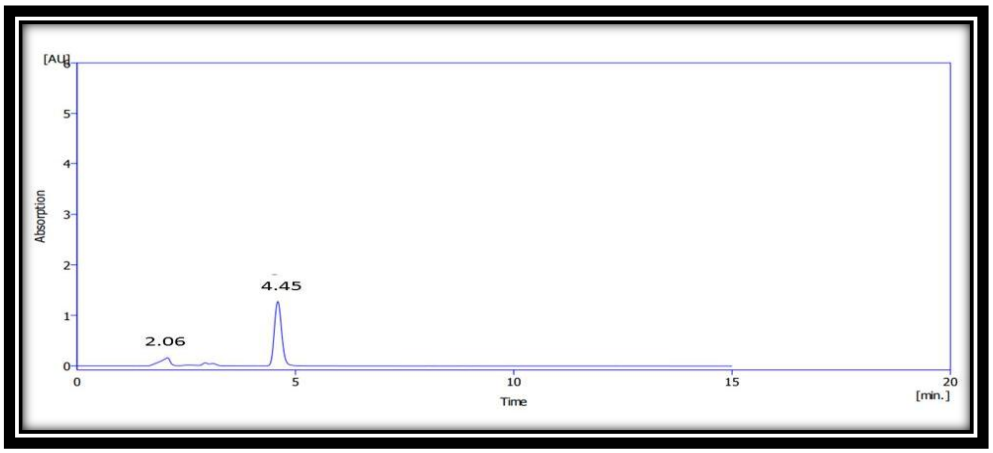
2.9.4.إختزال سم الافلاتوكسين Aflatoxin B1

كُرست الكثير من الأبحاث والجهود لإزالة أو إختزال سمية الافلاتوكسين، وبما أن الإنزيمات المستخلصة من الفطريات والبكتريا لها تطبيقات واسعة وتلعب دورا أيجابيا في تحليل الملوثات ذات العلاقة بالجوانب الأنسانية، جاء التطبيق الأكثر توسعا أستخدامها في إختزال السم الأكثر تلوثا للمنتجات الزراعية والأغذية والذي يستعمر الحبوب بانواعها المختلفة وهو سم الافلاتوكسين من النوع B1. وفي غمرة الحماس تم معالجة الافلاتوكسين بأنزيم التانيز المستخلص والمنقى من العزلة البكتيرية لمدة 72 ساعة كل على حده وعلى حد سواء. وفي نتيجة غير مألوفة أظهرت بالتحليل بكروماتوكرافيا السائل عالي الأداء وتحت الظروف المخصصة للكشف عن سم الافلاتوكسين جاء رد الفعل عند معاملة سم الأفلاتوكسين بالإنزيم الخام بأختزال سم الافلاتوكسين إذ قل تركيزه إلى 1.5 نانوغرام / مل. كما عمل على تحلل الافلاتوكسين إلى مركبين بدلالة ظهور قمتين عند زمن احتجاز 2.06 دقيقة و4.45 دقيقة وبنسبة مساحة متبقية 13.8 و86.6 % على الترتيب مقارنة مع الافلاتوكسين القياسي بقمة واحدة عند زمن احتجاز5.75 دقيقة. كما مبين بالشكل (4-34)

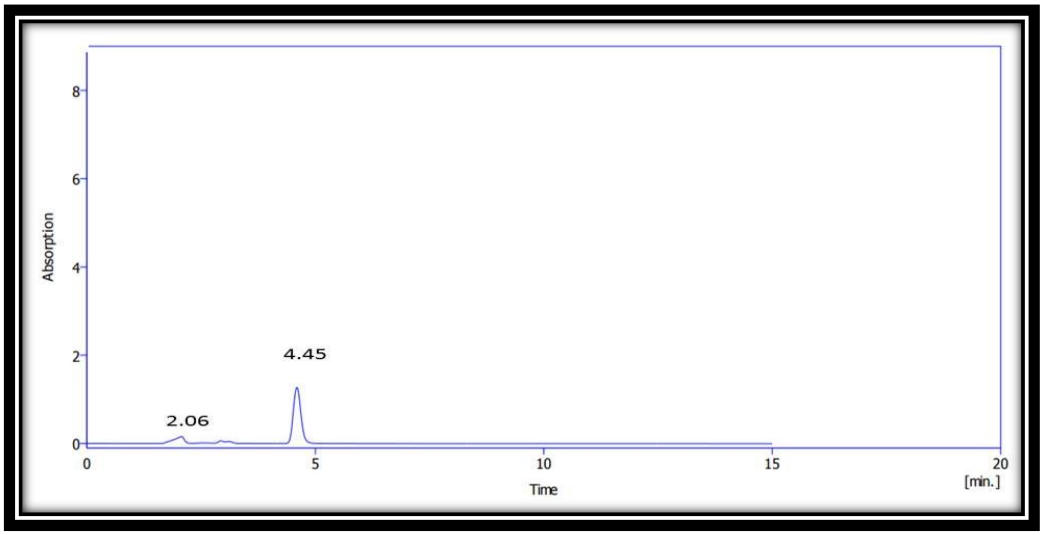
واستطاع الإنزيم المنقى بفاعلية عالية وأداء عالِ إختزال سم الافلاتوكسين حتى انخفض تركيزة إلى 1.3 نانوغرام / مل عند نفس أزمان الأحتجاز للإنزيم المنقى مع الأختلاف في المساحة المتبقية 2.06 و 4.45 % على الترتيب كما تمكن من تجزئة السم إلى مركبين جديدين. كما مبين بالشكل (4-35)



شكل (4-33) المخطط الكروماتوكرافي عينات السيطرة لسم الافلاتوكسين



شكل (4-34) المخطط الكروماتوكرافي للانزيم المنقى من عزلة البكتريا



شكل (4-35) المخطط الكروماتوكرافي للانزيم الخام المعزول من البكتريا

من النتائج المتوخاة اعلاه يتضح إن الإنزيم الخام فاق الإنزيم المنقى تأثيرا ومن المعتقد إن فاعلية الإنزيم الخام ترجع إلى احتوائهِ على بروتينات أخرى وبعض الشوائب التي تعمل تازريا مع الإنزيم لإختزال سمية الأفلاتوكسين وتقليل تركيزه. ومن الناحية الواقعية عمل كلا منهما (الخام والمنقى) على شطر الافلاتوكسين إلى مركبين هما Aflatoxin epoxide و Dihydrodiol ولاحقا تحطيم مركب Difuran الحلقي التركيب بشطر الآصرة المزدوجة وبهذا يتحول إلى مركب أقل سمية، كما قد يعزى السبب إلى تولد جذور حرة التي تتفاعل مع بعضها وبالتالي تعمل على تحطم سم الأفلاتوكسين وتكوين مركبات بوليمرية ثنائية عديمة السمية (Alberts, 2006). وبهذا تظهر الإنزيمات البكتيرية وعلى وجه الخصوص انزيم التانيز كأحد الحلول المثالية للتخلص من سمية الأفلاتوكسين.

اثبت Muslaim وأخرون (2015) فعالية إنزيم التانيز المنقى من عزلة البكتريا *Citrobacter freundii* في إختزال سمية zearalenone المنتج من عزلة الفطر *F. graminearum* بتراكيز مختلفة تراوحت بين (200 – 700) مايكروغرام / مل، إذ تمكن الإنزيم من إختزال السمية حتى التركيز 500 مايكروغرام / مل بينما لم يكن لمعاملة السم بإنزيم التانيز اي قابلية على إختزال السم بالتراكيز الأعلى.

كما اشار Thiyonila وأخرون (2022) إلى القدرة الفائقة لإنزيم التانيز المنقى من عزلة البكتريا *Serratia marcescens* IMBL5 لتحسين الفعالية المضادة للأكسدة لعصير التفاح المعامل بالإنزيم، إذ بلغت اقصاها 74.16 % عند الفعالية الإنزيمية 103.13 وحدة/مل مقارنة بالـAscorbic acid 83.67%، بينما بلغت النسبة المئوية للفعالية المضادة للأكسدة لعصير التفاح التجاري غير المعامل بإنزيم التانيز 66.08%.

وفي دراسة صديقة للبيئة في الورقة البحثية المنشورة من قبل (jay *et al* ;2022) حيث اكدت الدراسة على القدرة العالية لبكتريا *Bacillus* PGF2 على التحلل الميكروبي في انتاج مختلف الصناعات والمواد الكيميائية بسبب الكفاءة التحفيزية العالية والفعالية والطبيعة الصديقة للبيئة حيث لها القدرة على تحويل حامض التانيك إلى جلكوز وحامض الجاليك عن طريق تحفيز التحلل المائي لروابط الاستر .وفي دراسة مقاربة لانتاج انزيم التانيز من بكتريا *Bacillus subtillus* KMS2.2 اذ استخدم الانزيم كمحفزات في انتاج حامض التاليك في معالجة المشروبات والاغذية (Rasiravathana *et al* ;2021) .

اجرى العالم Sunnyوأخرون (2022) بحثا لتقليل اثر مخلفات الفواكه والتخلص منها احيائيا باستخدام بكتريا *Bacillus haynesii* SSRY4 من خلال ترسيب انزيم التانيز. حيث اشارت نتائج االتطبيق العملي إلى ان التانيز البكتيري يمكن ان يوفر مصدرا جديدا لتخليق حامض الجاليك من نفايات الفاكهه للتطبيقات الصناعية.

الأستنتاجات

1. طرائق وأساليب خزن الحبوب لم تكن ضمن الشروط الواجب توفرها للخزن لذلك اظهرت نتائج العزل تلوث هذه الحبوب بالفطريات المختلفة وسمومها الفطرية
2. تشخيص العزلات الفطرية الاكثر انتاجية لسم الافلاتوكسين B1 جزيئيا باستعمال تقنية PCR اكدت تطابق العزلات مع العزلات العالمية في البنك الجيني للمعلومات
3. امتلاك التربة المحلية عزلات بكتيرية كفؤة في المكافحة الاحيائية
4. لأنزيم التانييز تأثير قوي جدا في تثبيط النمو الفطري وتحطيم سموم الافلاتوكسين B1
5. انتشار وسيادة فطريات *Aspergillus* spp بنسبة 99% في جميع أنواع الحبوب المحلية
6. للمستحضر الحيوي البكتيري دور فعال في منع نمو الفطريات وانتاج السموم للحبوب المعاملة بالمستحضر البكتيري
7. عدم وجود اي تأثيرات مضرة صحيا عند استخدام المستحضر الحيوي في السلامة الحيوية

التوصيات

1. معاملة الحبوب المخزونة في المخازن التجارية بالمستحضر الحيوي البكتيري لمنع تلوثها واصابتها بالفطريات اي يستخدم كمادة حافظة
2. دراسة تأثير المستحضر الحيوي البكتيري على انواع فطرية مرضية أخرى
3. اجراء دراسة باستخدام انزيم التانييز المنقى مباشرة لمعرفة قدرته التثبيطية في تثبيط أنواع فطرية مرضية أخرى
4. دراسة الانزيمات البكتيرية منفصلة لمعرفة أدوارها الفعالة كلا على جانب
5. اجراء دراسة in vivo لأنزيم التانييز لمعرفة تأثيراته على الحيوانات المختبرية
6. استخدام المستحضر الحيوي بدراسات تطبيقية حقلية كمعاملة الحبوب قبل زراعتها أو رش المحاصيل الحقلية بالمستحضر الحيوي لمعرفة كفاءته التثبيطية

