



الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

كلية العلوم

قسم علم الحياة النباتية

دراسة التأثير الصادي للسلالات الجرثومية المعزولة من التربة في نمو الفطريات

المنتجة للسموم، واختبار قدرتها على تفكيك الأفلاتوكسينات

أطروحة مقدمة لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة النباتية (اختصاص الأحياء الدقيقة)

إعداد الباحثة

صابرين زاهر محفوظ

إشراف

الدكتور عبد السميع هنانو

مدير بحوث

هيئة الطاقة الذرية السورية

الدكتور محمد بشير عرنوس

أستاذ مساعد

كلية العلوم - جامعة دمشق

إقرار لجنة الحكم

نشهد نحن أعضاء لجنة الحكم إننا قد اطلعنا على أطروحة الدكتوراه المحكمة بتاريخ 20-11-2025، للباحثة صابرين زاهر محفوظ، والتي تحمل عنوان:

"دراسة التأثير الصادي للسلاسل الجرثومية المعزولة من التربة في نمو الفطريات المنتجة

للسموم واختبار مقدرتها على تفكيك الأفلاتوكسينات"

**Studying the antibiotic effect of bacterial strains isolated from the soil
on the growth of toxin-producing fungi and testing their ability to
degrade aflatoxins**

وناقشنا الطالبة في محتوياتها، وفيما يتعلق بها، ونرى أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الدكتوراه في علم الحياة النباتية (اختصاص الأحياء الدقيقة).

أ.م.د. محمد بشير عرنوس

أ.م.د. لبنى مقراني

أ.د. أنطونيوس الداود

د. عبد الواحد الطحلي

أ.م.د. سندس ياسين

شكر وثناء

الحمد لله رب العالمين الذي أنعم فأكرم، وأتم السعي وفصل، من كان نور قلبي ودليل درب حياتي.
 إلى من كانت رسالته تحت على العلم وطلبه نبينا الكريم محمد صلى الله عليه وسلم.
 أتقدم بخالص الامتنان إلى أساتذتي المشرفين: الدكتور محمد بشير عرنوس، الدكتور عبد السميع هنانو
 لفضلهم في إنجاز البحث، وحثي وإرشادي، وتقويم العمل لتقديمه على أتم وجه.
 إلى السادة أعضاء لجنة التحكيم:
 د. محمد بشير عرنوس، د. لبنى مقراني، د. أنطونيوس الداود، د. عبد الواحد الطحلي، د. سندس ياسين
 كل الشكر على إغنائهم البحث بملاحظاتهم القيمة
 الشكر موصول إلى رئاسة جامعة دمشق وعمادة كلية العلوم، إلى أسرة قسم علم الحياة النباتية، وإلى أساتذتنا
 الأفاضل في كلية العلوم جميعهم
 الشكر إلى هيئة الطاقة الذرية السورية، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية
 وإلى الزملاء الأعزاء في دائرة الكيمياء الحيوية والسميات
 إلى من أهدتني الحياة إياهم أخوتي في رحلة الدراسات العليا من لم يتاونوا على تقديم أي دعم أو مساعدة، من كان
 الدرب بصحبته أجمل
 أهدي عملي إلى معلمي وملهمي الأول، من كان وصيته دوماً لي بأن أنظر إلى الحياة بمنظار نحلة، من شد عزمي
 وزاد إصراري لمزيد من السعي في نيل العلم والدي الغالي زاهر محفوظ شكر الله جهدي
 أُمي الغالية، أخوات قلبي نور وسلام كلي امتنان لدعواتكم الطيبة ودعمكم ومساندكم لي
 إلى أسرتي الصغيرة شريك حياتي وصغيرتي سماء روعي.. أشكر دعمكم وصبركم
 كما أتقدم بخالص التقدير لكل صاحب أثر طيب في حياتي، لكل كلمة مشجعة، أو نصيحة، أو دعوة صالحة.
 على أبواب نيل شهادة الدكتوراه أنظر بابتسامة إلى الخطوات التي قطعتها، إلى الأيام الطويلة التي تطلبت
 جهداً وصبراً، إلى التحديات التي كابدتها ودفعنتي للمضي قدماً. وفي الختام أسأل الله جل جلاله القبول
 وجعل هذا العلم خالصاً لوجهه الكريم، نافعاً لكل من يقرأه.

فهرس المحتويات

الصفحة	الموضوع
1	الملخص Abstract
3	المقدمة Introduction
4	مشكلة البحث Research Problem
4	تساؤلات البحث Research Questions
5	فرضيات البحث Research Hypotheses
5	مسلمات البحث Basic Research Assumptions
5	أهمية البحث Research Importance
6	أهداف البحث Research Objectives
6	مبررات البحث Research Justifications
7	محدوديات البحث Research Limitations
8	الفصل الأول: الدراسة المرجعية Literature Review
9	1-1- ميكروبيولوجيا التربة
10	1-2- السموم الفطرية
11	1-3- الأفلاتوكسينات
12	1-4- توصيف الأفلاتوكسينات والكشف عنها
13	1-5- انتشار الأفلاتوكسينات
15	1-6- إفراز الأفلاتوكسينات
18	1-7- سمية الأفلاتوكسينات
19	1-8- معالجة الأفلاتوكسينات
20	1-9- المعالجة الحيوية
21	1-9-1 دور الإنزيمات الجرثومية في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين
24	دراسات سابقة حول الأجناس الجرثومية المثبت دورها الحيوي في تثبيط الفطر السام والتفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1

29	الفصل الثاني: المواد والطرائق Materials and Methods
30	2-1- جمع عينات التربة
31	2-2- تحليل عينات الترب (قياس درجة الحموضة pH، ومحتوى المادة العضوية)
31	2-3- عزل جراثيم التربة
32	2-4- زراعة فطر <i>Aspergillus flavus</i> واختبار مقدرته على إنتاج الأفلاتوكسين B1
34	2-5- دراسة تأثير فطر <i>A. flavus</i> في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة
35	2-6- عزل الجراثيم المتعايشة في التربة المعاملة بالأفلاتوكسين B1
35	2-7- اختبار الفاعلية الجرثومية المضادة لفطر <i>Aspergillus flavus</i> حيوياً
36	2-8- دراسة التأثير الجرثومي في إفراز فطر <i>Aspergillus flavus</i> للأفلاتوكسين B1
37	2-9- دراسة المقدرة الحيوية لجراثيم التربة على تفكيك الأفلاتوكسين B1
39	2-10- التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية اعتماداً على سلسلة المورثة 16S rRNA
39	2-10-1- استخلاص DNA
41	2-10-2- قياس تركيز DNA وتقدير نقاوته
41	2-10-3- تضخيم المورثة 16S rRNA باستعمال التفاعل التسلسلي للبوليميراز PCR
42	2-10-4- الرحلان الكهربائي
43	2-10-5- قراءة تسلسل المورثة 16S rRNA لتحديد هوية الجراثيم
44	2-11- التوصيف المجهرى، والشكلي (المورفولوجي) للسلاسل الجرثومية المختبرة
44	2-12- توصيف الخصائص الحيوية الكيميائية للسلاسل الجرثومية المختبرة
45	2-13- اختبار النشاط الإنزيمي للسلاسل الجرثومية المفككة للأفلاتوكسين B1
46	2-14- دراسة التعبير المورثي عن المورثات المسؤولة عن آلية تفكيك الأفلاتوكسين B1
47	2-14-1- استخلاص RNA
47	2-14-2- قياس تركيز RNA وتقدير نقاوته
48	2-14-3- النسخ العكسي الـ RNA وتركيب الدنا المتمم cDNA
48	2-14-4- تقدير التعبير المورثي باستعمال تقانة RT-qPCR
50	2-15- معايرة البروتينات الكلية في الخلايا الجرثومية المعاملة بالأفلاتوكسين B1 وفصلها بطريقة الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE

54	2-16- تقييم المقدرة الجرثومية في الحفظ الحيوي للغذاء بشروط المختبر
56	الدراسة الإحصائية
57	الفصل الثالث: النتائج والمناقشة Results and Discussion
58	3-1- تحليل عينات التربة
58	3-1-1- درجة الحموضة pH
58	3-1-2- محتوى المادة العضوية
59	3-2- إفراز فطر <i>Aspergillus flavus</i> للأفلاتوكسين B1
61	3-3- دراسة تأثير فطر <i>A. flavus</i> في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة
64	3-4- اختبار التثبيط الحيوي لفطر <i>A. flavus</i> ومقدرة الجراثيم على الحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1
67	3-5- المقدرة الجرثومية على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1
68	3-6- التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية التي أبدت أعلى كفاءة في الفاعلية التضادية والتفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1
69	3-7- الكشف الدقيق عن مقدرة السلالات الجرثومية المنتخبة على تفكيك الأفلاتوكسين B1
72	3-8- التوصيف المجهرى والشكلي (المورفولوجي) للسلالات الجرثومية عالية الكفاءة في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين
78	3-9- النشاط الإنزيمي عند السلالات الجرثومية المدروسة
80	3-10- دراسة التعبير المورثي عن المورثات المسؤولة عن آلية تفكيك الأفلاتوكسين B1
82	3-11- الكشف عن البروتينات الكلية عند جراثيم <i>Bacillus licheniformis</i> المعاملة بالأفلاتوكسين B1
84	3-12- تقييم المقدرة الجرثومية في الحفظ الحيوي للغذاء بشروط المختبر
86	الفصل الرابع: الاستنتاجات العامة والتوصيات General Conclusions and Recommendations
87	الاستنتاجات
89	التوصيات
90	الأبحاث المنشورة
91	المراجع References
101	ملحق

106	ملخص الدراسة باللغة الانكليزية Abstract
-----	---

قائمة الجداول

الرقم	عنوان الجدول	الصفحة
1	التصنيف العلمي لفطر <i>Aspergillus flavus</i> .	15
2	مواقع جمع عينات التربة.	30
3	تركيب وسط MSM.	32
4	تركيب وسط PBS	37
5	تسلسل البادئات المستعملة لتفاعل PCR.	42
6	تحضير دائرة الرحلان TAE (50 x).	43
7	تسلسل البادئات المستعملة في الكشف الجزيئي باستعمال RT-qPCR.	49
8	تراكم وأحجام المواد الكيميائية المستعملة في تفاعل RT-qPCR.	49
9	المواد المستعملة في الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلام SDS-PAGE	52
10	مكونات هلام الفصل 15%، وهلام التجميع 5%	53
11	العزلات الجرثومية التي أثبتت فاعلية تضادية ضد الفطر وتمكنت من تثبيط إفرازه للسم B1	65
12	نتائج التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية	69
13	نتائج التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1	69
14	نتائج توصيف السلاسل الجرثومية مجهرياً ومورفولوجياً وأهم خصائصها الحيوية	73
15	نتائج اختبار النشاط الإنزيمي عند السلاسل الجرثومية المدروسة	79

قائمة الأشكال

الرقم	عنوان الشكل	الصفحة
1	البنية الكيميائية لمركبات الأفلاتوكسين	11
2	نواتج استقلاب الأفلاتوكسين B1 المركبين: (M1,M2)	12
3	رسم تخطيطي لمسار الاصطناع الحيوي للأفلاتوكسينات، يوضح المورثات والإنزيمات المرمزة لها ونواتج التفاعل.	17
4	مخطط يوضح الآلية الحيوية للمعالجة الحيوية للسموم الفطرية إما من خلال التفكيك بواسطة إنزيمات خارج خلوية، أو الارتباط بالسطح الخلوي، أو الاستقلاب الخلوي.	20
5	مخطط يوضح الآلية الإنزيمية لتفكيك مركب الأفلاتوكسين، وتحويله إلى مستقلبات غير سامة	21
6	طريقة الزراعة المزدوجة لاختبار التضادية الجرثومية ضد الفطر المدروس، تظهر المستعمرات الجرثومية في النقاط الأربعة حول المركز المغروس بمنصفه قرص ترشيح ملقح بالمعلق البوغي.	36
7	جهاز TLC المُستعمل لتقدير تركيز الأفلاتوكسين B1	39
8	قياس تركيز عينة DNA بواسطة جهاز nanodrop	41
9	برنامج عمل جهاز PCR.	42
10	برنامج عمل جهاز RT-PCR	50
11	نتائج تحليل درجة حموضة عينات التربة، ومحتواها الكلي من المادة العضوية%	59
12	إفراز فطر <i>A. flavus</i> للأفلاتوكسين B1 في أوساط متنوعة.	60
13	تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة A1,A2,A3	62
14	تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة B1,B2,B3	62
15	تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة S1,S2,S3	63
16	تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة M1,M2,M3	63
17	نتائج اختبار التضادية الحيوية لعزلات جرثومية مقارنة مع مستعمرة الفطر الشاهد	65
18	صورة تمثيلية توضح تباين نتائج المقدرة الحيوية للعزلات الجرثومية على تفكيك الأفلاتوكسين B1	68
19	نتيجة التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين والفرق بين التركيز الأولي له والتركيز النهائي في نهاية التجربة	70
20	نمو السلاسل الجرثومية المدروسة على وسط LB	74
21	السلاسل الجرثومية المدروسة تحت المجهر الضوئي باستعمال العدسة الغاطسة 100×	75
22	نتائج اختبار الحركة للسلاسل الجرثومية الأربع يوضح القدرة على الحركة لدى السلاسل المدروسة جميعها	75
23	نتائج اختبار حل النشاء، جميع السلاسل الجرثومية إيجابية الأميلاز، حالة للنشاء	76
24	نمو السلاسل الجرثومية المدروسة على وسط الآغار الدمى Blood agar.	76

25	اختبار تحمل الملوحة، يوضح نمو السلاسل الجرثومية المدروسة على وسط MYP	77
26	اختبار الستراز : A. نتيجة إيجابية للسلسلة A2b2 يظهر تحول لون الوسط للأزرق، نتيجة سلبية للسلسلة S2a1	77
27	نمو النوع الجرثومي <i>Delftia acidovorans</i> (A. على وسط MacConkey agar، B. على وسط EMB).	77
28	نتائج اختبار الكاتالاز للسلاسل الجرثومية، تتضح الفاعلية الإيجابية لكل السلاسل من تشكل الفقاعات الغازية الناتجة عن تفكك الماء الأوكسجيني بواسطة إنزيم الكاتالاز المفرز بواسطة الجراثيم.	79
29	نتائج اختبار الأوكسيداز للسلاسل الجرثومية، يبين إيجابية التفاعل لكل من الأنواع المدروسة من خلال ظهور اللون الأزرق البنفسجي	80
30	التعبير المورثي للمورثتين 16S rRNA•CotA في جينوم السلسلة الجرثومية <i>B. licheniformis</i> S2b6	81
31	مستويات النسخ للمورثة CotA عند جراثيم <i>Bacillus licheniformis</i> السلسلة S2b6 بعد الحضان مع مركب الأفلاتوكسين B1	81
32	نتائج ترحيل البروتينات الكلية للسلسلة الجرثومية <i>B. licheniformis</i> S2b6 على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE قبل وبعد المعاملة بالأفلاتوكسين B1.	82
33	نتيجة الحفظ الحيوي للرز بشروط المختبر	85

جدول المصطلحات والاختصارات

الاختصار	المقابل باللغة الإنكليزية	المقابل باللغة العربية
AFB1	Aflatoxin B1	الأفلاتوكسين B1 (أحد أشكال مركبات الأفلاتوكسينات)
TLC	Thin Layer Chromatography	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
MSM	Mineral salt medium	وسط أملاح معدنية
PBS	Phosphate-buffered saline	دارئة ملحية فوسفاتية
gDNA	Genomic DNA	الدنا الجينومي
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	طريقة المقايضة المناعية الإنزيمية
HCC	hepatocellular carcinoma	سرطان الخلايا الكبدية
LAB	Lactic Acid Bacteria	جراثيم حمض اللبن
RT-qPCR	Real time-Quantitative PCR	التفاعل التسلسلي للبولىميراز الكمي في الزمن الحقيقي
CotA	Cobalt Thermostable A protein	البروتين A المستقر حرارياً والمرتبط بالكوبالت
IARC	International Agency For Research	الوكالة الدولية لأبحاث السرطان
NCBI	National Center For Biotechnology Information	المركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية
CAPs	Good agricultural practices	الممارسات الزراعية الجيدة

الملخص

يُصنف مركب الأفلاتوكسين B1 ضمن السموم الفطرية الأكثر خطورة والأشد سمية؛ يُفرز بواسطة العديد من الأجناس الفطرية؛ أغزرها إفرازاً فطر *Aspergillus flavus*. تُهدد سموم الأفلاتوكسينات الأمن الغذائي العالمي لتسببها في تلف المحاصيل الزراعية الاستراتيجية المُعرضة للغزو الفطري، كما ثبت دورها في تطور خلايا السرطان الكبدية عند البشر والحيوانات. يستمد الأفلاتوكسين B1 خطورته من مقاومته لعمليات المعالجة والتفكيك؛ يُعزى ذلك لثباتية هيكله الكيميائي. نظراً للدور الحيوي الفعّال الذي تؤديه جراثيم التربة في معالجة أنواع مختلفة من السموم البيئية والملوثات العضوية هدف البحث إلى عزل سلالات جرثومية وتقييم مقدرتها الحيوية في التثبيط الحيوي لفطر *A. flavus* وكبح إفرازه لسمومه، واختبار مقدرتها على التفكيك الحيوي لأشد الأفلاتوكسينات سمية AFB1 بشروط المختبر، والتوصيف الجزيئي لمسار التفكيك عند الجراثيم المُثبت كفاءتها.

جُمع لهذا الهدف اثنتا عشرة عينة تربة محلية، وعُزلت منها الجراثيم بغية اختبار التضادية الحيوية ضد فطر *A. flavus* السلالة NRRL 3357، انتُقيت العزلات الجرثومية التي أبدت تفوقاً في تثبيط نمو الفطر السام وكبح تبوغه والحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1 من جهة، وتمكنت من استقلاب الأفلاتوكسين B1 من جهة أخرى، ووصّفت جزيئياً باستعمال تقانة سَلْسِلَة المورثة 16S rRNA.