المصادر العربية و الاجنبية

- إبراهيم ، إسماعيل خليل و كركز محمد ثلج الجبوري. (1998).السموم الفطرية.الطبعة الثانية.مركز إباء للأبحاث الزراعية.
- أبو عرقوب ،محمود موسى .(2000).المقاومة الحيوية لأمراض النبات .المكتبة الاكاديمية صفحة 684.
- الاسدي، دعاء فايق على والجميلي، سامي عبد الرضا (2013). دراسة امكانية توظيف بكتريا *Bacillus spp.* في السيطرة على اصابة بذور بعض المحاصيل الاقتصادية بالفطر *Aspergillus spp.* والتلوث بسمومها في المخزن. مجلة جامعة كربلاء العلمية-المجلد الحادي عشر-العدد الرابع-علمي-2013.
- الأسدي، دعاء فايق علي محمد .(2013) .التوظيف الحيوي لبكتريا *Bacillus subtilis* في السيطرة على إصابة حبوب بعض المحاصيل الاقتصادية بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* .رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة جامعة كربلاء.
- اسماعيل ، عدي نجم .(2014) السموم الفطرية النظرية والمفهوم العام . دار الكتب و الوثائق .العراق – بغداد :248 ص .
- انكولد،س.ت (1980). بايولوجيا الفطريات(ترجمة اسماعيل عبد اللطيف سالم)مطبعة جامعة البصرة.331 صفحه.
- بعنون، شيماء ربيع .(2015)عزل و توصيف الإنزيمات القاطعة *Bli*12 و Bli32 من بكتريا *Bacillus licheniformes*في بعض الترب العراقية .رسالة ماجستير .كلية العلوم- جامعة ميسان.
- بلكرامي. ك. س. و. و فيرما. ن. ر (1988).فسلجة الفطريات (ترجمة سرحان، عبد الرضا طه وفياض محمد شريف). دار الكتب لطباعة والنشر مطبعة جامعة البصرة.595 صفحه.
- الجبوري ،محيميد مد الله (1990) . علم البكتريا الطبية ،مطابع التعليم العالي في الموصل. 351 صفحة .
- الجبوري، سهاد محمد مدفون ،(2012) . دراسة إمكانية استخدام بعض المواد الطبيعية في التقليل من الآثار السمية للأفلاتوكسينات B1 وB2 في النظم الحيوية لذكور الجرذ الأبيض، رسالة ماجستير. كلية العلوم - جامعة الكوفة.
- الجراح ،نيران سالم (1988) . دراسة تعفن ثمار الكمثري والرمان والسموم المفروزة من قبل مسببات التعفن بفترة ما بعد الجني .رسالة ماجستير –جامعة بغداد.

- الجميلي , سامي عبد الرضا علي.(2014) . السموم الفطرية (Mycotoxins) دار الكتب للطباعة والنشر –العراق.
- الجميلي ،سامي عبد الرضا (1996) .المقاومة المتكاملة ضد الاصابة بالفطر *Aspergillus flavus* والتلوث بسم الافلاتوكسين B_1 في حاصل فستق الحقل .اطروحة دكتوراه . كلية الزراعة – جامعة بغداد .ص 87.
- الحدراوي،سعاد وحيد كاظم (2011).توصيف الاحياء المجهرية الملوثة لبعض الأغذية الجافه في الاسواق المحلية ودراسة اثارها السمية وامكانية السيطرة عليها .اطروحة دكتوراه_كلية العلوم_جامعة الكوفة.
- حميد ، سميرة كاظم . (2001). تقنية مستحدثة في إنتاج مبيد حيوي من لقاح سلالة *Pseudomonas fluorscens* CHAO . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- الحميري، كمال عبد الكريم عباس ظاهر الحميري(2020).التحري عن الفطر *Aspergillus flavus*/*المرافق* لحبوب الارز المحلية والمستوردة في السوق العراقية وامكانية اختزال سم Aflatoxin B1 بمواد نانوية وطرق فيزيائية.رسالة ماجستير. كلية الهندسة الزراعية،جامعة بغداد.
- الخلف، سما صفاء عبد الأمير،(2011) . دراسة التأثيرات السمية للأفلاتوكسين B1 و B2في بعض المعايير الفسلجية والكيموحيوية والنسيجية المرضية لذكور الجرذ الأبيض وسبل الحد من تأثيراتها. رسالة ماجستير ،كلية العلوم - جامعة الكوفة.
- الراوي ،علي عبد علي ورمضان ، نديم احمد والعراقي ، رياض احمد (2010) .عزل الفطريات المصاحبة لحبوب الذرة وتحديد الأنواع المنتجة للأفلاتوكسينات، مجلة علوم الرافدين، المجلد 22 ، العدد1 ، ص13-22 .
- الراوي،خاشع وعبد العزيز خلف الله (1980).تصميم وتحليل التجارب الزراعية.دار الكتب للطباعة والنشر ،جامعة الموصل.ص 488.
- الراوي،منى عبد الرحمن،(2017).تشخيص الجين المسؤول عن انتاج سم الافلا B1 في الفطر *Aspergillus flavus* واختبار الفضة النانوية في اختزاله .رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة بغداد . ص50
- الزبيدي ،حمزة كاظم .(1992)المقاومة الحيوية للآفات .دار الكتب للطباعة والنشر .جامعة الموصل .صفحة 440.

- السامرائي ،اسماعيل خليل(2006). دور الاسمدة الحيوية في معالجة نقص الحديد في نباتات الحنطة . مجلة الزراعة العراقية . مجلد . 8 عدد(2).
- سرحان، عبد الرضا طه. (1995). الفطريات المصاحبة للحبوب المخزونة في سايلو محافظة القادسية، مجلة القادسية، المجلد، العدد 1: 19: 24.
- شعبان ،عواد ونزار مصطفى الملاح(1993).المبيدات .دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .ص520.
- الشكري ، مهدي مجيد(1991) .اساسيات الفطريات وامراضها النباتية .مطابع دار الحكمة للطباعة والنشر ،جامعة بغداد-وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .ص 369.
- الشويلي، شهرزاد نجم عبد الله .(2012) دراسة التأثير التثبيطي لبكتريا *Bacillus subtilis* المعزولة من التربة العراقية على *Staphylococcus aureus* و*Escherichia coli* المعزولة من الجروح و الحروق .رسالة ماجستير .كلية العلوم الجامعة المستنصرية.
- صالح، طلال حسين ; قاسم ،علي عبدالواحد و داغر، غسان مهدي (2009) . تشخيص أنواع الأسبرجلس في بذور الذرة والرز والحنطة في ميسان واختبار قدرتها على إفراز الأفلاتوكسين على أوساط مختلفة مجلة ميسان للدراسات الأكاديمية ، المجلد الثامن ،العدد الخامس عشر ص 200-210.
- صالح، يسري .(2005) . أساسيات علم البكتريا .القاهرة.
- العاشور ، علي جابر جاسم .(2005) . إمكانية إنتاج مستحضر حيوي من لقاح البكتريا *Bacillus cereus* للسيطرة على بعض الفطريات المسببة لسقوط البادرات . رسالة ماجستير . كلية العلوم . جامعة الكوفة .
- العاني ، سؤدد عبد الستار مجيد (1997) . عزل وتشخيص الفطريات الانتهازية من مركز محافظة البصرة مع دراسة تأثير بعض المطهرات عليها. رسالة ماجستير ، كلية العلوم – جامعة البصرة .
- العاني، فائز (1998) .الاحياء الدقيقة في الاغذية والتقنيات الحديثة في الكشف عنها .قسم علوم الحياة ،كلية العلوم، جامعة اهل البيت ، الطبعة الاولى .
- العبيدي، اثير باسل عباس (2011).تصنيع مستحضر حيوي من البكتريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسين في علائق الدواجن .اطروحة دكتوراه .قسم علوم الحياة –كلية العلوم –جامعة الكوفة.

علي، سامي عبد الرضا ورائد علي حسين (2005). تقييم كفاءة بعض العوامل الكيمياوية والحيوية في حماية حاصل الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *A.flavus* و *A.niger* ،عدد خاص بالمؤتمر الاول لكلية العلوم جامعة كربلاء ،2005.

علي، سامي عبد الرضا ورملة أحمد محمد ،(2009).تأثير البكتريا *Bacillus subtilis* في حماية حبوب ونبات الذرة الصفراء من الاصابة بالفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger*،رسالة ماجستير-كلية العلوم –جامعة الكوفة

عواد، كاظم مشحوت .(1986) مبادئ كيمياء التربة .دار الكتب للطباعة والنشر-جامعة الموصل.296 صفحه.

الغزي، نور محمد مسحول (2017). التشخيص الجزيئي لعزلات بكتيريا *Bacillus* spp المعزولة محليا و كفاءتها على انتاج مضادات حياتية. رسالة ماجستير. كلية التربية للعلوم الصرفة .جامعه ذي قار.

كاظم، بشار قصي (2010). دراسة بعض الصفات الكيميائية و الفيزيائية و البايولوجية للبكتريوسين المستخلص من بكتريا .*Bacillus* spp المعزولة من مصادر بيئية مختلفة .رسالة ماجستير. كلية العلوم جامعة بغداد.

الكبيسي، نوري حمد ارزيك (1989). تأثير كاربونات الكالسيوم على بعض صفات التربة الفيزياوية والمعدنية. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بغداد. ص94.

الموسوي، زهراء كاظم حبيب .(2011) إستخدام تقنية التلقيح ببكتريا *Bacillus subtilis* في حمايةحبوب و نباتات الحنطة من الإصابة بالفطرين *Aspergillus niger* van tieghem و *Aspergillus flavus* link . رسالة ماجستير .كلية العلوم جامعة بابل.

نخيلان ،عبد العزيز مجيد.(2011). السموم الفطرية Mycotoxin . دار دجلة .المملكة الاردنية الهاشمية –عمان :320ص.

نير جارد، ترجمة د. عوض محمد عبد الرحيم، ود. محمد عبد الجواد العوشار(1995) امراض البذور. جامعة عمر المختار. الطبعة الاولى، دار الكتب الوطنية. بنغازي.

الهاشمي .هدى عبد الرضا عبد الله .(2014) . المعالجة الاحيائية لبعض السموم البيئية باستخدام بعض انواع البكتريا . اطروحة دكتوراه . كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة كربلاء.

وهبة، ناهد محمد والنسر، نيفين عبد الغني (2010).السموم الفطرية في الالبان ومنتجاتها ،الخطر والوقاية .مجلة اسيوط للدراسات الحديثة ،العدد الرابع والثلاثون.

- Ababutain, M.I. (2011). Aeromycoflora of some eastern provinces of Saudi Arabia. Indoor Built Environ.
- Abbas, H.K.; Shier, W.T., Horn, B.W., Weaver, M.A. (2004). Cultural methods for aflatoxin detection. Toxin Rev. 23: 295-315.
- Abbasi, G., & FA AL-Zuhairi, F. (2019). The role of Bio and organic fertilization in the preparation and content of some nutrients for Pomelo seedlings Citrus grandis L. grafted on different rootstocks. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*, *4*(4), 69-84.
- Abdel-Hadi, A.; David, C. and Naresh, M. (2011). Discrimination between aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* group contaminating Egyptian peanuts using molecular and analytical techniques World Mycotoxin Journal .Vol 4, 69-77.
- Agrious N. George (1972). Plant pathology. University of Massachusetts. Printed in the United States of America.
- Al -Saraireh, H., Al -Zereini, W. A., and Tarawneh, K. A. (2015). Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from South Al-Karak, Jordan. Jordan Journal of BiologicalSciences, 8 (2).162-173.
- Alberts, J.F.; Gelderblom, W.C.; Botha,A.; Vanzyl, W.H.(2006). Biological degradation of aflatoxin B1 by Rhodococcus erythropolis cultures. International Journal of Food and Microbiology, 109(2):121-126.
- Albuquerque, K.K.S.A.; Albuquerque, W.W.C.; Costa, R.M.P.B.; Batista, J.M.S.; Marques, D.A.V.; Bezerra, R.P.; Herculano, P.N.; Porto, A.L.F. (2020). Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue:

Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 23,101453.

- Al-Garni, S.M.; Kabli ,S.; Al-Shehrei,F. and Al- Ganawi,Z. (2007). Mycoflora associated with some textiles in Jeddah City. JKAU, 19: 93-113.
- AL-karboly, A. A. (2017). Effect of Bio-Fertilize in Absorption of Phosphorus from Rock Phosphate and Effect in Growth Cucumber. *Iraqi Journal of Desert Studies*, *7*(1), 21-28.
- Alves, P. D. D, Siqueira, F. F., Facchin, S., Horta, C. C. R., Victoria, J. M. N and Kalapothakis, E. (2014). Survey of Microbial Enzymes in Soil, Water and Plant Microenvironments. The Open Microbiology Journal, Vol. 8, pp. 25-31 .
- Alwakeel, S.S. (2008). Indoor fungal and bacterial contaminations on household environment in riyadh, Saudi Arabia. Saudi J. Biol. Sci., 15: 113-119.
- Atlas, R. and Bartha,R. (1981). Microbial ecology: Fundamentals and applications, pp.216and 231. Addison Wesley Publishing, Company, Inc., Phillipines.
- Awaisheh, S.S.; Rahahleh, R.J.; Algroom, R.M.; Al-Bakheit, A.A.; Al-Khaza'leh, J.M.; Al-Dababseh, B.A. (2019) Contamination Level and Exposure Assessment to Aflatoxin M1 in Jordanian Infant Milk Formulas. Ital. J. Food Saf., 8, 127-130.
- Balina A, Kebede A, Tamiru Y, (2018). Review on Afltoxin and its Impacts on Livestock. Journal of Dairy & Veterinary Sciences.6(2).
- Bancroft, J. D. and Stevens, A. (1982). Theory and practice of histological Technique 2nd ed. Editors Chur Chill Livingstone, New York (NY), page 111.
- Bandow, J.E;.Br tz, H.; Hecker ,M. (2002).Bacillus subtilis Tolerance of Moderate Concentrations of Rifampin Involves the B-

Dependent General and Multiple Stress Response . Journal of Bacteriology. January; 184(2): 459 _ 467.

- Baruzzi,F., Quintieri, L., Morea, M., and Caputo, L. (2011). Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applicationsin food. Science against microbial pathogens: communicating currentresearch and technological advances, 2, 1102-1111.
- Benjamin CR (1955). Ascocarps of Aspergillus and Penicillium. Mycologia 47:669–687.
- Bennett, J. and Klich, M. C. 2003. Mycotoxins. *clinical microbiology Reviews*.16: 497-516.
- Bennett, J.W. and Klich, M.A. eds. (1992). *Aspergillus:* Biology and Industrial Applications.British Library Cataloguing Publication. Boston:
- Bhat, R. V. and Vasanthi, S. (2003). Food safety in food security and food trade: mycotoxin food safety risk in developing ountries. Washington D.C.International Food Policy Research Institute.
- Bhat, T.K.; Singh, B.; Sharma, O. P. (1998). Microbial degradation of tannins – A current perspective. Biodegradation. 9 :343-357.
- Bochow A. V. Yao, Dr H., S.Karimov ,S,Sanginboy A . k. Sharipov. (2006). Effect of FZB24 *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field test., Journal Archives of phytopathology and plant protection, Volume 39 –Lssue 4.
- Branch, F.; Darsanaki, R.K.; Mohammadi, M.; Kolavani, M.H.; Issazadeh, K.; Aliabadi, M.A.; Branch, L. (2013). Determination of Aflatoxin M1 Levels in Raw Milk Samples in Gilan, Iran. Adv. Stud. Biol,5, 151-157.

- Chan JFW, Lau SKP, Yuen K-Y, Woo PCY. Talaromyces (Penicillium) marneffei infection in non-HIV-infected patients. Emerg Microbes Infect (2016).
- Clark. F. E. (1965). Agar-Pllats method for total microbial (C. F) Black, (1965), methods for soil analysis part 2 publishers madeson, Wisconsin, U.S.A. PP: 1572.
- Cohn, Ferdinand (1872). "Untersuchungen über Bacterien". Beiträge zur Biologie der pflanzen1.pp 127-224.
- Collee, J.G, Fraser, A.G.; Marmion, B.P.and Simmons, A. (1996). Practical Medical Microbiology.14th ed. Churchill Livingstone, London.pp.:106-716.
- Cotty, P.J. and Bayman, P. (1993). Competitive exclusion of a toxigenic strain of *A. flavus* by an atoxigenic strain. *Phytopathology*, 83, 1283. (Abstract).
- Curtis, T.Y.; Muttucumaru, N.; Shewry, P.R.; Parry, M.A.J.; Powers, S.J.;Elmore, J.S.; Mottram, D.S.; Hook, S. and Halford, N.G. (2009).Effects of genotype and environment on free amino acid levels in Wheat grain: implications for acrylamide formation during processing. J. Agric.Food Chem. 57:1013–1021.
- Dijksterhuis J (2007). Heat resistant ascospores. In: Food mycology. A multifaceted approach to fungi and food (Dijksterhuis J, Samson RA, eds). CRCPress, Boca Raton: 101–117.
- Engelhardt JA, Carlton WW (1991). Rubratoxins. In: Mycotoxins and phytoallexins. CRC Press, Boca Raton.

English Text References:

- Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in Penicillium subgenus Penicillium. Stud Mycol (2004);49:201–41.

- Frisvad, J.C.; Skouboe, P. and Samson, R.A. (2004). Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, Aspergillus rambellii sp. nov. Systematic and Applied Microbiology 28: 442-453.
- Frutos, P. ; Hervas, G. ; Giraldez, F. J. ; Mantecon, A. R. (2004). Review: Tannins and ruminant nutrition. Spanish J. Agri. Res. 2:191-202.
- Gamliel,A., and j.Katan,(1993). Influence of seed and root exudates on fluorescent *pseudomonades* and fungi in solarized soil .phytopathology 82:320-327.
- Gao, Y.N.;Wang, J.Q.; Li, S.L.; Zhang, Y.D.; Zheng, N. (2016)Aflatoxin M1cytotoxicity against Human IntestinalCaco-2 Cells Is Enhanced in the Presence of Other Mycotoxins. Food Chem. Toxicol.,96 , 79–89.
- Garbeva, P.; Van Veen, J. A. and Elsas, J. D. (2003). Predominant *Bacillus* spp. In agricultural soil under different management regimes detected Via PCR-DGGE. Microbiol. Ecol., 45: 302-316.
- Garnier, L., Valence, F., Mounier, J.,(2017a). Diversity and control of spoilage fungi in dairy products: an update. Microorganisms.5,42.
- Garnier, L.; Valence, F.; Pawtowski, A.; Auhustsinava-Galerne, L.; Frotté, N.; Baroncelli, R.; Deniel, F.;Coton, E.; Mounier, J.(2017a) .Diversity of spoilage fungi associated with French dairy products. Int. J. FoodMicrobiol.,241,191-197.
- George N. Agrious (1974). Plant pathology. Academic press. Aharcourt science and technology company.

- Gizachew, D., Szonyi, B., Tegegne, A., Hanson, J. and Grace, D. (2016) Aflatoxin analysis of dairy feeds and milk in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. Food Control. 59.774 -779.
- Gizachew, D.; Chang, C.H.; Szonyi, B.; De La Torre, S. and Ting, W.T.E. (2019). Aflatoxin B1 (AFB1) production by *Aspergillus flavus* and*Aspergillus parasiticus* on ground Nyjer seeds: The effect of water activity and temperature. Int. J. food microbial. , 296:8-13.
- Govindarajan, R.K. ; Mathivanan,K. ; Khanongnuch, C. ; Srinivasan, R. ; Unban, K. ; Deepak, A.C. ; Al Farraj, D.A. ; Alarjani, K.M. ; Al Qahtany, F. S. (2021). Tannin acyl-hydrolase production by Bacillus subtilis KMS2-2: Purification, characterization, and cytotoxicity studies. Journal of King Saud University – Science 33 (2021) 101359.
- Govindarajan, R.K. ; Revathi, S.; Rameshkumar, N.; Krishnan, M.; Kayalvizhi, N. (2016). Microbial tannase: Current perspectives and biotechnological advances. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 6, pp :168–175.
- Guan, Y.; Chen, J.;Nepovimova, E.; Long, M.;Wu,W.;Kuca, K. Aflatoxin Detoxification Using Microorganisms and Enzymes. Toxins (2021), 13, 46. https://doi.org/10.3390/toxins13010046
- Hafiz Abdullah Shakir 1 , Muhammad Khan 1 , Muhammad Irfan 2* , Shaukat Ali 3 , Muhammad Abrar Yousaf 1 , Iqra Javed 1 , Javed Iqbal Qazi 1 , Syed Shahid Imran Bukhari 3(2022). Production and Characterization of Tannase By Bacillus subtilis in Solid State Fermentation of Corn Leaves. Appl Biotechnol Rep.2022March,9(1):516-530.
- Halket, G., Dinsdale, A. E., and Logan, N. A. (2010). Evaluation of the Vitek BCL card for identification of *Bacillus* species and other

aerobic endosporeformers. Letters in applied microbiology, 50(1), 120-126.

- Harvey, R. B. ; Edrington, T. S. ; Kubena, L. F. ; Elissalde, M. H. ; Corrier, D. E. and Rottinghaus, G. E. 1995. Effect of aflatoxinand diacetoxyscirpenol in ewe lambs. Bulletin of environmentalcontamination and toxicology, 54(3): 325-330.
- Hidayathulla, S. ; Shahat, A.A. ; Alsaid, M.S. ; Al-Mishari, A.A.(2018). Optimization of physicochemical parameters of tannase post-purification and its versatile bioactivity. FEMS Microbiology Letters, 365(12),1-7. doi: 10.1093/femsle/fny051.
- Hocking AD, Whitelaw M, Harden TJ (1998). Penicillium radicum sp. nov. from the rhizosphere of Australian wheat. Mycological Research 102: 801–806.
- Horky, P. ; Skalickova, S. ; Baholet, D. and Skladanka, J. (2018). Nanoparticles as a Solution for Eliminating the Risk of Mycotoxins. *Nanomaterials*, 8(9):727.
- Horn, B. W. ; Dorner, R. L. ; Greene, P. D. P. Blankenship ; J. W. and Cole.R.J..(1996).Effect of *A.parasiticus* soil inoculum on invasion of peanut seeds. Mycopathologia, 125:179-191.
- Houbraken J, Vries RP de, Samson RA (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important Aspergillus and Penicillium species. Advances in Applied Microbiology 86: 199–249.
- Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J.L.; Barbier, G.; Coton, E. .(2014)Filamentous fungiand mycotoxins in cheese: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf*,13,437-456
- Ibrahim, A. S., T. Gebremariam, M. Liu, G. Chamilos, D. Kontoyiannis et al., (2008) Bacterial endosymbiosis is widely present among zygomycetes but does not contribute to the

pathogenesis of mucormycosis. J. Infect. Dis. 198: 1083–1090. https://doi.org/10.1086/591461