حُدّدت هوية العزلات الجرثومية المتفوقة بمقدرتها الحيوية المُختبرة كالاتي: *Delftia acidovorans* السلالة A2b2 ، *Bacillus licheniformis* السلالة B1a2 ، *Bacillus subtilis* السلالة S2a1 ، *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 ، *Bacillus anthracis* السلالة S1A. تم تقدير التفكيك الحيوي المتناقص تدريجياً بدقة بواسطة تقانة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC ، انبثق عن البحث نتائج واعدة إذ تفوقت سلالتان جرثوميتان تابعتان لجنس *Bacillus* (*Bacillus subtilis* ، *Bacillus licheniformis*) بمقدرة فريدة على استقلاب السم الفطري وتفكيكه بنسبة

عالية قُدرت بنحو 94.85%، 92.55% على الترتيب. اختُبرت فاعلية النشاط الإنزيمي عن طريق اختبارات حيوية كيميائية؛ بهدف تفسير المقدرة على تفكيك السم. بينت النتائج نشاطاً إنزيمياً عالياً ومتنوعاً ميز السلاسل الجرثومية المُثبت كفاءتها. كما تم تتبع الآلية الجزيئية لمسار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين عن طريق الكشف عن بروتينات الخلايا الجرثومية المُستخلصة بعد معاملتها بالسم ومقارنتها بالملف البروتيني للشاهد قبل المعاملة، إلى جانب تقدير التغيرات الكمية في التعبير المورثي للمورثة CotA والتي تُعد أهم المورثات المُثبت مرجعياً دورها الحيوي في تفكيك الأفلاتوكسين. تترك نتائج البحث تطلعاً مستقبلياً لاستثمار المقدرة الحيوية للسلاسل الجرثومية في عمليات الوقاية والمعالجة الحيوية.

الكلمات المفتاحية:

جراثيم التربة، فطر *Aspergillus flavus*، الأفلاتوكسين B1، الفاعلية المضادة للفطريات، التفكيك الحيوي، النشاط

الإنزيمي، المورثة 16S rRNA، المورثة CotA.

المقدمة Introduction

تعد التربة مكوناً بيئياً أساسياً، وتُشكل حجر الأساس للسلاسل الغذائية؛ فهي مصدرٌ للحياة على الأرض، كما تقوم بدور أساسي في ترشيح المياه. تمثل التربة مهذاً لنظام بيئي متنوعٍ إذ تُعد موئلاً لمليارات من الكائنات الحية الدقيقة. عندما تكون التربة خالية من الملوثات وغنية بالمواد العضوية، تؤثر إيجابياً في حياة الكائنات الحية؛ حيث تكون غنية بالأحياء الدقيقة المفيدة للصناعات الطبية الصيدلانية إذ يُعتمد عليها في استخلاص المضادات الحيوية الأساسية لمكافحة الأمراض، كما تُوفّر المغذيات اللازمة لنمو المحاصيل، ويميز عملها أن دورتها المُستدامة قد تتجدد لعقود. فضلاً عن ذلك تُساعد التربة الخالية من الملوثات على التخفيف من آثار تغير المناخ من خلال عملها كمخزناً لكميات هائلة من ثنائي أكسيد الكربون وغيره من الغازات الدفيئة التي تساهم في ظاهرة البيت الزجاجي. وهي بذلك ثاني أكبر مصرف للكربون بعد المحيط، حيث تحتجز غاز ثنائي أكسيد الكربون أكثر من الغابات، وتحتفظ بثلاثة أضعاف الكربون الذي يحتفظ به الغلاف الجوي للأرض.

تعد الأحياء الدقيقة أساساً لكل أشكال الحياة على الأرض، تتنوع في شكلها ووظائفها، وتبنيان في بيئتها الحاضنة لها؛ مستوطنة للترب بغزارة حيث تقوم بمهام عديدة وجوهرية في البيئة من بينها: تحسين خصوبة التربة والذي ينعكس بدوره على جودة نمو المحاصيل، إضافة إلى ضبط التغيرات الدورية للعناصر المختلفة كالكربون والأزوت والكبريت والفوسفور، كما تقوم بدورٍ محوري في معالجة التلوث وتفكيك المواد السامة، إذ تتعدد مصادر تلوث التربة من ملوثات عضوية معقدة مقاومة للتفكك، مما ينعكس سلباً على المقدرة الإنتاجية للتربة، جاعلاً إياها عاملاً لنقل التلوث، وهنا يبرز الدور الفعال الذي يميز أنواعاً من الأحياء الدقيقة لاسيما جراثيم التربة في معالجة أشكالٍ معقدة من الملوثات البيئية وتحويلها إلى مواد أقل ضرراً وخطورة أو تفكيكها كلياً والاستفادة منها كمصدر للطاقة والكربون.

من السموم البيئية حيوية المنشأ "السموم الفطرية Mycotoxins" التي تُفرز بواسطة بعض الأجناس الفطرية مسببة تلفاً في المحاصيل الزراعية المُصابة، وفساداً في الغذاء والعلف، مما يهدد الأمن الغذائي العالمي، ويتسبب في

تدهور صحة الكائنات الحية المستهلكة مخلفاً آثار سمية جسيمة. من بين زمر السموم الفطرية يعد الأفلاتوكسين B1 الأكثر انتشاراً في الغذاء والأشد سمية؛ كما تؤكد الدراسات على تأثيره المسرطن.

ولتحديد هوية الأنواع الجرثومية المتميزة في قدرتها الحيوية على نزع سمية هذه الملوثات يُعتمد التوصيف الجزيئي باستعمال تقنية تحليل التتالي النكليوتيدي للمورثة 16s rRNA، وفهم الآلية الدقيقة لمسار التفكيك الحيوي يتم اللجوء إلى إجراء اختبارات حيوية كيميائية لتقييم النشاط الإنزيمي، والكشف الجزيئي عن المورثات المسؤولة عن الترميز للبروتينات الفعالة في استقلاب السموم معقدة التركيب الكيميائي والمقاومة للتفكك.

مشكلة البحث The research problem:

تمثل مشكلة التسمم بالأفلاتوكسينات خطراً حقيقياً على الأمن الغذائي، وتهديداً للصحة العامة. لذلك برزت مساعٍ لإيجاد طرائق لكبح نمو أهم الفطريات المفترزة لها، والحد من قدرته على إفرازها، ونظراً للمقدرة الحيوية التي تميز بعض الأجناس الجرثومية في تثبيط الفطريات السامة والتعامل مع مستقلباتها الثانوية وتفكيكها إلى مركبات أقل سمية والاستفادة منها كمصدرٍ للطاقة اللازمة لنموها، كان لابد من تسليط الضوء على جراثيم ترب المحاصيل الزراعية المعرضة للإصابة الفطرية، والبحث الدقيق عن دورها في السيطرة على فطر *Aspergillus flavus*، واختبار مقدراتها الكامنة في التفكيك الحيوي لأخطر هذه المركبات الأفلاتوكسين B1، والتحري عن الآلية التي تمكنها وظيفياً من التعامل مع السم.

تساؤلات البحث Research questions:

في هذا السياق يبرز تساؤل علمي محوري حول إمكانية عزل سلالات جرثومية لها المقدرة على مقاومة الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين. وتفكيك الأفلاتوكسين B1 الذي يعد من أشد السموم الفطرية خطورة. وانطلاقاً من ذلك فإن البحث يطرح هذه التساؤلات:

- ما هي هوية العزلات الجرثومية القادرة على تثبيط نمو فطر *Aspergillus flavus*؟

- هل ستتمكن من كبح إفرازه لسم الأفلاتوكسين B1؟
- هل تمتلك المقدرة على النمو باستعمال الأفلاتوكسين B1 كمصدر وحيد للكربون والطاقة؟
- وفي حال تحققت القدرة على استقلابه؛ ماهي الآلية الحيوية التي تمكنها من ذلك؟

فرضيات البحث :Research Hypotheses:

يفترض البحث ما يلي:

- التربة غنية بسلاسل جرثومية ذات خصائص حيوية فعالة في مكافحة العوامل الممرضة أهمها الفطريات المنتجة للسموم.
- بعض سلاسل فطر *Aspergillus flavus* مفرز للسموم، أخطرها الأفلاتوكسين B1.
- تمتلك بعض السلاسل الجرثومية المقدرة على تفكيك الملوثات البيئية والسموم ذات البنية الكيميائية معقدة التركيب، والمقاومة لعمليات المعالجة.

مسلمات البحث :Basic Research Assumptions:

- تُعد التربة موئلاً هاماً للأحياء الدقيقة لاسيما الجراثيم.
- تمتلك سلاسل جرثومية المقدرة على السيطرة الحيوية على الفطريات السامة وتحد من إفرازها للسموم.
- تفرز بعض الأنواع الجرثومية إنزيمات لها دور مهم في التفكيك الحيوي للسموم الفطرية.

أهمية البحث :Research importance:

نظراً إلى التهديد البالغ الذي تمثله سموم الأفلاتوكسينات؛ لاسيما الأفلاتوكسين B1 ، بسبب ثباتيته العالية وارتباطه المباشر بتطور السرطان الكبدي في الإنسان والحيوان. وفي ظل محدودية الفاعلية للوسائل الكيميائية والفيزيائية التقليدية في تفكيك هذه السموم دون الإضرار بالقيمة الغذائية للمنتجات المعرضة للتلوث بها، تبرز الحاجة إلى حلول حيوية فعالة وآمنة. ومن هنا، يكتسب البحث الحالي أهميته لكونه يستكشف القدرة الحيوية لسلاسل جرثومية معزولة

من ترب محلية في تثبيط نمو فطر *Aspergillus flavus* وتقويض إنتاجه للسم، إضافة إلى قدرتها على تفكيك الأفلاتوكسين B1 بشكل فعال. حيث إن تتبع المسارات الجزيئية لهذه العمليات يفتح آفاقاً لتطوير استراتيجيات حيوية تطبيقية في الوقاية والمعالجة، مما يسهم في تحسين سلامة الأغذية والحد من مخاطر السموم الفطرية بطرائق صديقة للبيئة، وأقل تكلفة اقتصادياً.

أهداف البحث :Research objectives:

1. عزل سلالات جرثومية من عينات تربة محلية اعتماداً على مقدرتها التضادية ضد فطر *Aspergillus*

flavus.

2. اختبار الفاعلية الجرثومية التضادية حيويًا وكيميائيًا.

3. دراسة المقدرة الحيوية للسلالات الجرثومية على تفكيك أشد الأفلاتوكسينات سمية B1 بشروط المختبر.

4. التوصيف الجزيئي والوظيفي للسلالات الجرثومية إيجابية التضادية الحيوية.

5. التوصيف الجزيئي لآلية التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1.

6. تقييم الفاعلية الجرثومية في حماية عينة غذائية من الإصابة الفطرية بشروط المختبر.

مبررات البحث :Research rationale:

نظراً إلى التنوع الميكروبي الهائل في الترب وغناها بأحياء دقيقة تمتاز بخصائص حيوية فريدة أهمها المقدرة على تفكيك السموم والمركبات العضوية المعقدة، كما أن جراثيم التربة تتسم بدور حيوي فعال في استقلاب أنواع مختلفة من السموم البيئية، لذلك تتوجه الأبحاث العلمية الحديثة إلى استثمار هذه المقدرة في عملية المكافحة الحيوية للفطريات السامة، مما جعلنا نتوجه في هذه الدراسة إلى البحث عن سلالات جرثومية معزولة من الترب السورية وتقييم كفاءتها في تحقيق هدف البحث.

محدوديات البحث :Research Limitations

شملت الدراسة العزلات الجرثومية المنتجة للمضادات الفطرية بهدف دراسة مقدرتها على تثبيط نمو واحد من الفطريات المعروفة بغزارتها لإفرازها للسموم وهو فطر *Aspergillus flavus*، وتقييم كفاءة التفكيك الحيوي للمركب الأشد سمية والأكثر تعقيداً في بنيته الكيميائية "الأفلاتوكسين B1"، حيث اعتمد تركيز محدد 20 نانوغرام/ميكرو لتر. كما تم اختبار كفاءة التفكيك الحيوي بظروف محددة من درجة حرارة ودرجة حموضة، واعتمد على تقانة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography لتقدير التراكيز المتناقصة أسبوعياً.

إن توفر تقنيات تحليل أكثر دقة يمكننا من تحليل المركبات الناتجة عن عملية التفكيك الحيوي؛ مما يعطي نظرة أكثر شمولية. لفهم الآلية الدقيقة لمسار التفكيك الحيوي للمركب نحتاج لدراسة جزيئية للمورثات المسؤولة مرجعياً عن استقلابه، في بحثنا المقدم درس التعبير المورثي لواحدة من المورثات وهي المورثة CotA.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Literature Review

1-1 - ميكروبيولوجيا التربة Soil microbiology:

تُمثل التربة جزءاً أساسياً من العناصر البيئية، لتأثيرها في حياة الكائنات الحية، إضافة إلى دورها في ضبط تدفق الماء والمواد الكيميائية بين الغلاف الجوي والأرض، كما تُعد مخزناً للغازات كالأكسجين وغاز ثنائي أكسيد الكربون وغيرها، فضلاً عن دورها في احتباس الماء وتخزينه بعد تنقيته بوساطة المادة العضوية الموجودة في التربة (Lal, et al., 2021, Gerke, 2022).

تعد التربة موئلاً لمليارات الكائنات الحية الدقيقة التي تتفرد بمقدرات هائلة تمكنها من التعامل مع ملوثات معدنة وسموماً بيئية فضلاً عن تعايشها في ظروف متباينة وقدرتها على إيجاد سبل للتكيف مع الشروط البيئية القاسية (Bhattarai, et al., 2015, Balasubramanian, 2017).

تؤثر الأحياء الدقيقة في جودة المحاصيل الزراعية عن طريق تدخلها في زيادة خصوبة التربة، ودورها في حماية النباتات من العوامل الممرضة (Hayat, et al., 2010, Younas, et al., 2022). كما تتحكم جراثيم التربة في دورات العناصر المختلفة كالكربون والأزوت والكبريت والفوسفور وتقوم بضبط تغيراتها الدورية، كما تسهم في تفكيك مركباتها العضوية المعقدة (Bhattarai, et al., 2015, Kumar et al., 2021).

لهذه الكائنات ذات البنية المجهرية؛ دورٌ محوريٌّ في تثبيت جزيئات التربة الرملية والطينية وتجميعها في كتل دقيقة ثابتة مما يحسن بنية التربة الفراغية بوساطة المواد التي تُفرزها من سكريات متعددة وبروتينات سكرية تُغلف أسطح جزيئات التربة (Javed, et al., 2022).

لا يتوقف تأثير ميكروبات التربة لاسيما الجراثيم على مستوى بنية التربة وخصوبتها؛ إنما يمتد تأثيرها في حماية التربة وعلاجها من التلوث الناجم عن أي تغيير فيزيائي أو كيميائي في خصائصها مسبباً لخفض خصوبتها ومقدرتها الإنتاجية (Xiang, et al., 2022). إذ تمتلك هذه الكائنات آلية فعّالة في تفكيك الملوثات وتحويلها إلى مواد أقل ضرراً وخطورة بما يُعرف بعملية إزالة السمية detoxification، وبالتالي يُمكن الاستفادة من النواتج بوساطة متعضيات أخرى (Devi, et al., 2021, Fouad, et al., 2022). لذا تُعد جراثيم التربة أداة حاسمة عند الحديث عن

حلول لمشكلات التلوث البيئي، ويُعزى ذلك لسهولة تكاثرها السريع ومرونتها في العيش وتكيفها مع بيئات متعددة، وتطويرها لوسائل تمكنها من تحمل الظروف القاسية، وجاهزية إنزيمية تجعلها تتفرد بمقدرات استقلابية عالية لسموم وملوثات معدة مقاومة لعمليات التفكك والمعالجة.

تتنوع السموم البيئية وتتباين في خطورتها وتأثيراتها السمية وتتعدد مصادرها، وتتفاوت في ثباتيتها ومقاومتها للتفكك ومن بين السموم البيئية التي استحوذت على اهتمام الباحثين في مجال علم الأحياء الدقيقة "السموم الفطرية Mycotoxins".

1-2- السموم الفطرية Mycotoxins:

تُعرف بأنها سموم حيوية المنشأ، تُفرزها أجناس فطرية متعددة، تُصنف ضمن المستقلبات الثانوية secondary metabolites، تنمو الأعفان السامة بظروف مناسبة من الحرارة والرطوبة مسببة تلوثاً في مجموعة متنوعة من المحاصيل الزراعية والأعلاف الحيوانية (Khodaei, et al., 2021, Khan, et al., 2024)؛ مما ينجم عنه تأثيرات صحية جسيمة عند البشر وحيوانات المزارع والماشية والتي تتراوح بين أعراض التسمم الحاد إلى آثار طويلة المدى مثل نقص المناعة والسرطانات المختلفة (Furian, et al., 2022).

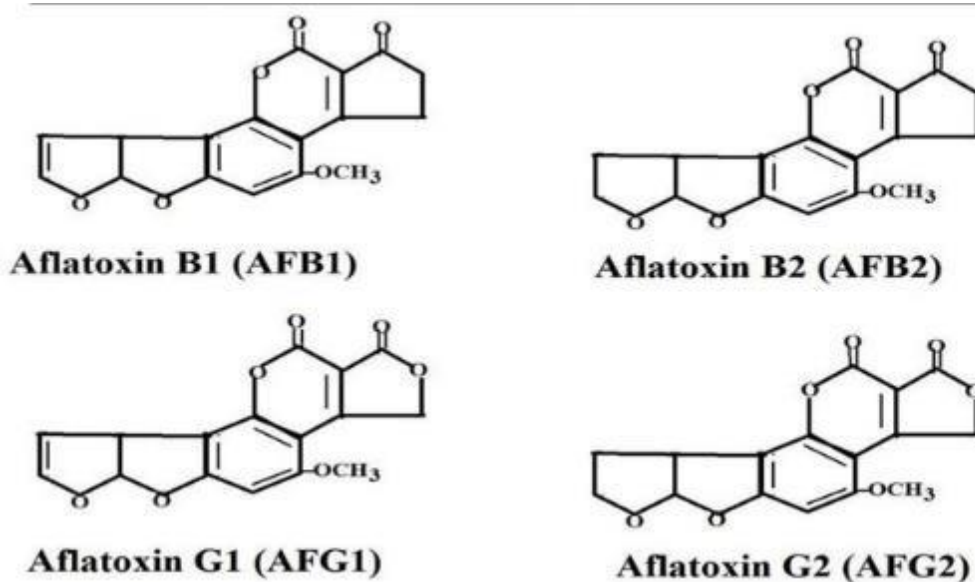
يُقدر عدد الفطريات المفزة للسموم بأكثر من 200 نوع، لكن أغزرها إفرازاً *Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Alternaria, Claviceps* (Eltariki, et al., 2018).

هناك مئات عدة من زمر السموم الفطرية المختلفة والمكتشفة حتى الآن؛ لكن من بين هذه السموم استحوذت ست زمر سمية على أكبر قدر من الاهتمام والدراسة نظراً إلى أثارها شديدة السمية وطويلة الأمد، وتبعاً لاحتمالية تلوث الغذاء بأحد أنواعها، تشمل هذه المركبات: الأفلاتوكسينات Aflatoxins، الأوكراتوكسينات Ochratoxins، الباتولين Patulin، الفيومونسنات Fumonisin، الزيارالينون Zearalenone، التريكوثيسينات Trichothecenes، النيفالينول Nivalenol، الديوكسي نيفالينول Deoxynivalenol، مركبات T-2، HT-2 (Milićević, et al., 2016,)، (Alshannaq, et al., 2017, Khan, et al., 2024).