- Ichishima E. Development of enzyme technology for Aspergillus oryzae, A. sojae, and A. luchuensis, the national microorganisms of Japan. Biosci Biotechnol Biochem (2016);80(9):1681–92.
- International Agency for Research on Cancer. (2019). List of Classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, Volumes 1 to 122.
- Jallow, E.A. (2015). Determination of aflatoxin-producing fungi strains and levels of aflatoxin B1 in some selected local grains.Thesis Submitted to the Department of Biochmistry and Biotechnology, Kwame Nkrumah.
- Jana, A., Halder, S. K., Banerjee, A., Paul, T., Pati, B. R., Mondol, K. C. and Mohapatra, P.K.D. (2014). Biosynthesis, structural architecture and biotechnological potential ofbacterial tannase: A molecular advancement. Bioresource technology, Vol. 157, pp. 327-40.
- Jay N Patel, Fenil A Parmar and Vivek N Upasani (2022)Screening of microorganisms for hydrolyases with commercial potential. World Journal of Advanced Research and Reviews, 2022, 13(01), 092–101 Publication history: Received on 28 November 2021; revised on 01 January 2022; accepted on 03 January 2022 Article DOI: https://doi.org/10.30574/wjarr.2022.13.1.075.
- Khanna, R., Pawar, J., Gupta, S., Verma, H., Trivedi, H., Kumar, P., & Kumar, R. (2019). Efficiency of biofertilizers in increasing the production potential of cereals and pulses: A. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, *8*(2), 183-188.
- Körtner, G.; Pavey, C.R. and Geiser, F. (2008). Thermal biology, torpor, and activity in free-living mulgaras in arid zone Australia

during the winter reproductive season. Physiological and Biochemical Zoology, 81(4),pp.442-451.

- Kozarski, M. ; Klaus, A. ; Jakovljevic, D.; Todorovic, N. ; Vunduk,J. ; Petrovic, P.; Niksic, M.; Vrvic, M.; Griensven, L. (2015) Antioxidant of edible mushrooms. Molecules, 20, pp: 19489 – 19525.
- Kumar, A.; K. K. Kapoor.; B. S. Kundu. and R. K. Mehta. (2008). Identification of organig acids producedduring rice straw decomposition and their rolein rock phosphate solubilization. Plant soil environ., 54,(2):72-77.
- Kumar, S.; Shekhar, M.; Ali, K.A. and Sharma, P. (2007). A rapid technique for detection of toxigenic and non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus* from maize grain. Ind. Phytopathol. 1: 31-34.
- Kumar, V.V., (2018)mini Review on Aflatoxins: Properties, Toxicity and Detoxification. Nutrition and Food Science Int. J.6 (5).
- Kwon-Chung, K. J. and Bennett, J. E. (1992). Medical mycology. Lea and Febiger, Philadelphia. London, p866.
- Lai, C.C. ; Yu, W.L. (2021). COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 54(1)PP: 46-53.
- Leben, S. D. ;Wadi, J. .A. and Easton, G. D. (1987). Effect of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of V. deliae. Phttopathol.77:1592-1595.
- Lekha, P.K. ; Lonsane, B. K. (1997). Production and Application of Tannin Acyl Hydrolase: State of the Art. Advances in Applied Microbiology. Volume 44. PP: 215-260.
- López, A. M.; Ramírez-Conejo, J. D. ; Chávez-Parga1, M.C. (2020). Comparative analysis of enzymatic activity of tannase in

non-conventional yeasts to produce ellagic acid. Food Sci. Technol, Campinas, 40(3): 557-563.

- Lyngwi, N. A., and Joshi, R. (2014). Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. Biology of Useful Plants and Microbes, 3, 33-43.
- Ma, L.-J., A. S. Ibrahim, C. Skory, M. G. Grabherr, G. Burger et al.,(2009) Genomic analysis of the basal lineage fungus Rhizopus oryzae reveals a whole-genome duplication. PLoS Genet. 5: e1000549. https:// doi.org/10.1371/journal.pgen.1000549.
- MacFaddin, J. F.(2002). Biochemical test for identification of medical bacteria , 3rd . Williams and Wilkins Baltimor.
- Machida, M. and Gomi, K. (2010). Aspergillus: Molecular biology andMadigan M. and Martinko J. (2005). Brock biology of microorganisms. 11th edition, USA: Prentice Hall, pp. 545-572.
- Madigan, M. and Martinko, J. (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th ed. ed). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329.1.
- Majeed, S. ; De Boevre, M. ; De Saeger, S. ; Rauf, W. ; Tawab, A. ; Rahman, M., and Iqbal, M. (2018). Multiple mycotoxins in rice: Occurrence and health risk assessment in children and adults of Punjab, Pakistan. *Toxins*, 10(2): 77.
- Makun , H. A. ; S. T. Anjorin ; B.Moronfoye ; F. O. Adeje ; O. Afolablil ; G. Fagbayibo ; B.O. Balogum and Surajudeen A.A.(2010). Fungal and aflatoxin contamination of human food commodities in Nigeria. Afiican Journal of Food Science , 4:127-135.
- Marchese, S.; Polo, A.; Ariano, A.; Velotto, S.; Costantini, S.; Severino, L. (2018)Aflatoxin B1 and M1 BiologicalProperties and Their Involvement in Cancer Development. Toxins, 10, 214.

- Marciano, B.E., Wesley, R., De Carlo, E.S., Anderson, V.L., Barnhart, L.A., Darnell, D., Malech, H.L., Gallin, J.I., and Holland, S.M. (2005). Long-term interferon-gamma therapy for patients with chronic granulomatous disease. Clinical Infectious Diseases, 39: 692–699.
- Marin,S.; Sanchis, V.; Saenz, R.; Ramos, A.J.; Vinas, I. and Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some Aspergillus and Penicillium spp. From maize grain. Jouranl of Applied Microbiology.,84 : 25 – 36.
- Matny, O. N. ; Bates, S. T. and Song, Z. (2016). Geographic distribution of *Fusarium culmorum* chemotypes associated with wheat crown rot in Iraq. Journal of Plant Protection Research, 57(1): 43-49.
- Matny, O.(2020). Mycotoxin: Global Risk and Silent Killer in Our Food. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*. 8 (1): 26-32.
- Mcheen, C. D. ; Reilly, C.C. and Pusey, P.L. (1986) . Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to Monilinia fructicola . Phytopathol. 76 (2) : 136 – 138 .
- Mehl L, Cotty PJ (2010). Variation in Competitive Ability Among Isolates of Aspergillus flavus from Different Vegetative Compatibility Groups During Maize Infection. Phytopathology. 100(2):150-159.
- Miller, J.D.; Schaafsma, A.W.; Bhatnagar, D.; Bondy, G.; Carbone, I.; Harris, L.J.; Harrison, G.; Munkvold, G.P.; Oswald, I.P.; Pestka, J.J. and Sharpe, L. (2014). Mycotoxins that affect the North American agri-food sector: state of the art and directions for the future. World Mycotoxin Journal, 7(1): 63-82.

- Mishra,H.N. and Das, C .(2003).Areview on biological control and metabolism of aflatoxin . crit. Rev.Food Sci.43.245-264.
- Muslim, S.N. ; Mahammed, A.N. ; AL_Kadmy, I.M.S.; Muslim, S.N.(2015). Detoxification of zearalenone produced by *Fusarium graminearum* by purified tannase from *Citrobacter freundii*. Greener Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2 (1), pp: 001-008.
- Muthomi, J.W., Mureithi, B.K., Chemining'wa, G.N., Gathumbi, J.K., and Mutit, E.W.(2012). Aspergillus species and Aflatoxin b1 in soil, maize grain and flour samples from semi-arid and humid regions of Kenya.International Journal of AgriScience. 2: 22-34.
- Nawar, S.L.,(2008). Prevention and control of fungi contaminated stored pistachio nuts imported to Saudi Arabia. Saudi J. Biol. Sci., 15: 105-112.
- Nester, M.T.(2001). "Microbiology human perspective". 3rded., McGraw Hill Companies, Inc., New York. 893 pp. + xxxiv
- Nguyen, T.; Flint, S.; Palmer, J. (2020)Control of Aflatoxin M1 in Milk by Novel Methods: A Review. Food Chem,311,125984 .
- Nicholson, W. L. (2002) . Roles of *Bacillus* endospores in the environment. Cell Mol. Life Sci., 59:410-416.
- Niyaonzima, F. N. (2019).Production of microbial industrial enzymes (Review article) Acta Scientific Microbiology 2 (12) :75-89.
- Nyirahakizimana, H.; Mwamburi, L.; Wakhisi, J.; Mutegi, C.; Christie, M. and Wagacha, J. (2013). "Occurrence of *Aspergillus* Species and Aflatoxin Contamination in Raw and Roasted Peanuts from Formal and Informal Markets in Eldoret and Kericho Towns, Kenya," Advances in Microbiology, Vol. 3 No. 4, 2013, pp. 333-342. doi: 10.4236/aim. 34047.

- Odumeru, J. A., Steele, M., Fruhner, L., Larkin, C., Jiang, J., Mann, E., and McNab, W. B. (1999). Evaluation of accuracy and repeatability of identification of food-borne pathogens by automated bacterial identification systems. Journal of clinical microbiology, 37(4), 944-949.
- Ono, M. and Kimura, N. (1991). Antifungal peptides produced by *Bacillus subtilus* for the biological control of aflatoxin contamination. Japanese Association of Mycotoxicology. 34:23-28.
- Pal , M. (2017). Are Mycotoxins Silent Killers of Humans and Animals. *Journal of Experimental Food Chemistry*. 3(4) :2472-2474.
- Parkash ,O.and Raoof,M.A.(1989).Control of mango fruit decay with post harvest application of various chemicals against black rot ,stem and anthracose disease J.. of plant disease .6:99-106.
- Partida-Martinez, L. P., I. Groth, I. Schmitt, W. Richter, M. Roth et al., (2007) Burkholderia rhizoxinica sp. nov. and Burkholderia endofungorum sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus Rhizopus microsporus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2583–2590. https://doi. org/10.1099/ijs.0.64660-0
- Payne, G. A. and Brow, M. P. (1998).Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis.Ann.Rev.Phytopathol.36:329-362.
- Pitt ,John I. and. Hocking, Ailsa D. (2009).Fungi and food spoilage.Book ,Third edition ; CSIRO Food and Nutritional Sciences. Australia.
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important?. *Sabouraudia*, 38 (1): 17-22.
- Pitt, J. I., and Hocking, A. D. 1997. Fungi and food spoilage. (1997). London, UK: Blackie Academic and Professional.

- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage.3rd Edition . Springer US.New York: 520 pp.
- Prescott, L. M. (2002). Introduction to all major areas of Microbiology. Amazon Co. UK. The Sixth edition, PP. 410. Production Consumption. Exports and Import statistics.
- Promon, S. K., Program, B., Sciences, N., (2015). Detected to humanity. RUDRAMURTHY, G. R.,Swamy, M. K., Sinniah, U. R., Ghasemzadeh, A., 2016. Nanoparticles: Alternatives against drug-resistant pathogenic microbis. Molecules 21, 1-30. Doi: 10. 3390/ molecules.
- Rafique, M., Riaz, A., Anjum, A., Qureshi, M. A., & Mujeeb, F. (2018). Role of Bioinoculants for Improving Growth and Yield of Okra (*Abelmoshus esculentum*). *Universal Journal of Agricultural Research*, *6*(3), 105-112.
- Ransing, S. ; Bele, K.; Navnage, N. ; Chande, K. ; Mate, P؛ . Ramteke, P. ; Wani, P. (2020). Bioremediation of contaminated soils. International Journal of Chemical Studies 8(6): 1485-1488.
- Raper , K.B. and Fennell , D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams and Wiking Co. , Battimor. 686 pp.
- Rasiravathanahalli Kaveriyappan Govindarajana Krishnamurthy Mathivananb Chartchai Khanongnucha Rajendran Srinivasanc KridsadaUnbana Arulanandam Charli Deepakd Dunia A.Al Farraje Khaloud Mohammed Alarjanie Fatmah S.Al Qahtanyf(2021). Tannin acyl-hydrolase production by Bacillus subtilis KMS2-2: Purification, characterization, and cytotoxicity studies. Journal of King Saud University - Science Volume 33, Issue 3, May 2021, 101359.
- Refish, N. M. R., Talib, A. J., Jian-Wei, G., Fu, C., and Yu, L. (2016). Promoting Role of *Bacillus Subtilis* BS87 on the Growth

and Content of Some Natural Products in the Medicinal Plants *Anoectochilus roxburghii* and *A. formosanus*. Advances in Life Sciences, 6(2), 31-38.

- Ren, B., Wu, M., Wang, Q., Peng, X., Wen, H., McKinstry, W.J. and Chen, Q. (2013). Crystal structure of Tannase from Lactobacillus plantarum. Journal of Molecular. Biology, Vol. 425, 2737-2751.
- Rodrigues, P. ;Soares, C. ;Kozakiewicz, Z. ;Paterson, R. R. M. ; Lima, N. and Venacio ,A.(2007).Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and Aflatoxins .Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology,A.M'endez-Vilas(Ed), pp.528-529.
- Rodriguez-Duran, L. V., Valdivia-Urdiales, B., Contreras-Esquivel, J. C., Rodriguez-Herrera, R. and Aguilar, C.N. (2011). Novel Strategies for Upstream and Downstream Processing of Tannin Acyl Hydrolase. Enzyme Research, Vol. 2011, pp. 20.
- Saito, M. and Machida, S. (1999) . Arapid identification method for aflatoxin producing strains A. flavus and A. parasiticus by ammonia vapor. Mycoscience.40.205-298.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, et al. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus Aspergillus. Studies in Mycology 78:141–173.
- Savić, Z.; Dudaš, T.; Loc, M.; Grahovac, M.; Budakov, D.; Jajić, I.; Krstović, S.; Barošević, T.; Krska, R.; Sulyok, M. and Stojšin, V. (2020).
- Schipper, M. A. A., and J. A. Stalpers, (1984) A revision of the genus Rhizopus. Studies in Mycology 25. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 20–34.

- Services, M. (2015). UK Standards for Microbiology Investigations. Bacteriology, B 55(5.2), 1–21.sector: state of the art and directions for the future. World Mycotoxin.
- Shapira, R., and Paster, N. (2004) . Control of mycotoxins in storage and techniques for their decontamination. In Mycotoxins in food : 190-223. Woodhead Publishing.
- Sharma,K. ; Kumar, V. ; Kaur, J. ; Tanwar, B.; Goyal, A. ; Sharma, R. ; Gat, Y. ; Kumar, A. (2019). Health effects, sources, utilization and safety of tannins: a critical review. Toxin Reviews. ISSN: 1556-9543. Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/itxr20.
- Silva, V.M.A. ; Cruz, R. ; Fonseca, J.C. ; Souza- Motta, M. ; Sena, A. R.; Moreira, K. A. (2017). Juice clarification with tannases from Aspergillus carneus URM5577 produced by solid – state fermentation using Terminalia catappa L.leaves. Afr. J. Biotechnol. 16(19) pp: 1131-1141.
- Sobolev V. S. and Dorner J. W. (2002).Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography .J.. of Association of Official analytical Chemist s International,85:642-645.
- Sun, X. D. ; Su, P., and Shan, H. (2017). Mycotoxin contamination of rice in China. *Journal of food science*, 82(3) : 573-584.
- Sunny Dhiman1 , Gunjan Mukherjee1 , Anu Kumar1 & Rita Singh Majumdar2 (2022).Purification, Characterization and Application Study of Bacterial Tannase for Optimization of Gallic acid Synthesis from Fruit Waste Journal of Scientific & Industrial Research Vol. 81, October 2022, pp. 1029-1036 DOI: 10.56042/jsir.v81i10.55236

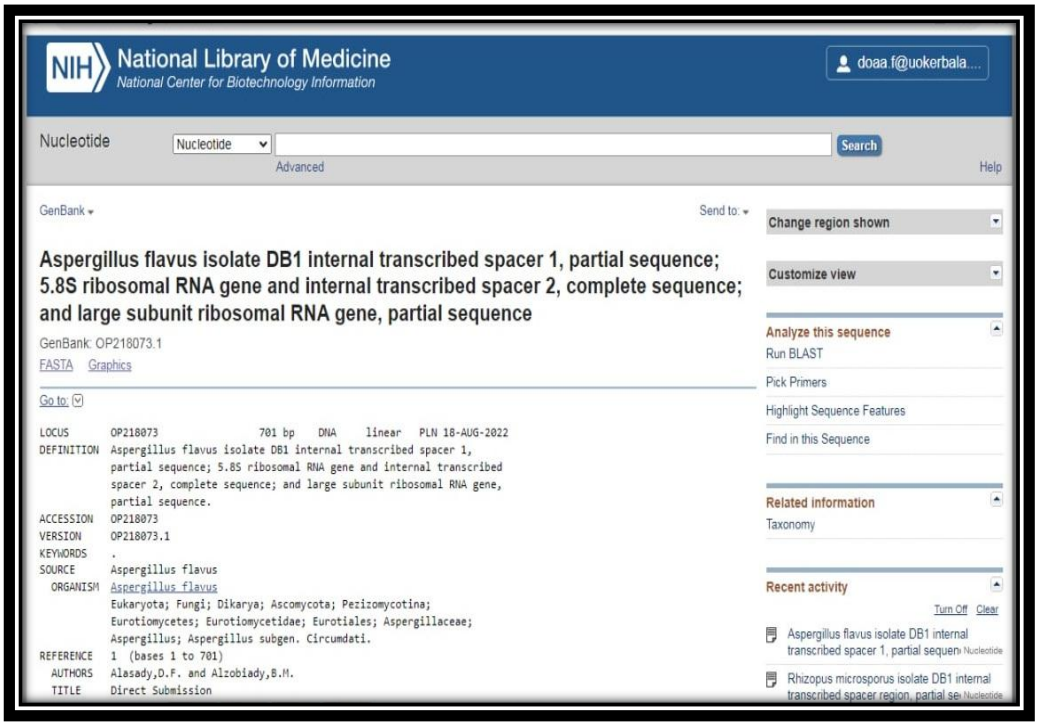
- Swain, M. R., Laxminarayana, K., & Ray, R. C. (2012). Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research*, *1*(3), 273-279.
- Thiyonila, B. ; Kannan, M. ; Abisheik, R. ; Krishnan, M. (2022). Characterization of Apple Juice Clarified by Tannase from Serratia marcescens IMBL5 Produced using Agro-industrial Waste Materials. *Journal of Pure and Applied Microbiology* 16(1):514-525.
- Tietz, N. W. (Eds.) (1995) .Clinical guide to laboratory tests, 3rd edn., W.B.Saunders, Co., Philadelphia: 1096 pp.
- Todar.(2004)Textbook of Bacteriology on line,Wisconsin-Madison Dept.of Bacteriology.
- Tork, S. ; Qari, H. ; Zainal, H. ; Aly, M. (2020). Biodegradation of tannins from polluted source using natural enzymes. Kuwait J. Sci. 47 (4) pp: 82-91 .
- Tournas, V. H., (2005) Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. Crit. Rev. Microbiol. 31: 33–44. https://doi.org/ 10.1080/10408410590886024
- Tseng , T. S. ; Tu , J.C. and Tzeau , S.S. (1995).Mycoflora and Mycotoxins in dry bean(Phaseolus vulgaris) produced in Taiwan and in Ontario, Canada, Bot. Bull. Acad. Sc 36 :299-234.
- Tyagi, S., Naresh, R. K., Prakash, S., Yadav, G., Tiwari, S., Rawat, B., & Sharma, N. (2019). Conservation agriculture, biofertilizers and biopesticides: A holistic approach for agricultural sustainability and food security: A review. *IJCS*, *7*(4), 3036-3046.
- Udomkun,P.;Nimo,A.;Nagle,M.;Müller,J.;Vanlauwe,B.;Bandyopadhyay, R.(2017).Innovative Technologies to Manage a Fl Atoxins in Foods and Feeds and the pro Fi Tability of Application e A Review. Food Control ,76,127–138.

- van Egmond, H. P., and Jonker, M. A. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. Food and Agriculture organization of the United Nations.
- Vanittanakom N, Cooper CR, Fisher MC, Sirisanthana T. Penicillium marneffei infection and recent advances in the epidemiology and molecular biology aspects. Clin Microbiol Rev (2006);19(1):95–110.
- Vaz, A.; Cabral Silva, A.; Rodrigues, A.; Venâncio, A.(2020). DetectionMethodsforAflatoxinM1inDairy roducts.Microorganisms, 8,246.
- Vesonder,R. ;Haliburton, J. ; Stubblefield, R. ; Gilmore, W. ; Peterson, S. (1991). *Aspergillus flavus* and Aflatoxin B1,B2 and M1 in corn associated with equine death .Archives of Environmental Contamination and Toxicology 20,151-153.
- Visagie CM, Hirooka Y, Tanney JB, et al. (2014). Aspergillus, Penicillium and Talaromyces isolated from house dust samples collected around the world. Studies in Mycology 78: 63–139.
- Warth, B.; Braun, D.; Ezekiel, C.N.; Turner, P.C.; Degen, G.H.; Marko, D. (2016).Biomonitoring of Mycotoxinsin Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. Chem. Res. Toxicol., 29,1087-1097.
- Whitaker, J.R. ; Bernard, R.A.(1972). Experiment for introduction to ezymology.The Wiber Press Davis.
- WHO Department of Food Safety and Zoonoses, February .2018. REF. No.: /NHM Aflatoxins /FOS/RAM/18.1
- World Health Organization.. (2017). Evaluation of certain contaminants in food. *World Health Organization technical report series*, (1002), 1 .

- Xian-guo, H. ; Ursula, M.(1994).Antifungal compound from Solanum nigrescens. J. Enthopharm. 43:173-177.
- Yazdani, D.; Zainal Abidin, M. A.; Tan, Y. H. and Kamaruzaman, S.(2010). Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates African Journal of Biotechnology Vol. 9(45), pp. 7654-7659.
- Zohri ,A.A.(2006).Fungal flora and mycotoxins of five kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia .Mycopathologia ,115: 121-127.