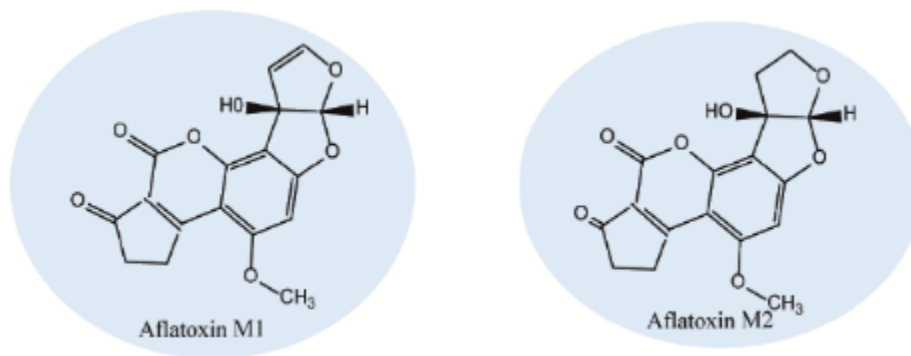
1-3- الأفلاتوكسينات :Aflatoxins

تُصنف كأحد زمر السموم الفطرية، تُفرز كمستقلبات ثانوية بواسطة فطريات عديدة؛ إلا أن النوعين *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus* الأكثر إفرازاً لمركبات الأفلاتوكسين، تشمل الأفلاتوكسينات أربعة سموم رئيسة وهي: G2, G1, B2, B1 (Mahato, et al., 2019) الشكل 1؛ والمركبين M2, M1 نواتج استقلاب المركب B1 المركب الأكثر انتشاراً والأشد في الأثر السمي الشكل 2.

يتألف الهيكل الكيميائي للأفلاتوكسينات من نواة كومارين مرتبطة بحلقة فوران ومجموعة لاكتون. وتختلف مجموعة B عن G من حيث نوع الحلقة المؤكسجة المرتبطة بالنواة: ففي المجموعة B توجد حلقة فوران خماسية، بينما في المجموعة G يتميز التركيب بوجود حلقة سداسية تحتوي على ذرة أكسجين إضافية (Guchi and Nutrition, 2015).



الشكل 1: البنية الكيميائية لمركبات الأفلاتوكسين (Chandra, 2021)



الشكل 2: نواتج استقلاب الأفلاتوكسين B1 المركبين: (M1,M2) (Nazhand, et al., 2020).

1-4- توصيف الأفلاتوكسينات والكشف عنها Characterization and detection of aflatoxins:

تُصنّف الأفلاتوكسينات ضمن المركبات المستقرة كيميائياً، حيث تقاوم عمليات معالجة الأغذية، يقاوم مركب الأفلاتوكسين B1 نطاق واسع من درجات الحرارة، ومن الجدير بالذكر مقاومته العالية لعمليات المعالجة الحرارية: كالطهي، والقلي، والخبز؛ حيث يحتفظ بفعاليته السمية حتى بعد عمليات المعالجة، مما يجعله من أكثر السموم الفطرية ثباتاً وخطورة في السلسلة الغذائية (Kumar, et al., 2017).

تعد مركبات الأفلاتوكسين ذات وزن جزيئي منخفض (El-Sayed, et al., 2022)، الوزن الجزيئي لمركب الأفلاتوكسين B1 يقدر بـ 312.27 غرام/مول، كما تتسم الأفلاتوكسينات بأنها مركبات صلبة عديمة الرائحة، وذات قابلية انحلال في المحاليل العضوية، وتمتاز بمقدرتها على التآلق تحت الأشعة فوق البنفسجية UV؛ مما يتيح الكشف عنها وتحليلها بطرائق التحليل الكروماتوغرافي (Nazhand, et al., 2020).

تتألق أفلاتوكسينات المجموعة B عند تعرضها للأشعة باللون الأزرق Blue، على عكس الأفلاتوكسينات المجموعة G التي تعكس وميضاً أخضراً Green، ومن اختلاف اللون عند التآلق، تمت التسمية بهذه الرموز (Kensler, et al., 2011).

تشمل طرائق الكشف عن الأفلاتوكسينات تقنيات الاستشراب (الكروماتوغرافيا) المختلفة منها:

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin Layer Chromatography؛ التي تمتاز بسهولة الاستعمال، والتكلفة الاقتصادية المنخفضة نسبياً مقارنة مع الطرائق الحديثة، كما تتيح تحليل مجموعة عينات على نفس الصفحة، مما يوفر الوقت، كما تساعد في الكشف المبدي عن وجود الأفلاتوكسينات، وإمكانية التقدير الكمي التقريبي بمقارنة شدة التآلق مع محاليل قياسية معلومة التركيز.

طريقة كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) High Performance Liquid Chromatography؛ ذات

الدقة العالية والقدرة على الفصل النوعي والكمي.

كما يمكن أن تُستخدم تقنيات الامتصاص المناعي؛ مثل طريقة المقايضة المناعية الإنزيمية - Enzyme-

(ELISA) linked immunosorbent assay ؛ نظراً إلى سهولتها وسرعتها في الكشف المبدي.

في السنوات الأخيرة، شهدت طرائق التحليل تطوراً باستعمال تقنيات متقدمة كالمطياف الكتلي المقترن

بالكروماتوغرافيا (LC-MS/MS) ، التي تتسم بحساسية وانتقائية فائقة (Yao, et al., 2015, Miklós, et al., 2020).

يعتمد الاختيار المناسب لطريقة التحليل والكشف عن الأفلاتوكسينات عموماً على نوع العينة، ومستوى الدقة

المطلوب، والإمكانات التقنية المتوفرة في المختبر.

5-1- انتشار الأفلاتوكسينات Aflatoxins spread:

تُصيب الفطريات السامة المفرزة للأفلاتوكسينات المنتجات الزراعية والأعلاف، ومن أهم النباتات والمحاصيل

التي تتعرض للتلوث بالأفلاتوكسينات:

- الحبوب: الرز والقمح والذرة والشعير والدخن.

- التوابل: كالفلل الأسود والفلل الأحمر.

- الفواكه المجففة: كالتين والتمر والزبيب.

- البذور الزيتية (بذور السمسم، وفول الصويا، ودوار الشمس، والقطن، والفول السوداني).
- المكسرات: كاللوز والجوز والفسق والكاجو.
- ثمار الكاكاو وجوز الهند.
- ومختلف منتجات الألبان (Kumar, et al., 2017, Benkerroum and health, 2019, Kumar, et al., 2021).
- كما يمكن أن يصيب الفطر المفرز للأفلاتوكسين منتجات تجارية مثل مستحضرات التجميل، زيت الطهي، وزبدة الفول السوداني (Nazhand, et al., 2020).
- يمكن أن يحدث التلوث بالأفلاتوكسينات في مراحل متعددة من سلسلة إنتاج وتخزين المحاصيل الزراعية. إذ تُعد مرحلة ما بعد الحصاد، أثناء التجفيف والتخزين من أكثر المراحل خطورة وعرضة لنمو الفطريات المنتجة للأفلاتوكسينات، لاسيما في البيئات الحارة والرطبة، عند توفر الظروف الملائمة لنمو الفطر المفرز للسم (Wild and Gong, 2010).
- بحسب إحصائيات منظمة الأغذية والزراعة (FAO) Food & Agriculture Organization؛ تشير أن 25% من المحاصيل الغذائية العالمية يمكن أن تُلوّث بالسموم الفطرية (Grain, 2016). ففي الفترة ما بين عام 2010-2020 تم تخفيض تصنيف 4.2% من القمح الغذائي بحسب معيار الجودة نتيجة للتلوث بالأفلاتوكسين، حيث نتج عن ذلك خسائر قدرت بنحو 2.5 مليار يورو (Latham, et al., 2023).
- وفقا لدراسة نشرت عام 2016 تأثرت صناعة الذرة في الولايات المتحدة بسبب التلوث بالأفلاتوكسين وقدرت الخسائر بما يتراوح بين 52.1 مليون دولار و 1.68 مليار دولار سنوياً (Mitchell, et al., 2016).
- كما تشير الإحصائيات العالمية؛ أن نحو 4.5 مليار شخص يعيشون في الدول النامية معرضون بشكل مزمن للأفلاتوكسينات من خلال الغذاء (Gong, et al., 2016).

1-6- إفراز الأفلاتوكسينات aflatoxins secretion:

يُعد فطر *Aspergillus flavus* من أكثر الأنواع الفطرية غزراً في إنتاج الأفلاتوكسينات؛ لاسيما الأفلاتوكسين B1. ينتمي هذا الفطر إلى شعبة الفطريات الزقية Ascomycota، يوضح الجدول 1 التصنيف العلمي للفطر. يتسم فطر *Aspergillus* بكونه أكثر الأجناس الفطرية انتشاراً في البيئات الزراعية والغذائية، وما يميزه تحمله للشروط البيئية القاسية من حرارة مرتفعة وجفاف. يضم هذا الجنس الفطري أنواعاً عديدة؛ أبرزها *A. flavus* الذي يتكاثر في البيئات الحارة والرطبة، ويصيب محاصيل استراتيجية مثل: الذرة والبقول السوداني والقمح والرز، مما ينجم عن ذلك تلوث غذائي مقاوم للمعالجة الصناعية، ويعيق بذلك عمليات التصدير ويتسبب بخسائر فادحة (Klich, 2007, Wild and Gong, 2010).

الجدول 1: التصنيف العلمي لفطر *Aspergillus flavus* (Samson, et al., 2014)

التصنيف العلمي:	
kingdom المملكة	Fungi
Phylum الشعبة	Ascomycota
Class الصف	Eurotiomycetes
Order الرتبة	Eurotiales
Family الفصيلة	Aspergillaceae
Genus الجنس	<i>Aspergillus</i>
Species النوع	<i>Aspergills flavus</i>

تؤثر مجموعة من العوامل البيئية في نمو فطر *A. flavus* وإنتاجه للأفلاتوكسين، وأبرز هذه العوامل درجة الحرارة؛ إذ يعد المجال الحراري بين 25-37 م° الأمثل لنمو الفطر، في حين أن إنتاج الأفلاتوكسين يبلغ ذروته عند

درجات حرارة معتدلة بين 28-30 م° (Medina, et al., 2017). كما تعد الرطوبة النسبية عاملاً حاسماً، إذ تعزز مستويات الرطوبة العالية؛ لاسيما فوق 85% نمو الفطر وتحفز المسار الاستقلابي لتشكيل الأفلاتوكسين. فعلى سبيل المثال؛ يمثل محتوى الرطوبة في الحبوب الذي يتجاوز 15% بيئة مثالية للنمو وحدوث التلوث الفطري (Gasperini, et al., 2025).

كما تؤدي درجة حموضة الوسط pH دوراً رئيساً في ضبط التوازن الإنزيمي في خلايا الفطر، إذ تُعد درجة الحموضة pH المثلى لإنتاج الأفلاتوكسين بين 5-6 (Bata-Vidács, et al., 2025).

كما تبين الدراسات تأثير عوامل أخرى كتركيز الأكسجين، وثنائي أكسيد الكربون، وتوفر بعض المعادن النادرة في تنشيط أو كبح عملية الاصطناع الحيوي للأفلاتوكسين. وتأثير الإجهاد البيئي كالتعرض للجفاف أو الإجهاد التأكسدي أو الإجهاد الغذائي في تحفيز إنتاج السم، كنوع من استجابة الفطر للتهديد البيئي، وإفراز مستويات أعلى من المستقلبات الثانوية كآلية دفاعية (Schmidt-Heydt, et al., 2009).

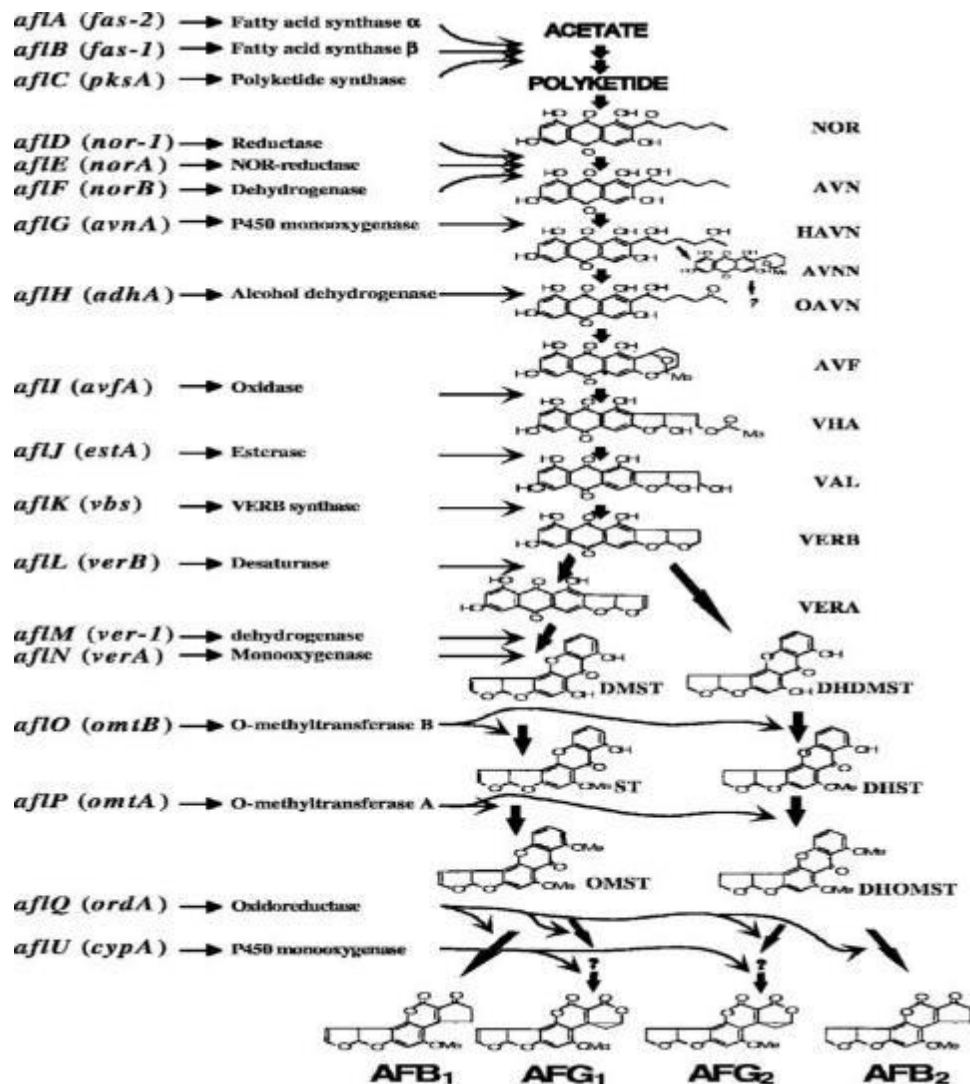
يُنتج فطر *Aspergillus flavus* الأفلاتوكسين B1 عبر مسار حيوي معقد يتكوّن مما لا يقل عن 27 تفاعلاً إنزيمياً، يبدأ بتحويل مركب "أسيتيل كوانزيم A" إلى مركبات وسطية، تُحوّل تدريجياً إلى المركب النهائي (Yu, et al., 2002, Yabe, et al., 2004).

يتم تنظيم هذا المسار (الشكل 3) عبر مجموعة من المورثات المجمعة ضمن كتلة واحدة تقع على صبغي واحد من بين الصبغيات الثمانية المكوّنة للمادة الوراثية للفطر، ويُقدّر هذه الكتلة بنحو 75 kb وتحتوي على نحو 30 مورثة تبدأ من aflA وتنتهي بالمورثة aflY (Yabe, et al., 2004, Caceres, et al., 2020).

تُعد المورثتان التنظيميتان aflR و aflS المفتاحين الرئيسيين في تنشيط هذا المسار، حيث تقوم المورثة aflR بترميز بروتين AFLR، وهو عامل نسخ يعمل على تحفيز التعبير عن المورثات البنيوية في المسار. ومن بين هذه المورثات البنيوية، تبرز المورثة omt A (تسمى أيضاً omt-1)، التي تشفّر إنزيماً مسؤولاً عن تحويل مركب sterigmatocystin

(ST) إلى مركب O-methyl sterigmatocystin (OMST) وهو المركب السابق مباشرة للأفلاتوكسين B1 في سلسلة

تركيبه (Kumar, *et al.*, 2017, Caceres, *et al.*, 2020).



الشكل 3: رسم تخطيطي لمسار الاصطناع الحيوي للأفلاتوكسينات، يُوضح المورثات والإنزيمات المرمزة لها ونواتج التفاعل (Guo, *et al.*, 2009)

1-7- سمية الأفلاتوكسينات Aflatoxins toxicity:

يُعد التسمم بالأفلاتوكسينات من التهديدات الخطيرة لصحة الإنسان والحيوانات، يحدث تسمم البشر بالأفلاتوكسين إما من خلال التعرض المباشر بتناول محاصيل زراعية أو منتجات غذائية ملوثة، أو بطريقة غير مباشرة عند استهلاك منتجات حيوانية ملوثة (Nazhand, et al., 2020). إذ ينتج عن ذلك جملة من التأثيرات الصحية الجسيمة، أبرزها السمية الكبدية؛ إذ يُصنف مركب الأفلاتوكسين B1 ضمن المجموعة الأولى للمواد المسرطنة بحسب الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) International Agency For Research (IARC, 2012). حيث تشير الإحصائيات إلى تسببها بنسبة تصل إلى 28% من إجمالي حالات سرطان الخلايا الكبدية hepatocellular carcinoma (HCC) في جميع أنحاء العالم (Liu, et al., 2012).

تحدث السمية الكبدية نتيجة استقلاب الأفلاتوكسين وتشكل مستقلبات وسطية تفاعلية كمركب AFB1-exo 8,9-epoxide بواسطة إنزيم السيتوكروم CYP450 (Verga, 2024).

في إحدى الدراسات المنفذة في الصين؛ بلغت نسبة تلوث الأغذية بالأفلاتوكسينات 17.4%، وارتفعت النسبة إلى 20.4% في عينات المكسرات والبذور، وقدّر متوسط الاستهلاك اليومي بين 2.4 - 8.3 نانوغرام/ كيلو غرام من وزن الجسم، مما يسهم في حدوث ما بين 13.100 - 44.900 حالة سنوية من سرطان الكبد (Qin, et al., 2023).

لا تقتصر آثار الأفلاتوكسينات على السمية الكبدية، بل تشمل أيضاً تثبيط الجهاز المناعي immunosuppression، وإحداث الطفرات mutagenicity، والتسبب في السمية الخلوية cytotoxicity، إضافة إلى التأثير في الجهاز التناسلي والتسبب في ضعف الخصوبة، وإحداث اضطرابات هرمونية تؤدي إلى مشكلات في الإنجاب، فضلاً عن دورها في ظهور أمراض سوء التغذية، والسمية العصبية neurotoxicity (Benkerroum and health, 2020).

من الآثار الصحية المؤسفة الناجمة عن التعرض للأفلاتوكسينات؛ الأثر السمي لدى الأطفال وتسببها في اضطرابات النمو (Watson, et al., 2018, Machado, et al., 2023)، حيث تؤكد الدراسات أن ما بين 85-100%

من الأطفال في بعض دول إفريقيا يظهرون علامات تأخر في النمو نتيجة التعرض المزمن للأفلاتوكسينات (Grace, et al., 2015).

نظراً للآثار السمية العالية الناجمة عن الأفلاتوكسينات ومقاومتها للتفكك تتوجه الجهود العلمية نحو الحد من إنتاجها من خلال كبح نمو الأعفان المفرزة لها، وإيجاد طرائق ناجعة لمعالجتها والتقليل من تأثيرها في الأغذية.

1-8- معالجة الأفلاتوكسينات Aflatoxins treatment:

تمثل مرحلة ما قبل الحصاد محطة حاسمة لتجنب الفساد الفطري والتلوث بالأفلاتوكسينات؛ وذلك عند تطبيق الممارسات الزراعية الجيدة (GAPs) Good Agriculture Practices أهمها زراعة الأصناف المقاومة للآفات، والتسميد المناسب، ومن ثم مراعاة ظروف التخزين والتجفيف المناسبة للوقاية من الإصابة الفطرية.

لكن في ظل غياب هذه الممارسات والحاجة الماسة للحفاظ على سلامة المحاصيل الزراعية والمنتجات الغذائية ظهر في بداية العصر الصناعي توجهاً نحو استعمال مواد حافظة للأغذية والأعلاف، مثل: بروبيونات الكالسيوم calcium propionate، ثنائي أكسيد الكبريت sulfur dioxide، سوربات البوتاسيوم potassium sorbate وذلك تجنباً للفساد الغذائي الناتج عن نمو الأعفان المفرزة للسموم، كان هذا حلاً ناجعاً لحد ما؛ لكن تبين أن هذه الوسائل تتعارض مع هدف المنتجات الغذائية الخالية من المواد الكيميائية الاصطناعية (Leyva Salas, et al., 2017). ومن ثم استُعملت مجموعة من الطرائق الفيزيائية لنزع السموم الفطرية اعتماداً على استعمال الحرارة، التآين الإشعاعي، والأشعة فوق البنفسجية، أو بالاعتماد على طرائق المعالجة الكيميائية من خلال استعمال الحموض المختلفة، أو الألكينات، أو مواد ذات طبيعة قلوية، أو مواد مرجعة، أو مواد مؤكسدة، أو مواد مكلورة، أو مواد حلمهة (Karlovsky, et al., 2016, James and Zikankuba, 2018).

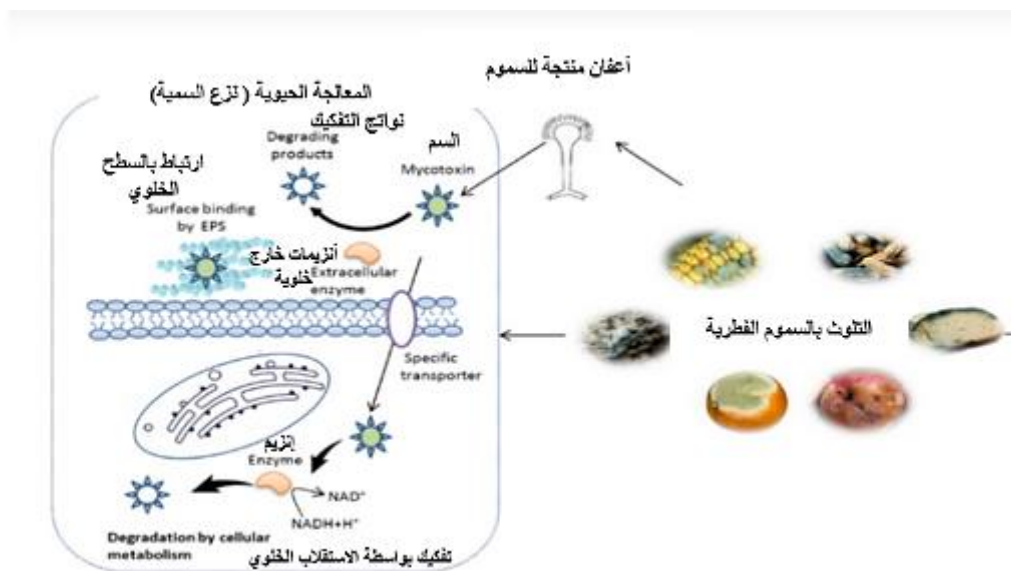
لكن تبين وجود سلالات فطرية تتحدى كل هذه الوسائل وتمتلك المقدرة على مقاومة هذه الأساليب المعتمدة في عمليات الوقاية والمعالجة، فضلاً عن تأثير هذه الطرائق سلباً في جودة المنتج الغذائي إضافة إلى تكلفتها الاقتصادية

العالية رغم كفاءتها المحدودة. بالنظر إلى ما سبق، هناك حاجة لإيجاد بدائل آمنة وفعالة واقتصادية للتغلب على مشكلة التلوث الفطري في الغذاء.

1-9- المعالجة الحيوية Bioremediation:

يزغ في الآونة الأخيرة توجه كبير نحو استعمال المواد الحافظة الحيوية bio-preservatives وهي أنواع محددة من الأحياء الدقيقة قادرة على إنتاج مركبات حيوية مثبطة لنمو الفطريات المفرزة للسموم، مما يعزز من سلامة الغذاء وإطالة مدة صلاحيته، أهمها أنواع من الجراثيم والبكتيوسينات bacteriocins والخمائر yeast.

يتميز هذه العوامل الحيوية مقدرتها على إزالة السموم Detoxification من خلال عمليتين أساسيتين: الامتصاص absorption، والتحلل الإنزيمي enzymatic degradation (Jard, et al., 2011)، الشكل 4.



الشكل 4: مخطط يوضح الآلية الحيوية للمعالجة الحيوية للسموم الفطرية إما من خلال التفكيك بواسطة إنزيمات خارج خلوية، أو الارتباط بالسطح الخلوي، أو الاستقلاب الخلوي (Liu, et al., 2022).

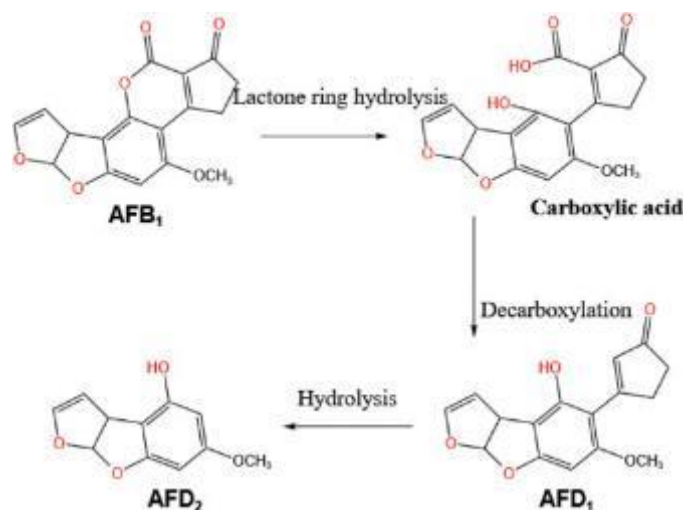
يمكن أن تتفكك الأفلاتوكسينات بواسطة إنزيمات إما داخل أو خارج خلوية، وتتمثل النواتج النهائية الناتجة عن عملية التفكيك الإنزيمي الماء وغاز ثنائي أكسيد الكربون (Aliabadi, et al., 2013).

1-9-1 دور الإنزيمات الجرثومية في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين:

The role of bacterial enzymes in the biodegradation of aflatoxin

تسهم إنزيمات رئيسية في مسارات التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين مثل: إنزيمات اللاكيز (laccases، البيروكسيداز (peroxidase، إنزيمات الريدوكتاز (reductases (Wang *et al.*, 2019, Xiong *et al.*, 2022, Xu *et al.*, 2025)؛ حيث يتمثل دورها الرئيس في استهداف حلقة الفوران للأفلاتوكسين مما يؤدي إلى تشكيل مركب إبيوكسيد ثم مركب ثنائي الهيدروبول، وفي مسار آخر يُعنى بهدم الهيكل الكيميائي الذي يكسب مركب الأفلاتوكسين الثبات والمقاومة؛ تتدخل إنزيمات aflatoxin oxidase (AFO) والتي لها دور في عملية أكسدة الأفلاتوكسين (Cao *et al.*, 2011)، إضافة إلى إنزيمات الحلمهة (hydrolytic enzymes) التي تستهدف حلقة اللاكتون مؤدية إلى تشكيل أحماض كربوكسيلة (Sun *et al.*, 2023).

تهدف عملية التفكيك الحيوي إلى تشكيل مستقلبات أقل سمية أو غير سامة مثل مركب الأفلاتوكسين D1 والأفلاتوكسين D2 (Ouyang, *et al.*, 2025). يلخص الشكل 5 مسار التفكيك الحيوي.



الشكل 5: مخطط يوضح الآلية الإنزيمية لتفكيك مركب الأفلاتوكسين، وتحويله إلى مستقلبات غير سامة (Sun, 2023)

من العوامل الإنزيمية المفترزة بوساطة الجراثيم والتي تؤدي دوراً مهماً في مسار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسينات؛ إنزيمي الأوكسيداز Oxidase والكاتالاز Catalase، يتمثل دور الأول في إدخال مجموعات أكسجينية في البنية العطرية المعقدة للأفلاتوكسين B1، لاسيما حلقة الفوران المزدوجة، مما يؤدي إلى تشكيل مركبات أقل تعقيداً وقابلة للتحلل (Qin et al., 2021)، أما الكاتالاز فيؤدي دوراً غير مباشر عبر تفكيك أحد نواتج عمليات الأكسدة ومنها: بيروكسيد الهيدروجين، مما يحافظ على استقرار عملية التفكيك الحيوي بوساطة حماية إنزيمات التفكيك من التأثير التثبيطي المحتمل من نواتج الأكسدة السامة (Yanhua et al., 2023, Wang et al., 2025).

أما الإنزيم المحوري في عملية التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 والمفترز بوساطة أنواع جراثيم جنس *Bacillus* إنزيم CotA laccase، والذي يتكون من نحو 500 حمض أميني، وما يميزه كونه إنزيم أكسدة متعدد النحاس Multicopper oxidase، يرتبط عادة ببنية الأبواغ الجرثومية، الأمر الذي يمنحه الثبات والمقاومة للشروط البيئية القاسية من حرارة عالية أو تغيرات درجة حموضة الوسط (Guo et al., 2017).

تشفر المورثة CotA عند جراثيم *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* لإنزيم CotA laccase، تبين الدراسات الجزيئية والتحليل الوراثية امتلاك هذه المورثة على مناطق حفظ عالية highly conserved regions، مما يدل على ثبات وظيفي عالٍ للإنزيم أثناء عمليات الأكسدة (He et al., 2025).

إضافة لسموم الأفلاتوكسين يمكن أن يتدخل إنزيم CotA laccase في أكسدة العديد من الملوثات البيئية معقدة البنية والمقاومة لعمليات التحلل، كالمركبات الفينولية والعطرية، والأصبغة الصناعية، وبعض أنواع المبيدات، والهيدروكربونات متعددة الحلقات العطرية، والسموم الفطرية كالزيرالينون، والأوكراتوكسين، والباتولين (Lyagin and Efremenko, 2019, Edoamodu and Nwodo, 2022, Qi, et al., 2025).

تشير الدراسات إلى إمكانية عد إنزيم CotA laccase كوسيلة حيوية واعدة في مجال المعالجة الحيوية وتطبيقاتها، نظراً لثباته العالية وكفاءته في إزالة السموم، لاسيما مقدرته على أكسدة الأفلاتوكسين B1، حيث تعتمد

آلية الأكسدة على مراكز النحاس النشطة في الإنزيم (T1, T2, T3)، إذ يتم نقل الإلكترونات من جزيء السم إلى الأكسجين الجزيئي ليتم تشكيل الماء، تزامناً مع عمله على أكسدة حلقة الفوران الهدف الرئيسي لعملية الأكسدة، وحلقة الكومارين العطرية.

ينتج عن مراحل الأكسدة مركبات منخفضة السمية؛ مركب الأفلاتوكسين Q1 ($C_{17}H_{12}O_7$)، وكذلك مركب epi-aflatoxin Q1، وهي مركبات قابلة للانحلال في الماء، قابلة للتحلل الكامل، أو الإطراح حيويًا (Guo et al., 2020, Liu et al., 2023).

تعمل المنظومة الإنزيمية المتكاملة والتآزر في فاعلية الإنزيمات المسؤولة عن مسار التفكيك الحيوي والمفردة بواسطة الجراثيم النشطة حيويًا على تسريع عملية خفض السمية وتفكيك الأفلاتوكسين.

تساعد التقنيات الحديثة أهمها تقنية تسلسل المورثة 16S rRNA التي تمثل طريقة عالية الكفاءة لتحديد هوية الأنواع الجرثومية المعزولة من بيئات طبيعية وإنشاء علاقات تطورية فيما بينها، حيث يتم تضخيمها بالتفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR ثم تحديد تسلسل ناتج التضخيم، يتبع ذلك مقارنة تسلسل المورثة بالتسلسلات الموجودة في قواعد بيانات DNA. تحتوي هذه المورثة على مناطق محفوظة بدرجة عالية؛ مما يسمح بتصميم بادئات عالمية خاصة بها، إضافة إلى وجود مناطق شديدة التباين تختلف من نوع لآخر، وعليه يتم التمييز بين الأنواع، لذا تعد دراسة تسلسل مورثة 16S rRNA الأكثر اعتماداً وعلى نطاق واسع في توصيف الأنواع الجرثومية المختلفة (Church et al., 2022).

وللكشف الدقيق عن مستويات التعبير عن المورثات الجرثومية المسؤولة عن تفكيك السموم البيئية أهمها الأفلاتوكسينات؛ يتم اعتماد واحدة من أحدث التقنيات "تقانة RT-qPCR" التي تتميز بالحساسية العالية والدقة في كشف التغيرات الدقيقة في التعبير المورثي، ولإجراء تفاعل التضخيم والكشف الجزيئي بهذه التقانة لابد من وجود أصبغة متألقة خاصة fluorescent dyes التي تمكن من رصد ناتج التضخيم حيث تزداد شدة التألق طردياً مع تراكم جزيئات DNA الناتجة عن التضاعف في كل دورة والنقطة الزمنية التي يصل فيها التألق إلى عتبة حدية threshold تحدد مستوى التعبير المورثي (Jeong et al., 2022).

يفتح استعمال هذه التقانات مجالاً واسعاً للكشف عن الأحياء الدقيقة التي تتميز بكفاءة عالية في التفكيك الحيوي للسموم وتحديد هوية هذه الكائنات بدقة، وفهم دقيق للآلية الجزيئية التي تتبعها في التفكيك، مما يتيح اعتمادها كوسائل فعالة في تطبيقات مكافحة والمعالجة الحيوية.

دراسات سابقة حول الأجناس الجرثومية المثبت دورها الحيوي في تثبيط الفطر السام والتفكيك الحيوي

لأفلاتوكسين B1:

Previous studies on bacterial genera proven to play a vital role in inhibiting the toxic fungus and biodegrading aflatoxin B1:

تتسم جراثيم حمض اللبن Lactic Acid Bacteria (LAB) بخصائص مميزة وفاعلية حيوية مضادة للفطريات المنتجة للسموم، حيث تنتج طيفاً واسعاً من المستقلبات المثبطة للنمو الفطري، كما تمتلك المقدرة على السيطرة على سمومها المفترزة من خلال الامتصاص adsorbtion، أو التفكيك degradation، أو نزع السمية Detoxification، لذا يجري العمل على استثمارها كعوامل حفظ حيوي biopreservative agents للحد من التلف الناجم عن التلوث الفطري في مجموعة متنوعة من الأغذية وعلف الحيوانات (Sadiq, et al., 2019).

تعرف جراثيم حمض اللبن بأنها إيجابية بصبغة غرام، غير متحركة، وغير قادرة على التبوغ، هوائية مخيرة، أنواعها إما مكورات، أو عصيات مكورة، أو عصوية الشكل. مفرزة للعديد من المركبات المضادة للفطريات مثل: الحموض العضوية، ثنائي الاستيل، الببتيدات، الحموض الدسمة، الحموض الكربوكسيلية، البكتيريوسينات، بيروكسيد الهيدروجين، الكحولات (Crowley, et al., 2013, Wang, et al., 2021).

ففي دراسة أجريت عام 2013 بينت دور جراثيم *Lactobacillus plantarum* السلالة YML007 في تثبيط فطريات سامة تعود إلى الأنواع: *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *Aspergillus oryzae*، *fusarium oxysporum*. كما كشفت الدراسة عن نتائج تحليل السائل الطافي الخالي من الخلايا الجرثومية cell-free

supernatant، إذ تبين وجود بروتين جديد ذو وزن جزيئي 1256,6 kDa يعد المسؤول عن نشاطها المضاد للفطريات (Jung, et al., 2013).

ومن بين الدراسات التي تشير إلى تأثير المستقلبات المضادة للفطريات ذات الطبيعة البروتينية المنتجة بواسطة أنواع مختلفة من جراثيم حمض اللبن، بينت دراسة أجريت على جراثيم *Lactobacillus brevis* دورها في خفض نمو فطر *Aspergillus flavus* وإنتاجه للأفلاتوكسين بنسبة 96% تقريباً، تم تأكيد ذلك في دراسة مستوى النسخ حيث لوحظ انخفاض التعبير عن المورثة omt-A بنسبة 80% مقارنةً مع الشاهد (Gomaa, et al., 2018).

كما تمتلك بعض سلالات *L. plantarum* المقدرة على تثبيط النشاط الفطري لكل من *Aspergillus* و *Penicillium expansum*، *parasiticus* بواسطة إنتاج ببتيديات فعالة حيويًا (Luz, et al., 2018).

كذلك تقوم الحموض العضوية التي تُفرزها جراثيم حمض اللبن بدورٍ حاسمٍ في تثبط نمو الفطريات السامة والحد من مقدرتها على إنتاج السموم أو تأثيرها في ثباتية هذه السموم المُفرزة (Oliveira, et al., 2015, Guimarães, et al., 2018). كما يمكن للحموض العضوية أن تثبط إنتاج السم من خلال تأثيرها التثبيطي لعملية التبوغ عند الفطر (Svanström, et al., 2013).

يُفسر دور الحموض العضوية بتسببها بتغيير درجة حموضة pH الوسط؛ مما يؤثر في ثباتية السموم الفطرية، في دراسة تبين تفكك أكثر من 85% من الأفلاتوكسين بواسطة حمض اللبن lactic acid (Aiko, et al., 2016).