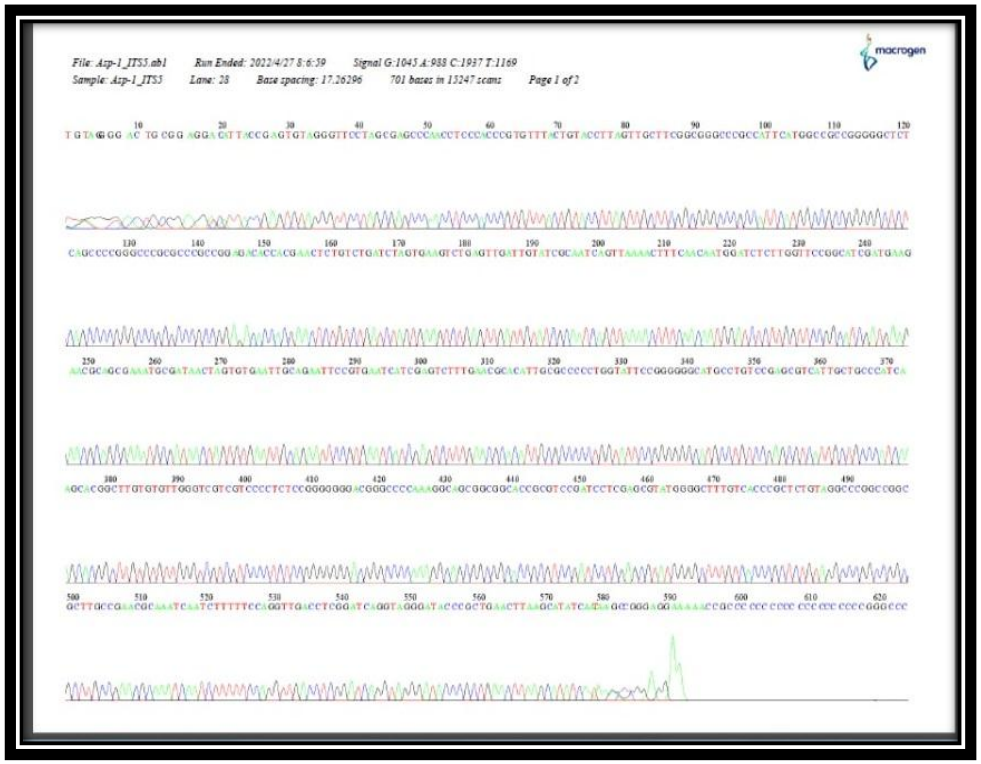
الملاحق

ملحق رقم (1) يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1 في البنك الجيني NCBI

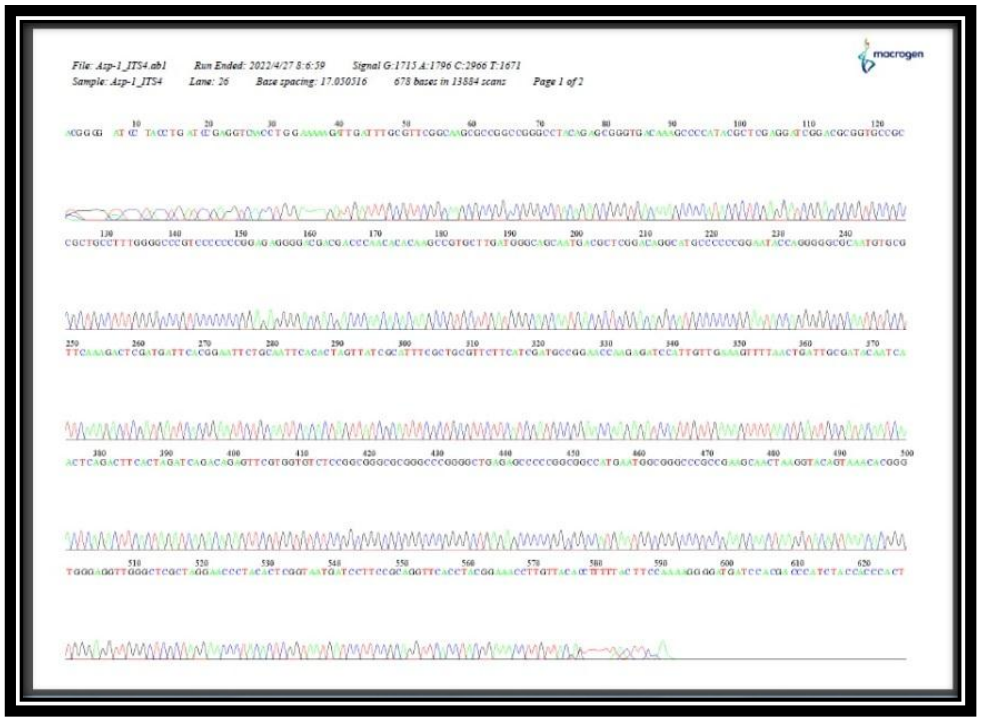


ملحق رقم (2) يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1 في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية

ملحق رقم (3) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1

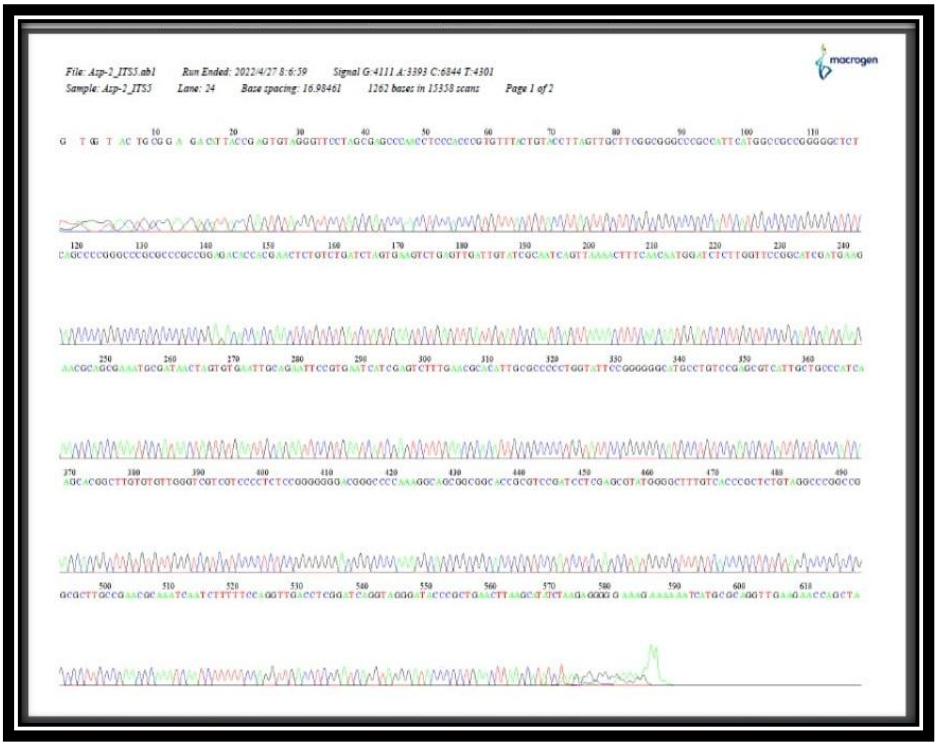


ملحق رقم (4) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB1

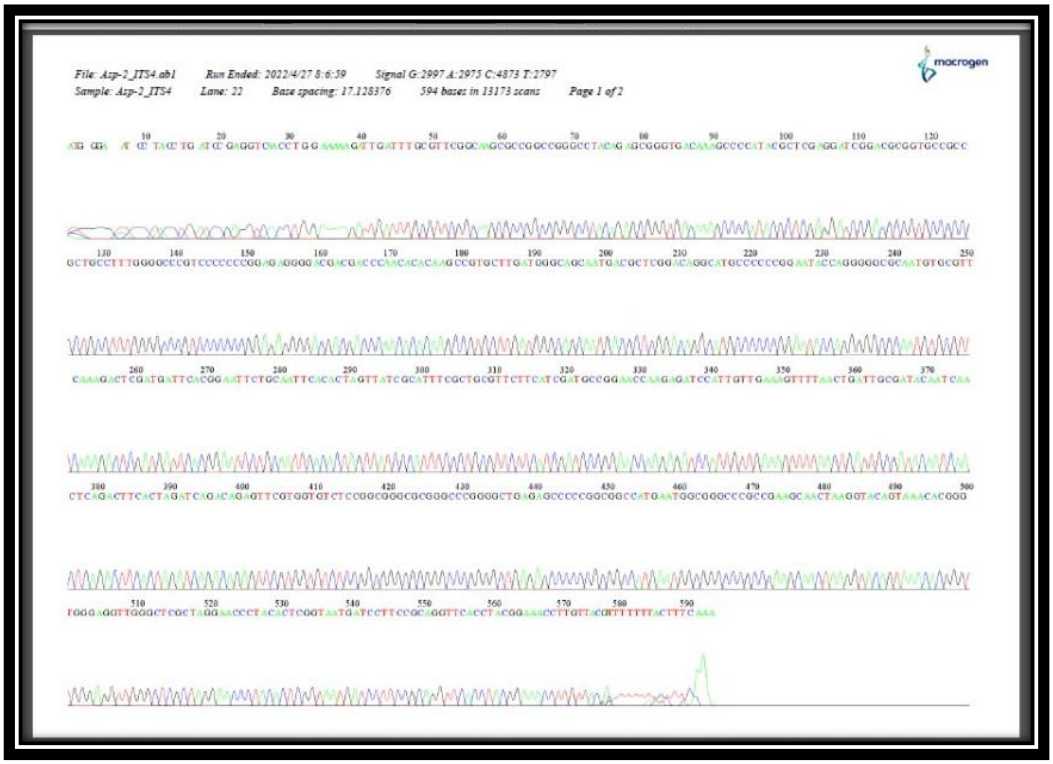


ملحق رقم (5) يوضح تسجيل عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2 في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية

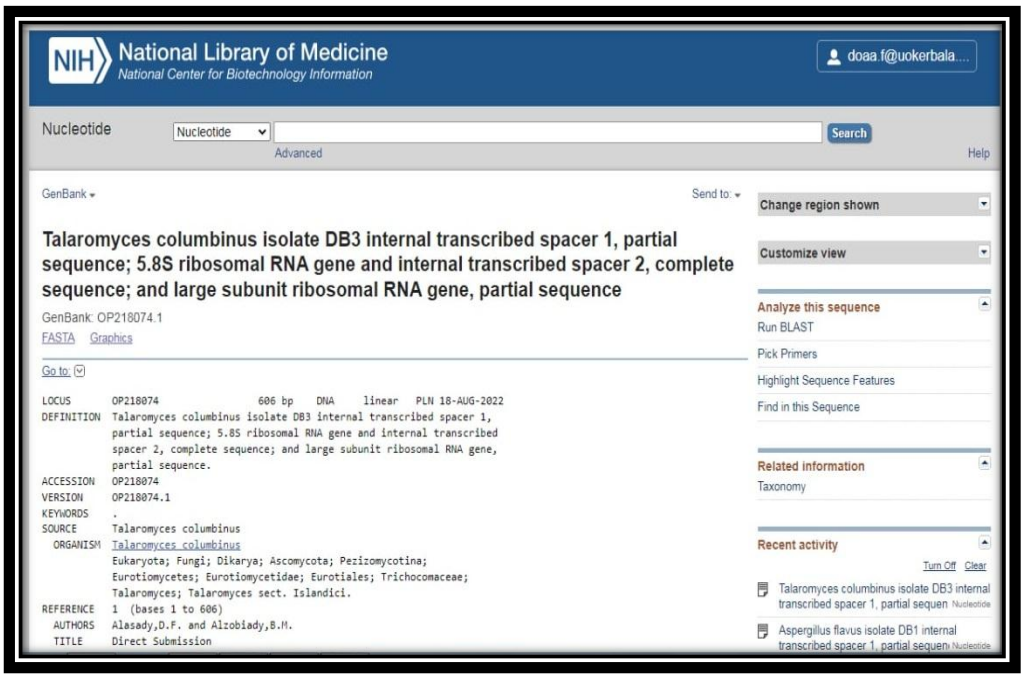
ملحق رقم (6) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2