وفي دراسة أجريت عام 2021 تبين دور خميرة *Saccharomyces cerevisiae* بالتأزر مع جراثيم *Pediococcus pentosaceus* في تثبيط فطر *Aspergillus flavus* من خلال إنتاج مستويات عالية من الأحماض العضوية لاسيما حمض الخل acetic acid وحمض اللبن lactic acid (Jin, et al., 2021).

ومن الأنواع الجرثومية التي تتسم بمقدرة حيوية تمكنها من تفكيك السموم الفطرية جراثيم الشعيات *Actinomycetes*، حيث بينت إحدى الأبحاث دور جراثيم *Streptomyces cacaoi* السلالة (K234) على تفكيك الأفلاتوكسين بنسبة 88% (Harkai, et al., 2016).

كما أشارت دراسة تم من خلالها اختبار ثلاثين عزلة من جراثيم الشعيات المعزولة من التربة على تثبيط نمو فطر *Aspergillus flavus*، وخلصت نتائج البحث إلى نشاط مضاد للفطر أظهرته ستة عزلات جرثومية، بلغت نسبة التثبيط بين 21.42 - 42.85% (Wongsariya and Thawai, 2019).

ومن الجراثيم السالبة لصبغة غرام تتفوق أنواع جرثومية تابعة لجنس *Pseudomonas* في كفاءتها في تفكيك السموم الفطرية لاسيما الأفلاتوكسين. من بين هذه الأنواع جراثيم *Pseudomonas putida* المعزولة من نبات قصب السكر

التي تمكنت من خفض سمية الأفلاتوكسين بتفكيكه لمركبات أقل سمية وبشائية منخفضة (Samuel, et al., 2014). ومن بين أنواع *Pseudomonas* التي أثبتت تفوق في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسينات نوعي *P. stutzeri* و *P. aeruginosa* (Tang, et al., 2021).

يُعد جنس *Bacillus* من الأجناس الجرثومية التي تستأثر اهتمام الباحثين بشدة نتيجة لتنوع أدواره الحيوية، ومقدرته على التعايش بظروف بيئية متنوعة، ومقاومته لشروط النمو القاسية، ومقدرته على تشكيل الأبواغ الداخلية، فضلاً عن سهولة عزله وتتميته على أوساط مغذية بشروط المختبر، وسرعة تكاثره، إضافة إلى تنوعه الكبير إذ ينتمي لهذا الجنس أكثر من 200 نوع (Das et al., 2014, cho et al., 2020).

تؤكد نتائج الأبحاث على مقدرة بعض الأنواع التابعة لجنس *Bacillus* على إنتاج مركبات مثبطة للميكروبات الممرضة، إلى جانب القدرة العالية على التفكيك الحيوي للملوثات والسموم البيئية معقدة التركيب الكيميائي؛ لعل أهمها الأفلاتوكسين B1.

كما تمثل بعض الأنواع الجرثومية التي تنتمي إلى جنس *Bacillus* خياراً واعداً في تقانات الحفظ الحيوي للغذاء والمعالجة الحيوية، نظراً إلى مقدرتها على تثبيط نمو الأعفان المسببة للفساد الغذائي، يُعزى ذلك لإفرازها مركبات ذات طبيعية بروتينية دسمة، وإنزيمات مفككة، ومركبات سطحية نشطة (Abdel-Nasser, et al., 2024).

حيث تكمن أهميتها في كونها آمنة (GRAS) recognized as Generally Regarded AS Safe، وتُستعمل كعوامل بروبيوتيك فعّالة Probiotics، تسهم في دعم النبيت المعوي (الفلورا)، وتعزيز المناعة، وتؤدي دوراً مهماً في مقاومة مسببات الأمراض الهضمية، وبسبب أبعادها المقاومة للظروف الحرارية الشديدة تتمكن هذه الأنواع من الثبات أثناء المعالجة الحرارية للمنتجات الغذائية، لذا يسهل اعتمادها في التطبيقات الغذائية والوظيفية (Payne et al., 2024).

تؤكد إحدى الدراسات السابقة حول مقدرة جراثيم *Bacillus velezensis* السلالة DY3108 على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 من خلال تنميتها في وسط يحتوي الأفلاتوكسين كمصدر وحيد للكربون، حيث خلصت نتائج دراسة (Shu, et al., 2018) لمقدرة تفكيك عالية قُدرت بنسبة 91.5%، إلى جانب تثبيطها لنمو فطر *A. flavus* و *A. parasiticus*، وفي دراسة حديثة في عام 2024 بينت نتائج البحث مقدرة سلالة تابعة للنوع الجرثومي *Bacillus velezensis* على تثبيط نمو فطر *A. flavus* وتفكيك أشد الأفلاتوكسينات سمية B1 (Li, et al., 2024).

ومن أنواع جراثيم جنس *Bacillus* النوع *B. amyloliquefaciens* السلالة WF2020 المعزولة من المخل، أثبتت دراسة (Chen et al., 2022) فعاليته في تفكيك الأفلاتوكسين بتركيز 1-8 ميكروغرام، في مجال حراري بين 37-45 م°، ودرجة حموضة pH=8. عُزيت فعالية التفكيك لإفراز إنزيمات مفرزة خارج خلوية. كما سببت السلالة الجرثومية خللاً في نمو فطر *A. flavus*، كما كبحت التعبير عن عشر مورثات في مسار تشكيل الأفلاتوكسين عند الفطر، وعوامل النسخ (aflS, aflR) نجم عن ذلك تثبيط إفراز الفطر للأفلاتوكسين B1.

فضلاً عن ذلك أشارت الدراسة أن هذه السلالة الجرثومية تعد عامل بروبيوتيك مُحتمل نظراً لاصطناعها مركبات نشطة، وافتقادها لمورثات الفوعة virulence genes، وحساسيتها لصادات حيوية متنوعة.

من بين الأنواع الجرثومية التابعة لجنس *Bacillus*، والمثبت مقدرتها على تفكيك الأفلاتوكسين النوع الجرثومي *B. subtilis* حيث أثبتت دراسة أُجريت عام 2023 أن أحد السلالات المعزولة من منتجات الألبان السلالة YGT1 تمكنت من تحليل مركب الأفلاتوكسين بنسبة 83.8% في وسط الزراعة، بعد الحضان بدرجة 30 م° (Al- Mamari et al., 2023).

وفي دراسة حديثة 2025؛ تبينت مقدرة السلالة الجرثومية HQ3 التابعة للنوع *B. subtilis* على تفكيك الأفلاتوكسين بكفاءة عالية قُدرت بنسبة 81.34%، وذلك بدرجة حرارة بلغت 35 م°، ودرجة حموضة pH=9. تبين أن النشاط التفكيكي نتيجة لإفراز أنزيمات HQ3-Laccase ، myo-inosose-2 dehydratase (Feng et al., 2025).

أشارت الدراسات السابقة إلى الفاعلية الحيوية للنوع الجرثومي *B. licheniformis* ففي دراسة (Nabti et al., 2013) أكدت النتائج على نشاط أنزيمي عالي لدى سلالات عدة تنتمي للنوع الجرثومي *B. licheniformis*، إضافة لمقدرة حيوية مميزة على تثبيط العديد من الفطريات السامة الممرضة للنباتات ومنها *A. niger* و *A. flavus*.

كما برهنت الدراسات السابقة حول مقدرة النوع الجرثومي *B. licheniformis* على إفراز مركبات مضادة للميكروبات ومنها البكتيروتوكسينات وهي ببتيدات أو بروتينات تعمل على تثبيط العوامل الممرضة من جراثيم، أو فطريات سامة (Shleeva et al., 2023).

الفصل الثاني

المواد والطرائق

Materials and Methods

2-1 - جمع عينات التربة Soil samples collection:

نظراً للدور الرئيس والفعال الذي تقوم به جراثيم التربة في تعزيز نمو النباتات وإنتاج المحاصيل (Lopes, et al., 2021)، وكفاءتها في تثبيط العوامل الممرضة للنبات وأهمها الفطريات المنتجة للسموم (Jousset, et al., 2014, Li, et al., 2017, Bonaterra, et al., 2022, Lahlali, et al., 2022)، انتُخبت عينات تربة زراعية بحثاً عن سلالات جرثومية تمتلك المقدرة على كبح الغزو الفطري لجنس *Aspergillus flavus*، حيث جُمعت التربة من موقعين محافظة القنيطرة (تربة نبات دوار الشمس *Helianthus annuus*، تربة نبات الذرة *Zea*)، ومن محافظة الحسكة (تربة قمح *Triticum*، تربة قطن *Gossypium*)، تجدر الإشارة إلى أن انتقاء التربة استهدف أنواع محاصيل زراعية اقتصادية ومعرضة للإصابة بالفطريات السامة ومن بينها فطر *A. flavus*، تم جمع عينات التربة بمرحلة الحصاد ومابعدھا، اختُيرت ثلاث نقاط متفرقة ممثلة لكل موقع على حدة، حيث أُخذ 500 غ تربة من عمق 5-10 سم باستعمال مجرفة spade، ثم حُفظت عينات التربة في أكياس بلاستيكية عقيمة في درجة حرارة 4 م° لحين بدء التجارب. يوضح الجدول 2 مواقع جمع عينات التربة.

الجدول 2: مواقع جمع عينات التربة

الموقع	المحصول النباتي المزروع	رموز عينات التربة
محافظة القنيطرة	دوار الشمس	A1, A2, A3
	ذرة	B1, B2, B3
محافظة الحسكة	قمح	S1, S2, S3
	قطن	M1,M2,M3

2-2- تحليل عينات التربة Analysis of soil samples (قياس درجة الحموضة pH، ومحتوى المادة

العضوية (measuring pH and organic matter content):

قيست درجة حموضة عينات التربة بوزن 20 غرام من كل عينة، ومن ثم أُكمل الحجم إلى 100 مل باستعمال الماء المقطر، حُضنت أنابيب الاختبار بدرجة 25 م°، مع الرج 150 دورة في الدقيقة، مدة ساعة، تم سحب السائل الطافي للتفصيل مدة ثلاث دقائق للتخلص من الشوائب، ثم قيس درجة الحموضة باستعمال جهاز pH ضمن مختبر الدراسات العليا- قسم علم الحياة النباتية- كلية العلوم.

كما حُلل محتوى المادة العضوية في عينات التربة المدروسة في مختبرات الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

باستعمال طريقة والكي- بلاك (Walkley-Black) التي تعتمد على تقدير محتوى الكربون العضوي في التربة ومن ثم حساب محتوى المادة العضوية. تم تجهيز كل عينة التربة بعد التجفيف، ثم عملية طحن التربة ونخلها، ثم تقدير وزن كل عينة تربة.

عوملت عينات التربة مع حمض الكبريت المركز، ومحلول كرومات البوتاسيوم (وسط مؤكسد قوي)، حيث تتفاعل الكرومات مع المادة العضوية ويتم إرجاع الكروم سداسي التكافؤ إلى كروم ثلاثي التكافؤ، وتحويل الكربون العضوي إلى ثنائي أكسيد الكربون. تمت معايرة الكرومات غير المتفاعلة باستعمال محلول كبريتات الحديدي، ثم حُسب محتوى المادة العضوية رياضياً اعتماداً على حجم معايرة العينة مقارنة مع الشاهد (Kellogg, 2014).

2-3- عزل جراثيم التربة soil Bacteria isolation:

حُضر معلق تربة من كل عينة بوزن 1 غرام تربة، وإضافة 5 مل من وسط ملحي Mineral salt medium "MSM" الجدول 3، حُضنت الأنابيب في حمام مائي عند درجة حرارة 30 م°، مع الرج بسرعة 100 دورة/دقيقة، ليلة كاملة. زُرِع 100 ميكرو لتر من معلق التربة وفُرش باستعمال ممص باستور معقم على وسط LB (Luria-)

(Bertani)، أُجريت سلسلة تمديد (من 10^{-2} إلى 10^{-4}) تبعاً لزيادة كثافة النمو الجرثومي في العينات، حُضنت أطباق الزراعة الجرثومية عند حرارة 30 م°، مدة 24 ساعة. تم توصيف المستعمرات الجرثومية النامية مورفولوجياً من حيث خواص: الشكل، اللون، الحواف، القوام، الارتفاع. كما تم تقدير الكثافة الجرثومية CFU (colony forming unit) لكل 1 غ من الوزن الجاف من عينة التربة، وفق القانون:

الكثافة الجرثومية = عدد المستعمرات × معامل التمديد / حجم العينة المزروعة مقدرة بوحدة مل أو غ.

الجدول 3: تركيب وسط MSM

المادة الكيميائية	الكمية (غ/ل)	
نترات الصوديوم	NaNO ₃	4 غ
فوسفات ثنائي البوتاسيوم	K ₂ HPO ₄	3 غ
كلوريد الأمونيوم	NH ₄ Cl	4 غ
كبريتات المغنيزيوم	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 غ
كلوريد الصوديوم	NaCl	1 غ
كلوريد البوتاسيوم	KCl	1 غ
كلوريد الكالسيوم	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1 غ
فوسفات الصوديوم	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.2 غ
كبريتات الحديد	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 غ

2-4- زراعة فطر *Aspergillus flavus* واختبار مقدرته على إنتاج الأفلاتوكسين B1

:Culture of the fungus *Aspergillus flavus* and testing its ability to produce aflatoxin B1

زُرِع فطر *Aspergillus flavus* السلالة NRRL 3357 (تم الحصول عليها من مختبرات هيئة الطاقة الذرية

السورية) على وسط ديكستروز بطاطا آغار "PDA" Patato Dextrose Agar تم الحضان عند درجة حرارة 28 م°،

مدة أسبوع. اختُبرت مقدرة الفطر على إنتاج سم الأفلاتوكسين B1 في أوساط متنوعة، حيث زُرِع الفطر في وسط مُغذي سائل Patato Dextrose Broth "PDB"، وفي معلق تربة، وفي عينة غذائية (الرز)؛ بعد نُقع نحو 100 غرام رز مدة ساعتين، ثم تمت التصفية وتوزيع كمية الرز على أرلنيتين معقمتين، ثم حُضر معلق بوغي لتلقيح الوسط، أُغلقت فوهة الأرلينات بوساطة سدادة قطنية مغلقة بقطعة قصدير، تم الحضان بحرارة 28 م°، مدة أسبوع في كل الاختبارات. استُخلص الأفلاتوكسين B1 وفق الخطوات الآتية (Wacoo, et al., 2014):

1. ثُقلت عبوات الزرع 14000 دورة/دقيقة مدة 10 دقائق.
2. نُقل السائل الطافي إلى أرلينة زجاجية، ثم أُضيف 100 مل من المذيب العضوي الكلورفورم، ثم وُضعت العينات على الرج مدة ساعة، بدرجة حرارة الغرفة، وبسرعة 100 دورة/دقيقة.
3. رُشح الوسط باستعمال ورقة ترشيح مُضاف لها سلفات الصوديوم، كُرر الترشيح مرتين.
4. تم تبخير العينة باستعمال جهاز المبخر الدوار بعد ضبط حرارته عند 40 درجة م°، والضغط 474 ميلي بار.
5. بعد تمام التجفيف حُلّت العينة في 500 ميكرو لتر كلورفورم.
6. اختُبر إنتاج الأفلاتوكسين بطريقة الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة "TLC" Thin Layer Chromatography بترحيل العينة على صفيحة السيلكا، ضمن محلول الترحيل المركب من: كلورفورم، أسيتون 1:9.
7. تم تتبع تآلق الأفلاتوكسين في العينات بوساطة جهاز وحدة الكشف بالأشعة فوق البنفسجية UV عند طول موجة 366 نانومتر.
8. حُفظت عينات الأفلاتوكسين المستخلصة بدرجة حرارة -20 م°.

2-5- دراسة تأثير فطر *A. flavus* في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة Studying the effect

:of *A. flavus* on the structure of the bacterial community in soil samples

بعد دراسة الفلورا الجرثومية في عينات الترب الزراعية المدروسة، أُجريت تجربة بغية دراسة تأثير فطر *Aspergillus flavus* في بنية المجتمع الجرثومي لكل عينة تربة؛ من حيث الكثافة الجرثومية في عينات الترب الملقحة بأبواغ الفطر، مقارنة مع نتائج الكثافة الجرثومية في عينات التربة قبل التلقيح بالفطر المدروس، حيث هدفت التجربة لانتقاء أنواع جرثومية تمتلك فاعلية مضادة لنمو فطر *A. flavus* والحد من تأثيره السمي. تمت التجربة وفق الخطوات الآتية:

1. حُضر معلق بوغي لفطر *A. flavus*، بعد تنمية الفطر على وسط PDA مدة أسبوع، باستعمال مسبر معقم تم حفر أقراص من الوسط المغذي المنمى عليه الفطر، نُقلت الأسطوانات باستعمال الملقط المعقم إلى الأنبوب الحاوي على محلول توين 0.01% إذ يعمل على تشتيت وبعثرة الأبواغ الفطرية، بعد الرج الجيد للأنابيب، أُخذ 20 ميكرو لتر من المعلق البوغي وأضيف لصفحة العد، قُدِّر عدد الأبواغ في 1 مل باستعمال المجهر الضوئي.
2. وزن 100 غرام من كل عينة تربة على حدة، ثم أُضيفت لأرلينة معقمة، لُقحت كل عينة تربة بنحو 2×10^6 بوغ/مل، أُغلقت فوهة كل أرلينة بسدادة قطنية مغلقة بقطعة قصدير. جميع مراحل الزراعة تمت بشروط عقيمة ضمن خيمة الزرع، وحُضنت الأرلينات في حاضنة مضبوطة عند درجة حرارة 28 م.
3. تم تتبع التغير في نمو الأنواع الجرثومية أسبوعياً مدة شهرين، وذلك بأخذ 1 غ من الترب وتحضير معلق تربة، لتقدير الكثافة الجرثومية وتوصيف الأنواع الجرثومية النامية إلى جانب فطر *A. flavus*. لضمان توفر الرطوبة اللازمة لنمو الفطر خلال أسابيع التجربة أُضيف 1 مل من وسط MSM عند أخذ عينة من الترب في كل أسبوع.

4. وصفت الأنواع الجرثومية المعزولة من التربة خلال أسابيع التجربة مورفولوجياً، ثم جُددت الزراعة على

وسط LB بهدف الحصول على عزلة نقية، تم حفظ العزلات عند درجة 4 م°، لحين اختبار مقدرتها الحيوية

في تثبيط نمو فطر *A. flavus* وإفرازه للسم B1.

2-6- عزل الجراثيم المتعايشة في التربة المعاملة بالأفلاتوكسين B1 Isolation of symbiotic bacteria

in soil treated with aflatoxin B1

بهدف التحري عن المزيد من العزلات الجرثومية التي تتسم بخصائص حيوية فريدة تمكنها من تثبيط نمو

الفطر ومعالجة سمومه المفرزة؛ أُجريت تجربة تلقيح 1 غ من كل عينة تربة على جِدة بتركيز 20 نانوغرام/ميكرو لتر

من الأفلاتوكسين B1 مُضافاً إلى 200 ميكرو لتر من محلول MSM، حُضنت أنابيب الزراعة في حمام مائي درجة

حرارته 30 م°، مع الرج بسرعة 135 دورة/ دقيقة، مدة أسبوع.

زُرع 50 ميكرو لتر من معلق التربة المعاملة مع الأفلاتوكسين على وسط LB، أُجري تحضير سلسلة من

تمديدات الزراعة تبعاً لكثافة النمو الجرثومي في كل عينة، ثم حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 30 م°، مدة 24 ساعة.

تم توصيف العزلات الجرثومية النامية مورفولوجياً، وعزلت على أطباق خاصة لكل عزلة على جِدة.

تجدر الإشارة إلى أن جميع العزلات الجرثومية المدروسة تم حفظها ضمن وسط LB مُضاف إليه الغليسرول

بنسبة 50% عند درجة حرارة -20 م°، لحين إتمام التجارب.

2-7- اختبار الفاعلية الجرثومية المضادة لفطر *Aspergillus flavus* حيويًا: Bacterial antifungal

activity test against *Aspergillus flavus*

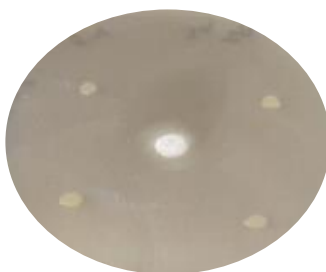
اختُبرت المقدرة التضادية الحيوية للعزلات الجرثومية المعزولة من الترب الملقحة بفطر *A. flavus* والترب

المعاملة بالأفلاتوكسين B1 اعتماداً على مقدرتها الحيوية على تثبيط نمو الفطر وتأثيرها المحتمل في كبح تبوغه.

درست التضادية الجرثومية على وسط مغذي LB وفق طريقة الزراعة المزدوجة (El-Debaiky, 2017)،

حيث لُقح وسط الاستنبات بالنوع الجرثومي المُختبر في أربعة نقاط حول مركز الطبق بطريقة الوخز، وغمست أقراص

الترشيح العقيمة بالمعلق البوغي، ثم نُقلت باستعمال الملقط المعقم وغُرست في منتصف الوسط المغذي. حُضنت الأطباق عند درجة حرارة 28 م°، تم تتبع النمو الفطري والجرثومي والتأثير المتبادل بين كلا النوعين مدة أسبوعين. تم التأكد من نتيجة التضادية الحيوية للنوع الجرثومي المُختبر وتأثيره في الحد من نمو فطر *A. flavus* وتنشيط مقدرته على التبوغ بالمقارنة مع الوسط الملقح بالفطر فقط كشاهد يوضح الشكل 6 طريقة الزراعة.



الشكل 6: طريقة الزراعة المزدوجة لاختبار التضادية الجرثومية ضد فطر *A. flavus*، تظهر المستعمرات الجرثومية في النقاط الأربعة حول المركز المغروس بمنتصفه قرص ترشيح ملقح بالمعلق البوغي.

في نهاية التجربة تم حساب نسبة التنشيط وفق القانون الآتي (Wongsariya and Thawai, 2019):

النسبة المئوية للتنشيط $D\% = R1$ (أقصى نمو لمستعمرة الفطر الشاهد) - $R2$ (نمو مستعمرة الفطر في الوسط الملقح بالنوع الجرثومي) $\div R1 \times 100$

2-8- دراسة التأثير الجرثومي في إفراز فطر *Aspergillus flavus* للأفلاتوكسين B1: Study of the

Bacterial effect on the secretion of aflatoxin B1 by *A. flavus*

بعد تقييم كفاءة الجراثيم المدروسة حيويًا بتنشيط نمو الفطر، اختُبرت مقدرتها في الحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1، بزراعة النوع الجرثومي في وسط زراعة سائل بأخذ مسحة من النوع الجرثومي المدروس ومزجها ضمن الوسط المغذي السائل LB broth، ثم أخذ كشطة من الفطر إلى أنبوب الزراعة، بعد الرج بخفة لضمان المزج الجيد، ثم حُضنت الأنابيب في حمام مائي مضبوطة حرارته عند درجة 28 م°، رَج بسرعة 100 دورة/دقيقة، مدة خمسة أيام.

حضّر أنبوب زراعة شاهد مزرع ضمنه الفطر المدروس فقط، لدراسة الفرق بين المقدرة الجرثومية المُحتملة في تثبيط إفرازه للأفلاتوكسين B1، وإنتاجه للسم عند النمو في الوسط الزراعي بغياب النوع المثبط. بعد أسبوع التجربة استخلص الأفلاتوكسين B1 بالطريقة المذكورة سابقاً في الفقرة (2-4)؛ وللكشف عن وجود الأفلاتوكسين أو غيابه في العينات المدروسة، تم ترحيل العينات على صفيحة TLC وقراءة النتيجة بوساطة جهاز وحدة الكشف باستعمال الأشعة فوق البنفسجية UV.

2-9- دراسة المقدرة الحيوية لجراثيم التربة على تفكيك الأفلاتوكسين B1: Studying the biological capacity of soil bacteria to degrade aflatoxin B1

انْتُقِيت الأنواع الجرثومية إيجابية التضادية الحيوية والمُثبت فاعليتها في تثبيط نمو الفطر بغية دراسة مقدرتها الحيوية في النمو بوجود الأفلاتوكسين B1 واستعماله كمصدر للكربون والطاقة.

ولهذا الهدف صُممت تجربة تعتمد على زراعة العزلات الجرثومية ضمن أنابيب سعة 1.5 مل حاوية على محلول ملحي فوسفاتي عقيم فقير بالكربون والعناصر المغذية Phosphate-buffered saline "PBS" الجدول 4، مُضافاً له الأفلاتوكسين بتركيز 20 نانوغرام/ميكرو لتر، لَقَح كل أنبوب على حدة بالنوع الجرثومي المراد اختباره، حُضنت أنابيب التجربة عند درجة حرارة 32 م°، وسرعة 115 دورة/دقيقة، مدة ثمانية أسابيع.

تم التحري عن تفكك الأفلاتوكسين بوساطة الجراثيم أسبوعياً باختبار تألقه على صفيحة TLC بالمقارنة مع الشاهد الأفلاتوكسين المضاف للوسط فقط.

الجدول 4: تركيب وسط PBS

المادة الكيميائية	الكمية	
كلوريد الصوديوم	NaCl	8 غ
كلوريد البوتاسيوم	NaCl	0.2 غ

1.44 غ	Na ₂ HPO ₄	فوسفات الصوديوم الثنائية
0.245 غ	NaH ₂ PO ₄	فوسفات البوتاسيوم الأحادية
		pH= 7.4

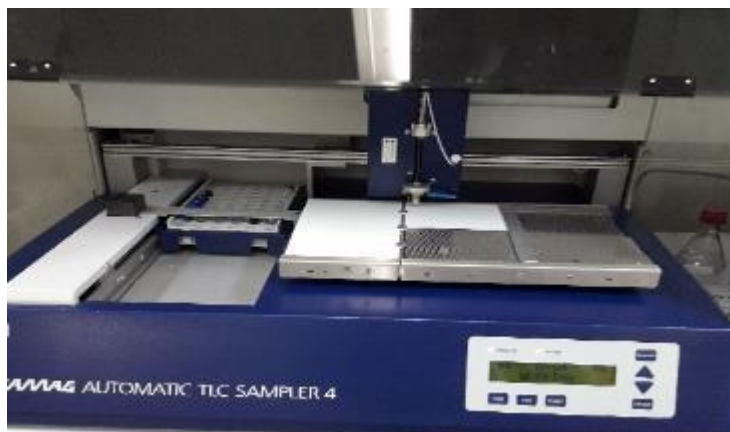
بناءً على نتائج التجربة الأولى؛ كررت تجربة اختبار مقدرة التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 بواسطة الأنواع الجرثومية التي أبدت تفاعلاً إيجابياً في الوسط؛ من خلال النمو بوجود السم الحيوي وتفكيكه تدريجياً، وذلك بهدف تأكيد نتيجة التفكيك وحساب التراكيز المتناقصة أسبوعياً بترحيل 10 ميكرو لتر من الوسط الملحي الحاوي على الأفلاتوكسين B1 بتركيز 20 نانوغرام/ميكرو لتر، والمُمنى ضمنه العزلة الجرثومية المُختبرة بنفس ظروف الحضان السابقة، بواسطة جهاز (CAMAG- Automatic TLC Sampler 4 (ATS4)- Switzerland) (مختبر تحليل الملوثات والمواد الفعّالة - دائرة الكيمياء الحيوية والسميات - هيئة الطاقة الذرية السوريّة) الشكل 7.

بعد تحضير سلسلة عيارية من الأفلاتوكسين B1 بتركيزات (0.156-0.3125-0.625 -1.25-2.5) نانوغرام/ميكرو لتر). تم تتبع عملية تفكيك الأفلاتوكسين بواسطة الجراثيم المدروسة أسبوعياً مدة 8 أسابيع. تم الترحيل على صفائح الـ TLC، وأُجري المسح عند طول موجة 366 نانومتر، يقوم الجهاز بحقن 10 ميكرو لتر من العينة، يعتمد عمل الجهاز على التقييم الكمي لنتائج الكثافة المقاسة، ومن ثم يتم حساب التراكيز من خلال المقارنة بنتائج السلسلة العيارية. بعد الترحيل بمحلول كلوروفورم، أسيتون 1:9.

تم تقدير النسبة المئوية للتفكيك الحيوي اعتماداً على العلاقة الآتية (Singh and Mehta, 2022):

$$\%D = \frac{Ac - At}{Ac} \times 100$$

حيث: D نسبة التفكيك الحيوي، AC تركيز الأفلاتوكسين الشاهد، At تركيز الأفلاتوكسين في العينة المُختبرة.



الشكل 7: جهاز TLC المستعمل لتقدير تركيز الأفلاتوكسين B1

2-10- التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية اعتماداً على سلسلة المورثة 16S rRNA

Molecular characterization of bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequence

أظهرت ثلاثون عزلة جرثومية نتائج إيجابية في اختبار فعاليتها التضادية ضد فطر *A. flavus* حيويًا، إلى جانب مقدرتها على تثبيط إفرازه للأفلاتوكسين B1، تم غربية العزلات بعد إجراء اختبار تفكيك الأفلاتوكسين ضمن شروط المختبر، وانتقيت نتيجةً للاختبار خمس عزلات جرثومية، تم تحديد هويتها جزيئيًا باستعمال تقانة سلسلة المورثة 16S rRNA.

2-10-1- استخلاص الدنا DNA extraction

في بداية العمل تم استخلاص الدنا الجينومي gDNA باستعمال DNA extraction KIT- QIAGEN وفق الخطوات الآتية:

1. في أولى مراحل الاستخلاص زرعت الخلايا الجرثومية في 10 مل وسط LB سائل، وحُضنت أنابيب الزرع

عند درجة حرارة 30 م°، مع الرج بسرعة 110 دورة/دقيقة، مدة 24 ساعة.

2. للحصول على الرسابة الجرثومية جُمعت الخلايا الجرثومية بتثقيط أنابيب الزرع السائلة بسرعة 6000

دورة/دقيقة، مدة 15 دقيقة.

3. أُضيف 300 ميكرو لتر من محلول الفصل P1 buffer (resuspension buffer) المكون من: محلول موقى Tris HCL لضبط درجة حموضة الوسط (50mM- pH=8)، وثنائي أمين الإيثيلين رباعي حمض الأسيتيك EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid (10mM) يمثل دورها بالارتباط مع الأيونات الإيجابية لأملاح مجموعة الفسفات في جزيء DNA، وكذلك تثبيط عمل الإنزيم المحلل له، RNase A (100 µg/ml) للتخلص من الحمض الريبي RNA. رُجَّت الأنابيب جيداً 4-6 مرات.
4. أُضيف 300 ميكرو لتر من محلول الحل P2 buffer (lysis buffer) المكون من هيدروكسيد الصوديوم (200 mM) ومادة سلفات دودوسيل الصوديوم SDS (sodium dodecyl sulphates) تركيز 1% بهدف تخريب الجدار الخلوي والغشاء السيتوبلازمي للخلايا الجرثومية، كما تعمل القلوية العالية للمحلول على تخريب وترسيب البروتينات وتثبيط الإنزيمات المحللة DNA "nuclease". رُجَّت الأنابيب جيداً 4-6 مرات، ثم حُضنت مدة 20 دقيقة في حرارة المختبر.
5. أُضيف 300 ميكرو لتر من محلول P3 buffer (neutralization buffer)، الحاوي على أسيتات البوتاسيوم Potassium acetate، بغية ترسيب البروتين. حُضنت الأنابيب بالتلج مدة 5 دقائق.
6. نُفِلت الأنابيب مدة 15 دقيقة للحصول على الرُسابة البروتينية ونُقل السائل الطافي (الحاوي على DNA) لأنبوب إندورف 1.5 مل جديد.
7. أُضيف 600 ميكرو لتر إيزوبروبانول iso-propanol، بهدف فصل وترسيب DNA، وذلك بتثقيل الأنابيب بسرعة 15000 دورة/ دقيقة مدة 30 دقيقة، بدرجة حرارة 4 م°.
8. بعد التخلص من الطافي أُضيف 1 مل إيثانول نقي 70% لرسابة DNA، نُفِلت الأنابيب 10000 دورة/دقيقة، مدة 15 دقيقة.

9. بعد التخلص من طافي الإيثانول تُركت الأنابيب لتجف جيداً، ثم حُل DNA في 50 ميكرولتراً ماء مقطر معقم. حُفظ DNA المُستخلص في درجة حرارة 4 م°.

2-10-2- قياس تركيز DNA وتقدير نقاوته Measuring DNA concentration and assessing its

:purity

حُد تركيز كل عينة على حدة باستعمال جهاز Nanodrop الشكل 8، على طول موجة 260 نانومتراً nm،

بنقاوة بين 1.8-2.



الشكل 8: قياس تركيز عينة الدنا DNA بواسطة جهاز Nanodrop

2-10-3- تضخيم المورثة 16S rRNA باستعمال التفاعل التسلسلي للبولىميراز 16S rRNA gene

:amplification using polymerase chain reaction

أُجري تضخيم المورثة 16S rRNA من الدنا الجينومي بحجم تفاعل نهائي 25 ميكرولتراً، حيث كانت المواد الكيميائية المستعملة في التفاعل كالاتي: محلول واق Taq polymerase buffer (تركيز 10x)، نكليوتيدات حرّة منقوصة الأكسجين (dioxynucleotid triphosphat) dNTPs (25 ميلي مولر mM)، كبريتات المغنيزيوم (MgSO4) 3ميلي مولر)، إنزيم البلمرة Taq polymerase (1.5 U)، بادئات (Primers 16S rRNA Forward , 16S rRNA Reverse) تركيز 10 ميكرو مولر، بالتسلسل الموضح في الجدول 5، عينة DNA ، ماء مقطر معقم لإتمام حجم

التفاعل. عند إجراء التفاعل استُعملت عينة DNA دُرست سابقاً كشاهد إيجابي، تم التضخيم باستعمال جهاز Thermal cyclers، وفق المراحل الموضحة بالشكل 9.

الجدول 5: تسلسل البادئات المستعملة لتفاعل PCR.

البادئة	التسلسل النكليوتيدي	PCR حجم ناتج ال Amplicon(bp)
16 S rRNA F	5' GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG3'	500
16S rRNA R	5' GCCCGGGAACGTATTACCG3'	

* تم تصميم وإنتاج البادئات المستعملة في الدراسة ضمن مختبرات هيئة الطاقة الذرية.



الشكل 9: برنامج عمل جهاز PCR

2-10-4- الرحلان الكهربائي Gel electrophoresis:

استُعملت هلامة الأغاروز بتركيز 1% لترحيل قطع الدنا بعد تضخيمها، لتحضير الهلام وُزن 1 غ من بودة الأغاروز وحلّ في 100 مل من دائرة الرحلان (TAE) Tris-acetate- EDTA (1x) مضبوطة درجة 8.3pH، يبين الجدول 6 مكونات دائرة الرحلان. أُضيف إلى الهلام 3 ميكرو لتر من ملون الدنا DNA Staining والصبغة المستعملة بروم

الإيثيديوم وهو ملون يرتبط مع الدنا ويظهر شدف الدنا على هيئة عصائب متألقة عند تعرضها للأشعة فوق البنفسجية UV.

الجدول 6: تحضير دائرة الرحلان TAE (x50)

الكمية	المادة الكيميائية
242 غ	Tris base
57.1 مل	Glacial acetic acid
100 مل	EDTA 0.5M
600 مل	ماء مقطر معقم
الحجم النهائي 1 لتر	

عند ترحيل ناتج تضخيم تفاعل PCR أُضيف إليها 5 ميكرو لتر ملون التحميل DNA loading Dye، ومُزج مع العينة المدروسة لاحتوائه على مواد كثيفة لتسهيل حقن العينة في البئر ولدور الصبغة في رؤية ومتابعة سير الرحلان. حقن في أول بئر 5 ميكرو لتر من DNA Ladder وهي قطع من الدنا معلومة الوزن الجزيئي. رُحلت العينات باستعمال وحدة الرحلان الكهربائي 125 ميلي فولط مدة 20 دقيقة. تمت قراءة نتيجة الرحلان الكهربائي باستعمال جهاز تصوير الهلام (uvitec-Japan) GEL Documentation عند طول موجة 256 نانومتر nm.

2-10-5- قراءة تسلسل المورثة 16S rRNA لتحديد هوية الجراثيم Reading the 16S rRNA gene :sequence to identify bacteria

تمت قراءة التسلسل النكليوتيدي لنواتج التضخيم باستعمال جهاز (ABI 310 Genetic Analyzer,

Applied Biosystems)- وحدة السلسلة في قسم التقانة الحيوية والبيولوجيا الجزيئية.

حُدّد جنس ونوع كل عزلة على حدة؛ بمقارنة تسلسل المورثة 16S rRNA الخاص بكل عزلة بالتسلسلات

الموجودة في قاعدة البيانات الخاصة بالمعلومات الوراثية National Center for Biotechnology Information

(NCBI) باستعمال برنامج خاص بقراءة التتالي النكليوتيدي (Chromas- version 2.6.6).

2-11- التوصيف المجهرى، والمورفولوجي للسلاسل الجرثومية المُختبرة Microscopic and

:morphological characterization of the tested bacterial strains

فُحصت السلاسل الجرثومية باستعمال المجهر الضوئي بعد تلوينها بصبغة غرام، كما دُرست خواص

مستعمراتها على الوسط الزرعى LB مورفولوجياً من حيث: الشكل، اللون، الحواف، القوام، الارتفاع.

2-12- توصيف الخصائص الحيوية الكيميائية للسلاسل الجرثومية المُختبرة Characterization of the

:biochemical properties of the tested bacterial strains

زُرعت السلاسل الجرثومية الموصّفة على أوساط مغذية انتقائية بهدف دراسة خصائصها المتنوعة حيث تم

اختبار احتياجاتها الهوائية بوساطة زراعتها في الآغار العميق بطريقة الوخر، واختُبرت حركتها بزراعتها بذات الطريقة

في وسط اختبار الحركة Motility Test medium الحاوي على مشعر لوني يمكننا من تمييز امتلاكها لسياط تساعد

على الحركة.