ملحق رقم (7) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Aspergillus flavus* DB2



ملحق رقم (8) يوضح تسجيل عزلة الفطر DB3*Talaromyces colombinus* في البنك الجيني NCBI



ملحق رقم (9) يوضح تسجيل عزلة الفطر DB3 *Talaromyces columbinus* في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية

Download GenBank Graphics Next Previous Descriptions

Talaromyces columbinus isolate DB3 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

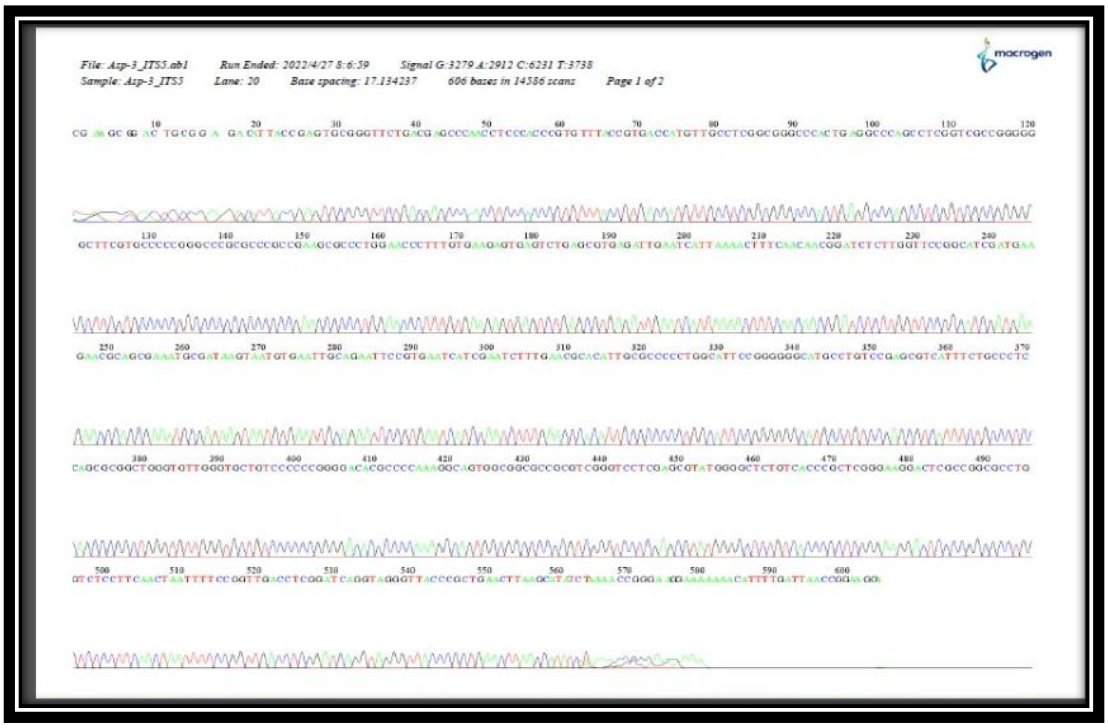
Sequence ID: OP218074.1 Length: 606 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 606 GenBank Graphics Next Match Previous Match

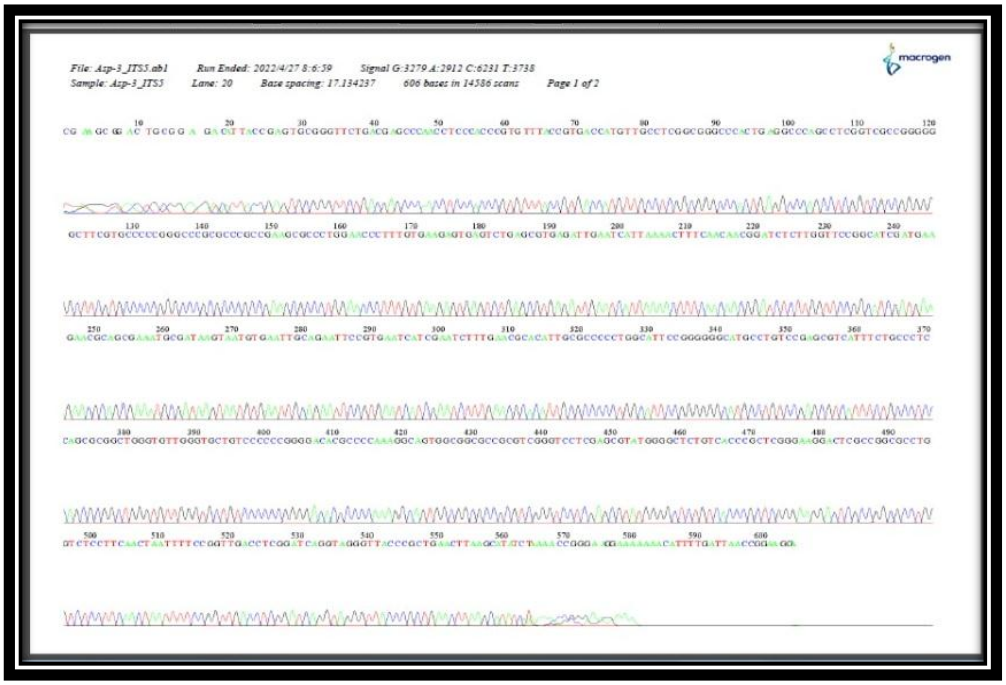
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1120 bits(606)	0.0	606/606(100%)	0/606(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CGAAGCGGACTGCGGAGACATTACCGAGTGCGGGTTCTGACGAGCCCAACCTCCCACCCG  60
Sbjct  1    CGAAGCGGACTGCGGAGACATTACCGAGTGCGGGTTCTGACGAGCCCAACCTCCCACCCG  60

Query  61   TGTTTACCGTGACCATGTTGCCTCGGCGGGCCCACTGAGGCCCAGCCTCGGTCGCCGGGG  120
Sbjct  61   TGTTTACCGTGACCATGTTGCCTCGGCGGGCCCACTGAGGCCCAGCCTCGGTCGCCGGGG  120

Query  121  GGCTTCGTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCCCTGGAACCCTTTGTGAAGAGTGA  180
Sbjct  121  GGCTTCGTGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGCGCCCTGGAACCCTTTGTGAAGAGTGA  180

Query  181  GTCTGAGCGTGAGATTGAATCATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC  240
Sbjct  181  GTCTGAGCGTGAGATTGAATCATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATC  240

Query  241  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCG  300
Sbjct  241  GATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCG  300

Query  301  AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA  360
Sbjct  301  AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA  360

Query  361  TTTCTGCCCTCCAGCGCGGCTGGGTGTTGGGTGCTGTCCCCCCGGGGACACGCCCCAAAG  420
Sbjct  361  TTTCTGCCCTCCAGCGCGGCTGGGTGTTGGGTGCTGTCCCCCCGGGGACACGCCCCAAAG  420