كما زُرعت جراثيم *Delftia acidovorans* سلبية الغرام على وسطي EMB (Eosin methylene blue)،

ووسط ماکونكي MacConkey agar الخاص بالجراثيم سلبية الغرام، واختُبرت مقدرة الجراثيم على تحمل الملوحة بنسبة

7.5% بزراعتها على وسط MYP مُضافاً له النسبة المطلوبة من ملح NaCl، ودُرست مقدرتها على حل الدم عن

طريق زرع السلاسل الجرثومية على وسط الآغار المُدمى Blood agar.

اختُبرت مقدرة السلاسل الجرثومية على حل النشاء (اختبار الأميلاز Amylase) بوساطة زراعتها على وسط

آغار النشاء starch agar، واختُبر إيجابية الاختبار في اليوم التالي للزراعة باستعمال محلول اليود اليودي، تمت جميع

اختبارات الزراعة الجرثومية بشروط عقيمة، اعتمدت طريقة التخطيط في الزراعة الجرثومية على الأوساط، أُجري الحضان عند درجة حرارة 30 م°، 24 ساعة.

2-13- اختبار النشاط الإنزيمي للسلاسل الجرثومية المفككة للأفلاتوكسين B1: Enzymatic activity test for aflatoxin B1 degrading bacterial strains:

اختُبرت الفاعلية الإنزيمية عند السلالات الجرثومية النشطة والتي امتازت بكفاءة عالية على النمو بوجود مركب الأفلاتوكسين عالي السمية واستقلابه بغرض استعماله كمصدراً للكربون والطاقة، بحثاً عن نشاط إنزيمي مرتبط بمسار تفكيكها لمركب الأفلاتوكسين B1 ثابت الهيكل الكيميائي والمقاوم للمعالجة والتفكيك، في أولى الاختبارات فُحصت مقدرة الجراثيم على تفكيك الماء الأوكسجيني H_2O_2 بواسطة إنزيم الكاتالاز Catalase في حال قدرتها على إنتاجه؛ أُجري الاختبار باستعمال أنابيب اختبار حاوية على الماء الأوكسجيني ثم لُفح الأنبوب الخاص بكل سلالة بمسحة من المستعمرة الجرثومية المدروسة بعمر (24-48 ساعة)، سُجلت إيجابية الاختبار عند انطلاق فقاعات الأوكسجين مباشرة بعد التفاعل.

تم الكشف عن نشاط إنزيم السيتوكروم أوكسيداز cytochrom Oxidase باستعمال أقراص الاختبار الخاصة بالكشف عنه وباستعمال إبرة الزرع تم أخذ كشطة من المستعمرة الجرثومية المُختبرة ومسحها على قرص الاختبار؛ تم اتميز بين السلالات سلبية أو إيجابية الاختبار بملاحظة ظهور اللون الأزرق البنفسجي (+) أو غيابه (-). كما أُجري اختبار إنزيم الستراز بزراعة السلالات الجرثومية على وسط سيمون سترات الحاوي على سترات الصوديوم كمصدر وحيد للكربون ومشعر أزرق بروموتيمول للكشف عن وجود إنزيم الستراز citratase المفكك للسترات، حيث يتم ارتفاع قيمة pH الوسط فيتغير اللون للأزرق دليلاً لإيجابية الاختبار بعد حضان أطباق الاختبار عند درجة 30 م°، 24 ساعة. اختُبر إنتاج الاندول Indole بواسطة السلالات المدروسة في حال مقدرتها على تفكيك الحمض الأميني التربتوفان بواسطة إنزيم التربتوفيناز Tryptophanase بعد زراعة الجراثيم في أنابيب اختبار حاوية على الماء الهضموني الغني بالتربتوفان، باليوم التالي للزراعة تم ملاحظة نتيجة الاختبار بإضافة بضع قطرات من كاشف إيرلخ-

كوفاكس Ehrlich- Kovacs ، في حال إيجابية الاختبار تتشكل حلقة حمراء كدليل على تحرر الاندول ناتجاً عن عملية التفكك. أُجري اختبار إمالة الجيلاتين بواسطة الجراثيم المنتجة لإنزيم البروتياز protease بتلقيح أنابيب الجيلاتين بطريقة الوخر، بعد الحضان، تمت قراءة نتيجة الاختبار بعد حفظ الأنابيب بالثلاجة مدة نصف ساعة؛ في حال كان الاختبار إيجابية يبقى الوسط سائلاً.

اختُبر إنتاج الجراثيم لإنزيم اليورياز Urease بزراعتها ضمن أنابيب حاوية على وسط البولة ومشعر أحمر الفينول، في حال مقدرتها على تفكيك البولة وتحويلها إلى نشادر ومن ثم فحماة الأمونيوم يتحول الوسط لقلوي ويظهر اللون الوردي دلالة على إيجابية اليورياز.

تم إجراء الاختبارات الحيوية الكيميائية وفق الطرائق المعتمدة والموصفة في المراجع الآتية: (MacFaddin, 2000, Cappuccino and Sherman, 2013).

2-14- دراسة التعبير المورثي عن المورثة CotA المسؤولة عن آلية تفكيك الأفلاتوكسين B1:

Studying the gene expression of CotA gene which responsible for the mechanism of aflatoxin B1 degradation:

اختُبر التعبير المورثي اعتماداً على تقانة التفاعل التسلسلي للبولىميراز الكمي في الزمن الحقيقي RT-qPCR (Real time-Quantitative PCR)، حيث انتُقي النوع الجرثومي *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 الأكثر كفاءة وظيفياً والأسرع في تفكيك الأفلاتوكسين B1 لاختبار التعبير المورثي عن إحدى المورثات المسؤولة عن تفكيكه مرجعياً "مورثة CotA"، تم تتبع التغيرات في التعبير المورثي خلال فترة النمو ضمن نقاط زمنية: 2، 4، 6، 8. تم تصميم بادئات نوعية خاصة بالمورثة الهدف، واعتمدت المورثة 16S rRNA كمورثة مرجعية.

2-14-1- استخلاص الرنا RNA extraction:

في بداية خطوات العمل تم استخلاص الرنا RNA وفق الآتي:

عُزل RNA من الخلايا الجرثومية لنوع *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 المنمأة بوجود الأفلاتوكسين B1 باستعمال (RNA extraction KIT- QIAGEN)، وفق الخطوات المرفقة مع طقم الاستخلاص. حيث أُضيف إلى الرسابة الجرثومية 450 ميكرولتراً من محلول الحل RLT (lysis Buffer) ممزوجاً مع 5 ميكرولتراً بيتامركبتوايثانول β Mercaptoethanol، وحُضنت الأنبيب عند درجة حرارة 50 م°، مدة 2-3 دقائق. ثم نُقل المزيج إلى أنبوب تجميع حاوي على عمود ربط DNA الجينومي، تلاه تثفيل مدة 2 دقيقة.

أُضيف إلى السائل الراشح نصف حجمه إيثانول 100%، ومُزج محتوى الأنبيب جيداً، ثم نُقل إلى الأنبيب الحاوية على عمود ربط RNA، ثم التثفيل مدة 15 ثانية للتخلص من الراشح. أُضيف إلى العمود 600 ميكرولتراً من محلول الغسل الأول RW1 ثم تثفيل 15 ثانية والتخلص من الراشح. ثم أُضيف 600 ميكرولتراً من محلول الغسل الثاني RPE المُضاف إليه الإيثانول، ثم تثفيل 15 ثانية والتخلص من الراشح. كُريت هذه الخطوة مرة ثانية تلاها تثفيل مدة 2 دقيقة. نقل العمود إلى أنبوب إندورف 1.5 مل وأُضيف 10 ميكرولتراً ماء مقطر معقم لحل RNA ضمنه بعد التثفيل مدة دقيقة. حُفظت العينات في درجة -20 مئوية، (جميع خطوات التثفيل تمت بسرعة 14000 دورة / دقيقة).

2-14-2- قياس تركيز RNA وتقدير نقاوته Measuring RNA concentration and assessing its

:purity

قيس تركيز كل عينة RNA باستعمال جهاز nanodrop على طول موجة 260nm وقدّرت نقاوته على طول

موجة 280/260 و 230/260، بمعايرة 2 ميكرولتراً للعينة، وقدّرت التراكيز بوحدة ميكروغرام/ميكرولتراً.

2-14-3- النسخ العكسي للـ RNA وتركيب الدنا المتمم cDNA : RNA reverse transcription and

cDNA synthesis:

صُنِعَ الدنا المتمم (cDNA) Complementary DNA باستعمال Gscript First-Strand Synthesis

(GeneDirex-Kit، وفق المراحل الآتية:

1. إضافة عينة RNA بتركيز (0.1-5 مكغ) إلى المزيج الأول المكون من: 1 ميكرو لتر نكليوتيدات بتركيز 10 ميلي

مولر، 1 ميكرو لتر بادئة نوعية (dT) oligo بتركيز 50 ميكرومولر، ماء مقطر معقم لإتمام الحجم إلى 13

ميكرو لتر، حُضِنَت العينات عند درجة حرارة 65 م مدة 5 دقائق.

2. أُضِفَ إلى العينات المزيج الثاني المكون من: محلول موقى (5x 1 st strand buffer) 4 ميكرو لتر، ديثيوتريول

(Dithiothreitol) (DTT) - (0.1 مول) 1 ميكرو لتر، إنزيم النسخ العكسي Gscript RTase 1 ميكرو لتر، ماء

مقطر معقم لإتمام الحجم النهائي إلى 20 ميكرو لتر.

3. حُضِنَت العينات بدرجة حرارة 55 م ضمن جهاز Thermo-mixer مدة 55 دقيقة، وبعدها رُفَعَت حرارته لدرجة

70 م مدة 15 دقيقة.

4. حَفِظَت العينات عند درجة حرارة -20 م لحين إجراء التجربة التالية.

2-14-4- تقدير التعبير المورثي باستعمال تقانة RT-qPCR:

Gene expression estimation using RT-qPCR technique:

أُجْرِيت دراسة التعبير المورثي للمورثة الهدف target gene: CotA والمورثة المرجعية reference gene:

16S rRNA، تسلسل المورثات في الجدول 7، باستعمال جهاز (AriaMx Real-time PCR System from Agilent

(GeneDirex- Kit- Rox I EVA Green q-PCR System technologies, USA)، باستعمال مزيج التفاعل

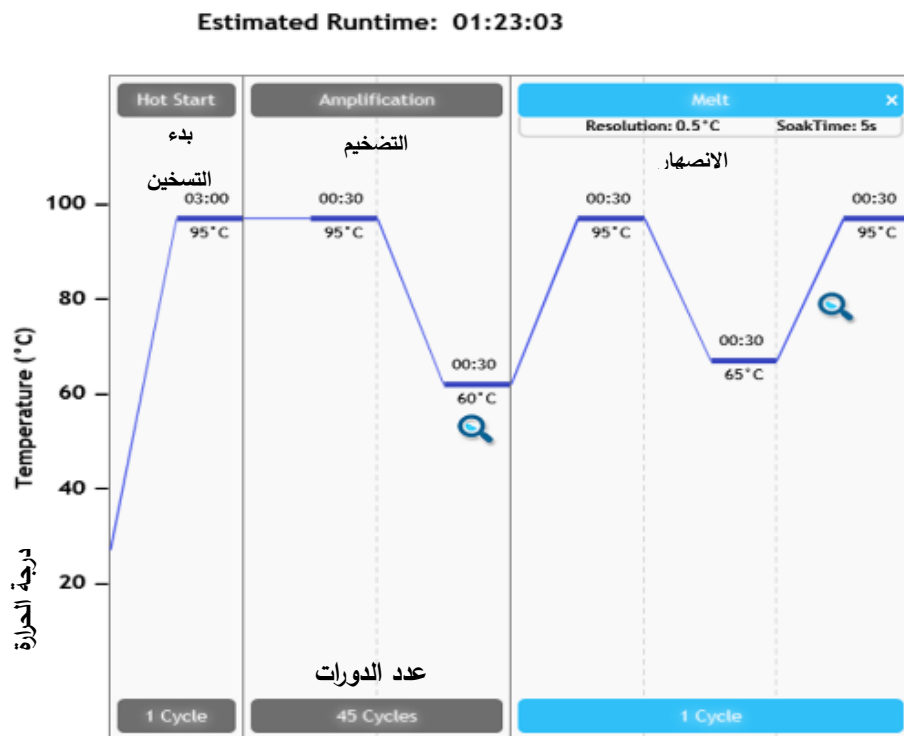
(Taiwan)؛ المواد الكيميائية المستعملة في التفاعل موضحة في الجدول 8. وفق الخطوات الموضحة بالشكل 10.

الجدول 7: تسلسل البادئات المستعملة في الكشف الجزيئي باستعمال RT-qPCR.

المورثة الهدف	Primers البادئات	التسلسل النكليوتيدي Oligo Sequence (5' - 3')	حجم ناتج PCR Amplicon(bp)
CotA	Cot A –Forword	AGTTTATCCCGGCCCTACCT	161
	Cot A- reverse	CTCCGTGCAAATGAACGACC	

الجدول 8: تراكيز وأحجام المواد الكيميائية المُستعملة في تفاعل RT-qPCR.

الحجم	التركيز	المادة الكيميائية
10µl	1x	مزيج إيفاغرين EVA Green q-PCR System Rox I
1µl (لكل بادئة)	10µM	البادئات Forward & reverse primers
3µl	10/1	cDNA عينة
5µl		ماء مقطر معقم
20 µl الحجم النهائي للتفاعل		



الشكل 10: برنامج عمل جهاز RT-PCR.

قُدِّر التغير الكمي في التعبير المورثي من خلال حساب RQ (relative quantification)، بطريقة $2^{-\Delta\Delta CT}$

حيث:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{sample}) - \Delta CT(\text{control}), \Delta CT = CT(\text{target gene}) - ct(\text{reference gene})$$

2-15- معايرة البروتينات الكلية في الخلايا الجرثومية المُعاملة بالأفلاتوكسين B1 وفصلها بطريقة

الرحلان الكهربائي على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-PAGE:

Total protein titration in aflatoxin B1-treated bacterial cells and separation by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis:

أُجريت دراسة البروتينات الكلية المعزولة من الخلايا الجرثومية للنوع *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6

في نهاية تجربة تقييم كفاءتها في تفكيك الأفلاتوكسين B1، بهدف مقارنتها مع الملف البروتيني العام للسلالة ذاتها

المنمأة ضمن وسط زرع LB، حيث حُلَّت رسابة كل من العينة المدروسة والشاهد في 40 ميكرو لتر من محلول

PBS (1x)، ثم أُضيف لكلا العينتين 25 ميكرو لتر من دائرة معالجة العينة 5x، ثم سُخنت الأنابيب الحاوية على العينات في وعاء يحوي ماء مغلي لمدة 10 دقائق.

حُدد تركيز البروتينات الكلية المُستخلصة من السلالة الجرثومية بطريقة برادفورد (Bio-Rad)، حيث تعتمد هذه الطريقة على تفاعل الصبغة في الكاشف مع البروتينات في الوسط المعتدل وتشكيل معقد أزرق اللون، إذ تم مزج 100 ميكرو لتر من العينة وإضافتها إلى 900 ميكرو لتر من الكاشف، حُضن المزيج مدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة. قيس الامتصاصية على طول موجة 595 نانومتر، باستعمال جهاز مقياس الطيف الضوئي (6850 UV/VIS. Spectrophotometer, JENWAY, UK).

تم تقدير تركيز البروتين في العينات بالاعتماد على سلسلة معيارية تم إنشاؤها باستعمال محلول بروتين الكازئين العياري BSA (2 ميكروغرام/ ميكرو لتر)، بلغت تراكيز السلسلة المعيارية التي جرى تحضيرها بحجم نهائي 1000 ميكرو لتر: 10،8،6،4،2،0 ميكروغرام/ ميكرو لتر. تم توحيد تراكيز العينات بهدف فصلها على هلامة بتركيز ثابت 500 ميكروغرام/ ميكرو لتر.

تم فصل العينات البروتينية على هلامة SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide) باستعمال جهاز الرحلان الكهربائي Gel electrophoresis (Electrophoresis, Cleaver, UK)، يعتمد مبدأ هذه الطريقة على فصل البروتينات عن بعضها اعتماداً على الكتلة الجزيئية النسبية، حيث تعمل مادة فوسفات دودسيل الصوديوم SDS على تفكيك البنية الثلاثية للبروتينات وشحنها بشحنة سالبة، بينما يعمل مركب β -Mercaptoethanol على تحطيم الجسور الكبريتية، عند وصل التيار الكهربائي ترحل البروتينات من القطب السالب إلى القطب الموجب على الهلامة. يوضح الجدول 9 المواد المستعملة في الرحلان الكهربائي للبروتينات.

الجدول 9: المواد المُستعملة في الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلام SDS-PAGE

المكونات	المواد المُستعملة
1 غرام SDS 10%، 1.5 مل Tris-HCl (16 ميلي مولر)، 2.5 غليسرول (25%)، 5 ملغ أزرق بروموفينول Bromophenol blue (0.05%)، 0.5 مل β -Mercaptoethanol، ماء مقطر لإتمام الحجم.	دائرة معالجة العينة 5x (10 مل)
29.2 غرام Acrylamide 0.8 غرام N'N'-bis-methylene-acrylamide	30% Acrylamide\Bis (100 مل)
18.5 غرام / 100 مل (تمت معايرة درجة الحموضة قبل إتمام الحجم)	محلول موقتي (100 مل) 1.5 M Tris-HCl, pH, 8.8
6 غرام / 100 مل	محلول موقتي (100 مل) 0.5 M Tris-HCl, pH, 6.8
10%	APS (Amomonium Persulfate)
0.1%	TEMED (Tetramethylethylenediamine)
10%	SDS
3 غرام Tris-base، 14.1 غليسين Glycine، 1 غرام SDS	دائرة الرحلان 1x (1000 مل) (Running Buffer)
0.25 غرام صبغة أزرق الكوماسي Coomassie Brilliant blue R	ملون الهلام (100 مل)

10 مل حمض الخل الثلجي - 50 مل ميثانول - 40 مل ماء مقطر.	
300 مل ميثانول - 100 مل حمض الخل الثلجي - 600 مل ماء مقطر.	مزيج اللون (1000 مل)

حضرت هلامة الفصل بتركيز 15% كما يوضح الجدول 9، ثم صُبت قي قالب الهلامة بين الصفيحتين الزجاجيتين، ثم أُضيف بعدها مباشرة 1 مل من الإيزوبروبانول iso-propanol الذي يعمل على تسوية سطح الهلامة، بعد 10 دقائق لُوحظ تبلمر الهلامة، تم التخلص من الإيزوبروبانول بإمالة القالب، ثم تم الغسل بالماء المقطر للتخلص من آثاره. حضرت هلامة التجميع 5% كما يبين الجدول 10 ثم صُبت فوق هلامة الفصل.