Query  421  GCAGTGGCGGCGCCGCGTCGGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGTCACCCGCTCGGGAAG  480
```

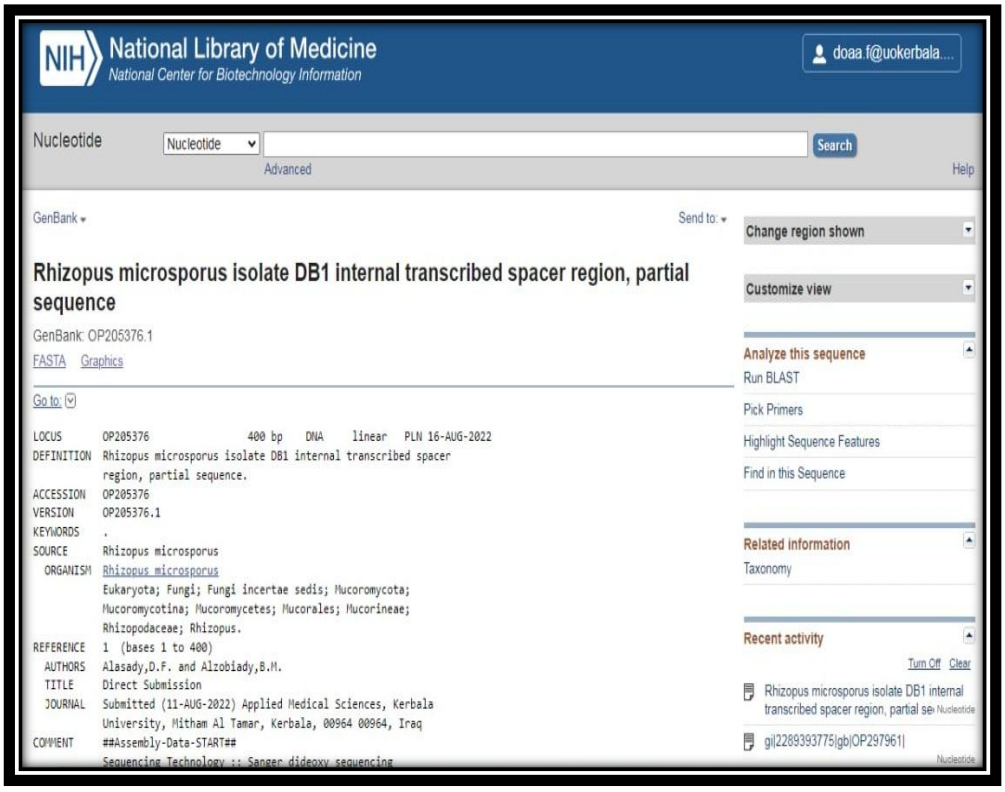
ملحق رقم (10) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر DB3 *Talaromyces columbinus*



ملحق رقم (11) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Talaromyces columbinus* DB3



ملحق رقم (12) يوضح تسجيل عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1* في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية



ملحق رقم (13) يوضح تسجيل عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1* في البنك الجيني NCBI وتتابع القواعد مع العزلات العالمية

Download GenBank Graphics ▼Next ▲Previous ◀Descriptions

Rhizopus microsporus isolate DB1 internal transcribed spacer region, partial sequence

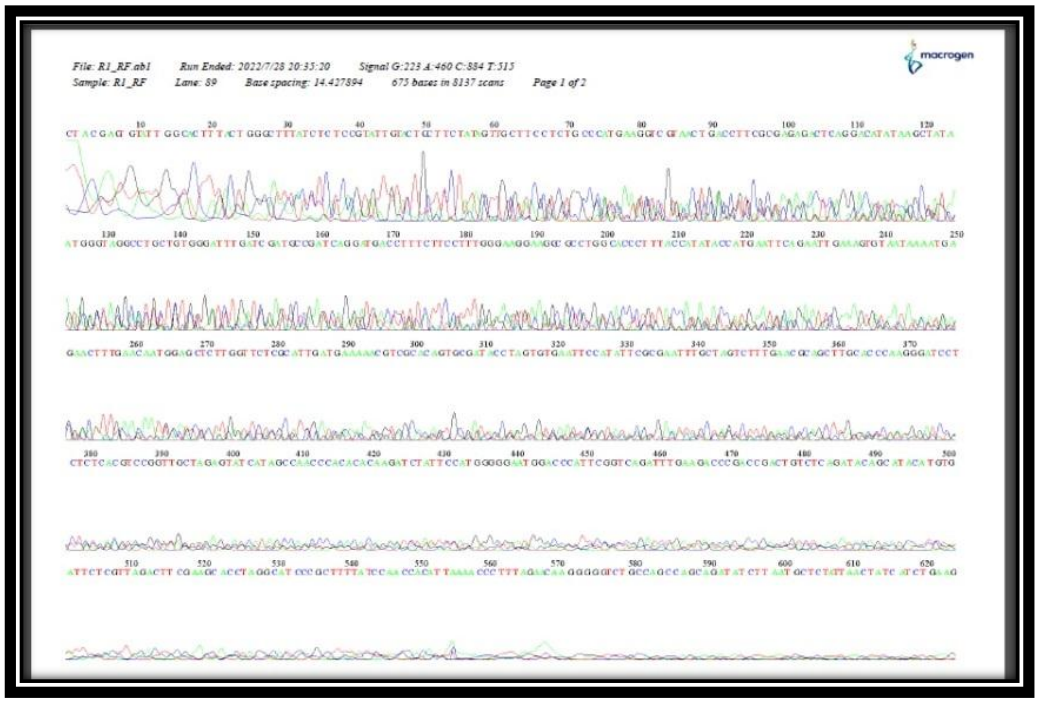
Sequence ID: OP205376.1 Length: 400 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 400 GenBank Graphics ▼Next Match ▲Previous Match

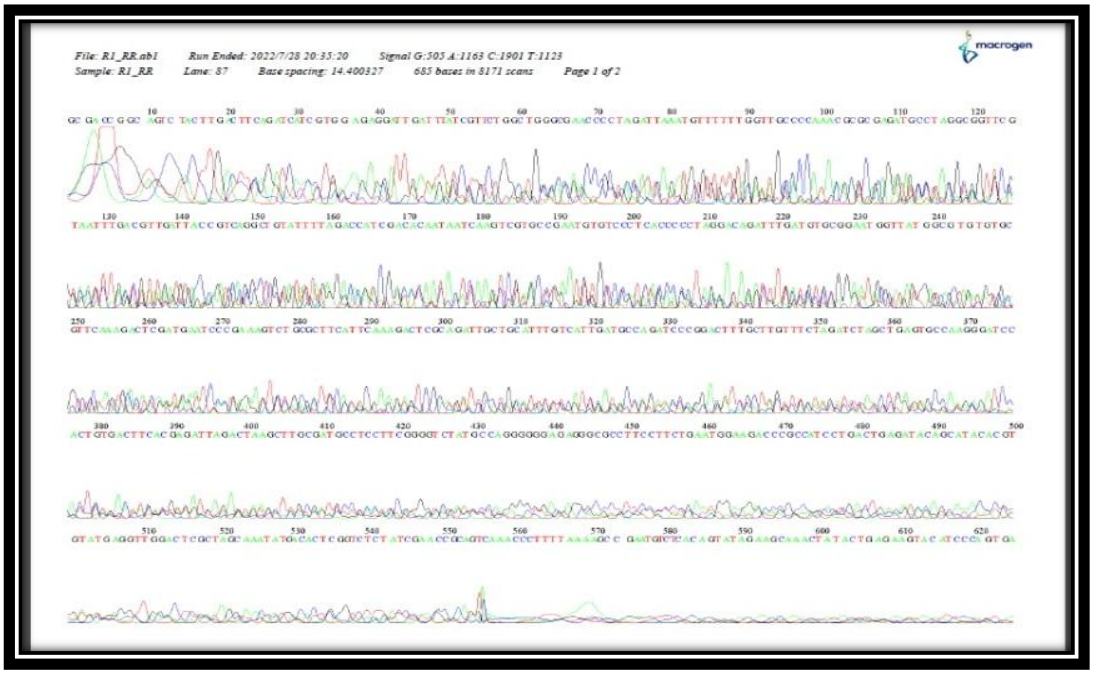
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
739 bits(400)	0.0	400/400(100%)	0/400(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    GAGACTCAGGACATATAAGCTATAATGGGTAGGCCTGCTGTGGGATTTGATCGATGCCGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    GAGACTCAGGACATATAAGCTATAATGGGTAGGCCTGCTGTGGGATTTGATCGATGCCGA  60

Query  61   TCAGGATGACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGCGCCTGGCACCCTTTACCATATACCAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TCAGGATGACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGCGCCTGGCACCCTTTACCATATACCAT  120

Query  121  GAATTCAGAATTGAAAGTGTAATAAAATGAGAACTTTGAACAATGGAGCTCTTGGTTCTC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GAATTCAGAATTGAAAGTGTAATAAAATGAGAACTTTGAACAATGGAGCTCTTGGTTCTC  180

Query  181  GCATTGATGAAAAACGTCGCACAGTGCGATACCTAGTGTGAATTCCATATTCGCGAATTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  GCATTGATGAAAAACGTCGCACAGTGCGATACCTAGTGTGAATTCCATATTCGCGAATTT  240

Query  241  GCTAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACCCAAGGGATCCTCTCTCACGTCCGGTTGCTAGAGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  GCTAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACCCAAGGGATCCTCTCTCACGTCCGGTTGCTAGAGT  300

Query  301  ATCATAGCCAACCCACACACAAGATCTATTCCATGGGGGAATGGACCCATTCGGTCAGAT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  ATCATAGCCAACCCACACACAAGATCTATTCCATGGGGGAATGGACCCATTCGGTCAGAT  360

Query  361  TTGAAGACCCGACCGACTGTCTCAGATACAGCATACATGT  400
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  TTGAAGACCCGACCGACTGTCTCAGATACAGCATACATGT  400
```

ملحق رقم (14) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1*



ملحق رقم (15) يوضح تسلسلات قواعد عزلة الفطر *Rhizopus microspores DB1*



ملحق رقم (16) تأثير المستحضر الحيوي في المعايير الفسلجية للحيوانات المختبرية

المعايير الفسلجية	المعاملات	نتائج الفحص
معدل اعداد كريات الدم البيض	المستحضر الحيوي المحمل بالبكتريا *B. subtilis* B1	a 9.1
	وسط المرق المغذي المنماة فيه بكتريا *B. subtilis* B1	a 9.5
	كاربونات الكالسيوم فقط	a 9.2
	معاملات السيطرة	a 9.8
معدل ترسيب كريات الدم الحمراء	المستحضر الحيوي المحمل بالبكتريا *B. subtilis* B1	a 7.7
	وسط المرق المغذي المنماة فيه بكتريا *B. subtilis* B1	a 7.60
	كاربونات الكالسيوم فقط	a 7.42
	معاملات السيطرة	a 7.45
معدل Hb	المستحضر الحيوي المحمل بالبكتريا *B. subtilis* B1	a 12.3
	وسط المرق المغذي المنماة فيه بكتريا *B. subtilis* B1	a 12.38
	كاربونات الكالسيوم فقط	a 11.29
	معاملات السيطرة	a 11.83
معدل مكداس الدم PCV	المستحضر الحيوي المحمل بالبكتريا *B. subtilis* B1	a 38.3
	وسط المرق المغذي المنماة فيه بكتريا *B. subtilis* B1	a 39.55
	كاربونات الكالسيوم فقط	a 40.45
	معاملات السيطرة	a 38.46

***a =عدم وجود فروق معنوية حسب اختبار Tuky**

Abstract

Fungi are widely distributed, which causes spoilage of raw materials and food spoilage, in addition to their direct impact on human health via food chain toxins. The use of chemical pesticides and improper handling methods to eradicate fungi and limit their spread pose various hazards to health and the environment.

Therefore, the current research aims to find a safe and healthy alternative that is not harmful to the environment or organisms by using biological treatments that play an important role in biological control, as demonstrated by the results of the field study of showing crops in Karbala, where the Karbala government obtained 404 isolates of different types of fungi, including the fungal type *Aspergillus*

Aspergillus niger accounted for 98% of all inspected grains, when *Aspergillus niger* accounted for 90% of yellow corn grains, the appearance rate of other varieties was between 80 and 40%, and the appearance of the fungus *Talaromys colombinus* was very low 20 -50% Compared to the dominance of *Aspergillus spp.*, the fungus *Rhizopus microspore* shows a 10–50% growth rate in the examined grain.

The results of thin-layer chromatography (TLC) detection and ammonia detection showed that all isolates produced different proportions of aflatoxin, and the most virulent strain was genetically diagnosed by PCR. The sequence results are sent to the Genome Bank and given a special sequence number because the isolates are 100% identical to isolates worldwide. This confirms its widespread distribution and that it is not restricted to specific environments.

On the other hand, the local soil provided a bacterial isolate with high inhibitory efficiency against fungi represented by *Bacillus subtilis*-type bacteria, and its diagnosis was confirmed externally and microscopically using a Vitec instrument because the isolate had no effect on the inhibitory The fungus grew very efficiently, around 100%, using a mix-and-match approach, and I named it *Bacillus subtillus* DB1.

A bacterial preparation was manufactured after the yellow corn medium proved highly efficient for the growth of bacteria, as the number of bacterial units reached12.5× 10^{12} CFU when it reached 7 ×10^{12} in the extract. Wheat was significantly less than barley extract.

Therefore, calcium carbonate was relied upon as a carrier for the bacteria at a rate of 1:2 g/ml (carrier/bacterial filtrate), as the calculated numbers of bacteria per gram were 1012×150 CFU/g, and a health safety check of the biological preparation was conducted on animals. rat. The laboratory and physiological blood tests and histological sections of the liver, kidney, and the first part of the intestine were within the normal limits, and no changes were seen from the normal condition compared to the treatment. control (untreated rats).

The biological preparation also proved to be highly efficient in the storage experiment, which lasted for six months, as no infections were recorded in the grains treated with the bacterial biological preparation only, compared with the control treatments, the untreated grains, where the concentration of the toxin in them, measured by HBLC technology, ranged between (98 and 96) PPM. Whereas, grains treated with *Aspergillus flavus* DB1 recorded a toxin contamination rate of 489.08 PPM, *Talaromyces columbinus* DB3 recorded a rate of 401.22 PPM, and

a fungus called *Rhizopus microsporum* DB1 recorded a rate of 395.19 PPM.

When grains were treated with fungal inoculum and bacteria, the percent toxin concentration was zero for all treatments except for grains treated with *A. flavus* DB1 and bacteria, as it reached 1.99 PPM, which is very low compared to grains. Measuring toxin concentrations using HBLC techniques gave very accurate results for toxin presence compared to toxin concentrations in comparative treatments. Tanzyme activity has been demonstrated in bacteria. It is considered to be one of the most important enzymes for the inhibition of fungal growth and the destruction of aflatoxin toxins, since the enzyme can be isolated in purified form from bacterial extracts of liquid cultures aged for 48 hours by precipitation and dialysis methods. Because the enzyme is obtained in a 100% crude, purified form, and the cytotoxicity test of the pure enzyme is positive because the enzyme has no negative effect on red blood cells, it also demonstrates its efficiency in destroying aflatoxins because it will The aflatoxin concentration in the crude enzyme was reduced to 1.5 ng/ml, which was equivalent to 1.3 ng/ml in the purified enzyme.

University of Kerbala

The Characterization Phenotypic and Molecular of Isolated Fungi Associated from Nuts and Grains That Produce Aflatoxin B1 and Possibility Reducing the Toxicity by Employing *Bacillus subtilis*

A Thesis

submitted to The Council of the College of Education for Pure Sciences - University of Kerbala, as a partial fulfillment of the requirement for the degree of doctor philosophy in Biology - microbial toxins

Submitted by

Doaa Faik Ali Mohamed AL-asady

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Ban Musa Hassan

2023 - 1444