الجدول 10: مكونات هلامة الفصل 15%، وهلامة التجميع 5%

المكونات	الكمية
هلامة الفصل 15%	
(30%) Acrylamide\Bis	2.5 مل
1.5 M Tris-HCl, pH, 8.8	1.25 مل
SDS	50 ميكرو لتر
TEMED	10 ميكرو لتر
APS	50 ميكرو لتر
ماء مقطر	1.2 مل
هلامة التجميع 5%	
(30%) Acrylamide\Bis	850 ميكرو لتر

1.25 مل	0.5 M Tris-HCl, pH, 6.8
50 ميكرو لتر	SDS
10 ميكرو لتر	TEMED
50 ميكرو لتر	APS
2.85 مل	ماء مقطر

تم حفر الآبار باستعمال أمشاط، وتركبت الهلامية لتتبلر، ثم نُزعت الأمشاط بحذر ونُقلت الصفائح الزجاجية

الحاوية على هلامية الترحيل إلى حوض الرحلان، ثم صُب فوق قالب الترحيل دائرة الرحلان.

في بداية الترحيل حُمِلت العينات في الآبار، كما حُمِل في البئر الأول 5 ميكرو لتر مقياس الأوزان الجزيئية

KDa 180 Protein ladder (Jena Bioscience). رُحِلت العينات تحت تأثير 100 فولط إلى حين دخولها في هلامية

الفصل، ثم رُفعت الفولطية تدريجياً إلى 140 فولط. في نهاية الرحلان تم نزع الهلامية من الصفائح وإضافتها إلى وعاء

يحتوي صبغة ملون الهلامية مدة ساعة، تلا ذلك عملية نزع اللون بغسل الهلامية بمحلول مزيل اللون، تم تكرار الغسل

مرات عدة.

2-16 - تقييم المقدرة الجرثومية في الحفظ الحيوي للغذاء بشروط المختبر Evaluating the microbial

:capacity for food biopreservation under laboratory conditions

بعدما أثبتت جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 سيطرة حيوية عالية في ضبط نمو الفطر ومنع

تبوغه، ومقدرة متميزة في تفكيك الأفلاتوكسين، أُجريت تجربة بغية اختبار كفاءتها في الحفظ الحيوي للمادة الغذائية

وحمايتها من الإصابة الفطرية، ولهذا الغرض اختيرت عينة رز، وُزن مقدار 10 غ من حبات الرز، تم تعقيمها باستعمال

الكحول الإيثيلي 75%، ثم غسلها مرات عدة بالماء المقطر المعقم؛ للتخلص من آثار الكحول. ثم تركت العينات

لتجف.

تم تصميم التجربة على مكررين، حيث وُزعت حبات الرز على أطباق بتري عقيمة في كل مكرر؛ نُفّح طبق اختبار المقدرة الجرثومية بنصف مل من المعلق الجرثومي، إضافة إلى نصف مل من المعلق البوغي لفطر *A. flavus*، أما في طبق الشاهد تم تلقيح حبات الرز بالمعلق البوغي فقط. حُضنت الأطباق في حاضنة درجة حرارتها 30 م°، مدة أسبوع، تم خلالها تتبع نمو الفطر وتبوغه، والتأثير الجرثومي المُحتمل.

الدراسة الإحصائية Statistical study:

تم استعمال برنامج الإكسل Excel لرسم المخططات البيانية، كما تم استعمال برنامج خاص بقراءة النتائج النكليوتيدي (Chromas- version 2.6.6) لتحليل نتائج التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية.

استُعمل برنامج spss V25 لمعالجة البيانات إحصائياً وتحليلها. اعتمد اختبار one sample t test لمعرفة الفروق المعنوية في درجة الحموضة pH ومحتوى المادة العضوية بين عينات التربة في محافظتي القنيطرة والحسكة، بينما اعتمد اختبار one Way Anova لدراسة الفروق المعنوية بين المكررات في جميع عينات التربة.

كما درس الارتباط بين قيم درجة الحموضة pH ومحتوى المادة العضوية بين عينات التربة وفق معامل بيرسون، حيث كانت قيمة مستوى الدلالة $P < 0.05$.

كما اعتمد اختبار Repeated Measures ANOVA وذلك لمعرفة الفروق المعنوية للكثافة الجرثومية بين المناطق الأربعة خلال أسابيع التجربة قبل وبعد تلقيح التربة.

ولمعرفة الفروق المعنوية بين نسب التنشيط الحيوي للعزلات الجرثومية في عينات التربة المختلفة أُجري أيضاً اختبار one Way Anova.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

3-1- تحليل عينات التربة Soil samples analysis:

3-1-1- درجة الحموضة pH:

تم قياس درجة الحموضة لعينات التربة، تراوحت القيم المقاسة بين 7.6 إلى 8.6، ما يشير إلى أن جميع العينات تقع ضمن المجال القلوي للتربة الشكل 11.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسطات درجة الحموضة في الموقعين بين جميع عينات التربة عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

تُعد هذه البيئة القلوية مناسبة لنمو العديد من أنواع الجراثيم، لاسيما تلك التابعة لأجناس *Bacillus*، مما يعزز من فرص عزل سلالات ذات كفاءة حيوية في التنشيط الفطري أو تفكيك السموم (Zou, et al., 2024). إذ تبين الدراسات أن لدرجة الحموضة دور في التأثير على بنية المجتمع الميكروبي في التربة، وبالتالي على الخصائص الحيوية للسلاسل الجرثومية المعزولة من تلك الترب (Cho, et al., 2016, Xiong, et al., 2024).

3-1-2- تحليل محتوى المادة العضوية في الترب:

أظهرت نتائج تحليل محتوى المادة العضوية في عينات التربة المدروسة تفاوتاً ملحوظاً، حيث تراوحت القيم بين 1.04-4.8 %، كما هو موضح في الشكل 11.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسطات محتوى المادة العضوية في الموقعين بين جميع عينات التربة عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

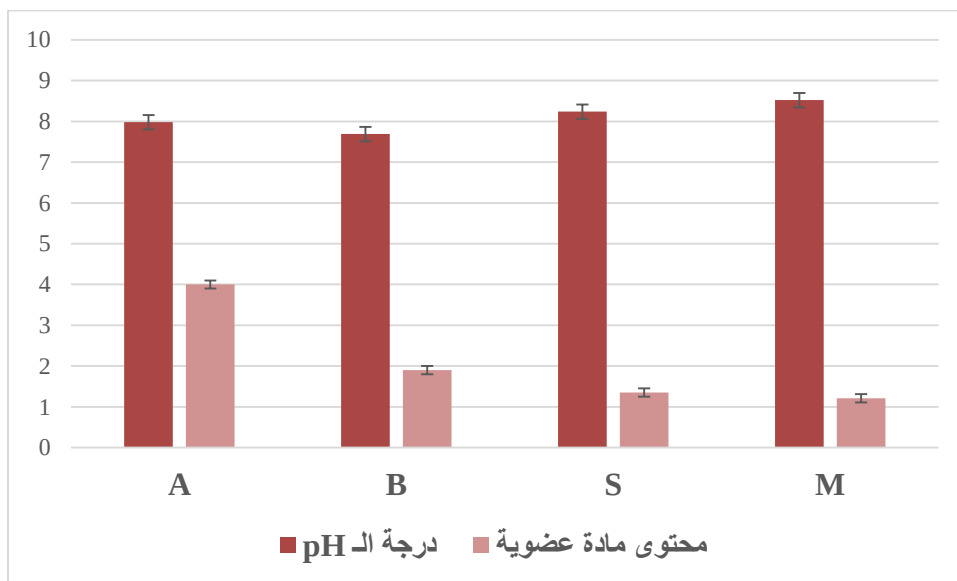
تعكس هذه النتائج اختلاف الخصائص الفيزيائية والكيميائية للترب المدروسة، الذي قد يُعزى لاختلاف طبيعة الموقع الجغرافي، ونوع الغطاء النباتي، والنشاط الزراعي في الترب المدروسة. وتُعد هذه النسب مؤشراً مهماً على خصوبة التربة وقدرتها على دعم النشاط الميكروبي، فبحسب منظمة الأغذية والزراعة للأمم المتحدة (FAO)، إن ارتفاع

محتوى المادة العضوية يرتبط غالباً بزيادة وفرة الكائنات الدقيقة ونشاطها الحيوي، مما يعزز فرص عزل سلالات جرثومية ذات فعالية حيوية محتملة (Bot and Benites, 2005).

بينت نتائج الدراسة الإحصائية وجود ارتباط سلبي ضعيف بين درجة الحموضة في عينات التربة ومحتوى المادة العضوية ضمنها حسب معامل بيرسون، إذ بلغت قيمته (-0.4)، (الجدول الإحصائية في ملحق الرسالة).

يمكن تفسير ذلك عندما يتم تفكيك المادة العضوية ينتج عن ذلك مجموعة من الأحماض العضوية؛ مما يسهم

بانخفاض درجة حموضة التربة.



الشكل 11: نتائج تحليل درجة حموضة عينات التربة، ومحتواها الكلي من المادة العضوية %

ترب محافظة القنيطرة (ترب دوار الشمس A، ترب الذرة B)، ترب محافظة الحسكة (ترب القمح S، ترب القطن M)

3-2- إفراز فطر *Aspergillus flavus* للأفلاتوكسين B1

:Secretion of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*

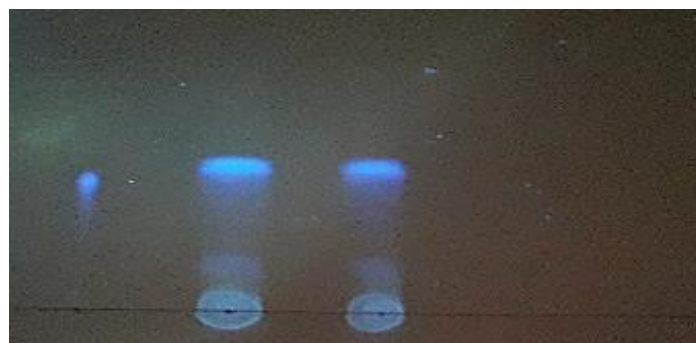
أظهرت نتائج اختبار مقدرة فطر *A.flavus* السلالة NRRL 3357 على إفراز الأفلاتوكسين B1 غزارة شديدة

في إفراز السم في أوساط متنوعة: "ديسكتروز البطاطا السائل، عينة تربة، عينة رز"، يوضح الشكل 12 (A,B,C)

نتائج إفراز فطر *A. flavus* للأفلاتوكسين B1 حيث يظهر تألق العصابة باللون الأزرق تحت أشعة الـ UV بعد الترحيل على صفيحة TLC.

تتوافق النتائج مع الدراسات التي تؤكد إفراز فطر *A. flavus* لمجموعة واسعة من المستقلبات الثانوية أكثرها

خطورة السموم المسرطنة (الأفلاتوكسينات) (Nierman, et al., 2015, Cary, et al., 2018, Rajarajan, et al., 2021)



Aflatoxin B1
الأفلاتوكسين العياري
1ميكرو لتر

S
15 ميكرو لتر

A.

S: العينة، الأفلاتوكسين المُستخلص من وسط الزراعة السائل
تركيز الأفلاتوكسين B1 العياري: 20 نانوغرام/ميكرو لتر



Aflatoxin
B1
1ميكرو لتر

S1

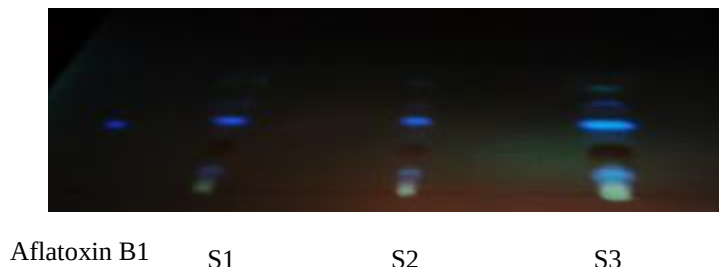
S2

S3

S4 S5

B.

S1: 1ميكرو لتر من العينة المُستخلصة (الأفلاتوكسين B1 المفرز بواسطة الفطر المزروع في عينة التربة).
S2: 5 ميكرو لتر من العينة المستخلصة، S3: 10 ميكرو لتر من العينة المستخلصة.
S4: 15 ميكرو لتر من العينة المستخلصة، S5: 20 ميكرو لتر من العينة المستخلصة.



C.

S1: 1 ميكرو لتر من العينة المستخلصة (الأفلاتوكسين B1 المفرز بواسطة الفطر المزروع في عينة الرز).
S2: 1 ميكرو لتر من العينة المستخلصة بعد التمديد عشر مرات، S3: 4 ميكرو لتر من العينة المستخلصة بعد التمديد

الشكل 12 : صور صفائح TLC التي توضح نتيجة إفراز فطر *A. flavus* للأفلاتوكسين B1 في أوساط متنوعة عند تألقها تحت أشعة UV.

3-3- دراسة تأثير فطر *A. flavus* في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة

:of *A. flavus* on the structure of the microbial community in soil samples

بينت نتائج الدراسة كثافة المجتمع الجرثومي المعزول من عينات الترب المدروسة الأشكال (13،14،15،16)؛

والتي انخفضت كثافتها بشكل ملحوظ بعد تلقيح الترب بالفطر .

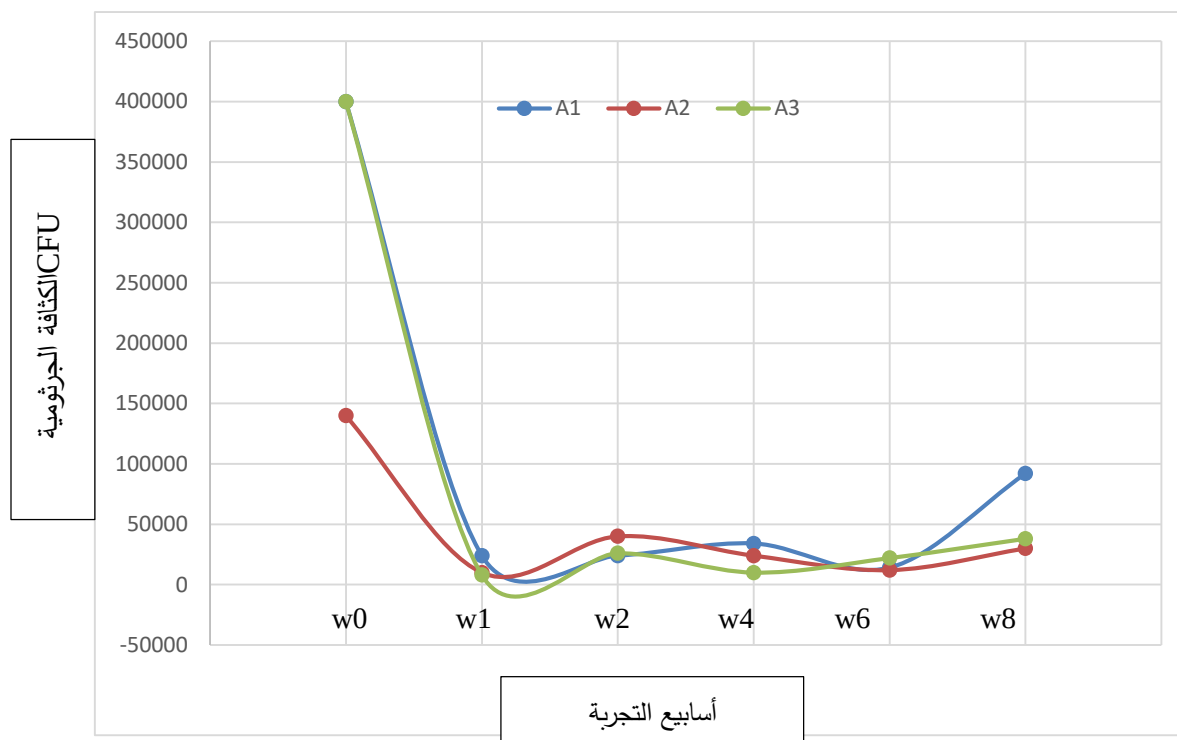
إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين قيم الكثافة الجرثومية في الموقعين بين جميع عينات التربة عند قيمة

المعنوية $P < 0.05$ (ملحق الرسالة).

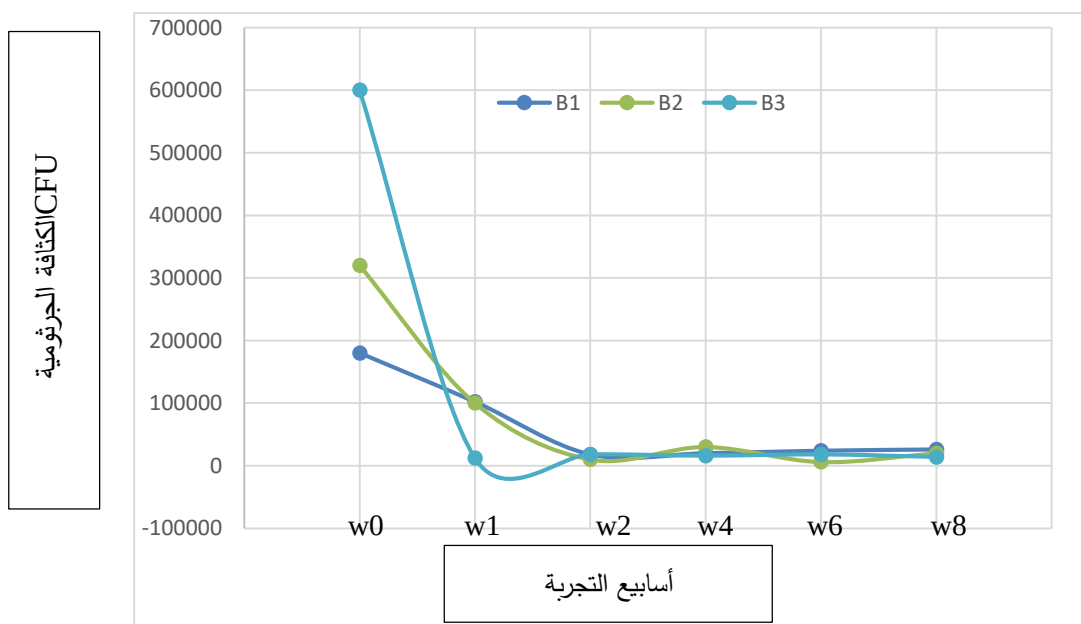
يُفسر ذلك لسيطرة الفطر الحيوية وإفرازه لسمومه في الترب مما سمح بانتخاب الأنواع الجرثومية القادرة على

التعايش مع الفطر بالنمو إلى جانبه في الوسط، أو الأنواع التي تمتلك مقدرة حيوية تمكنها من الحد من نمو الفطر

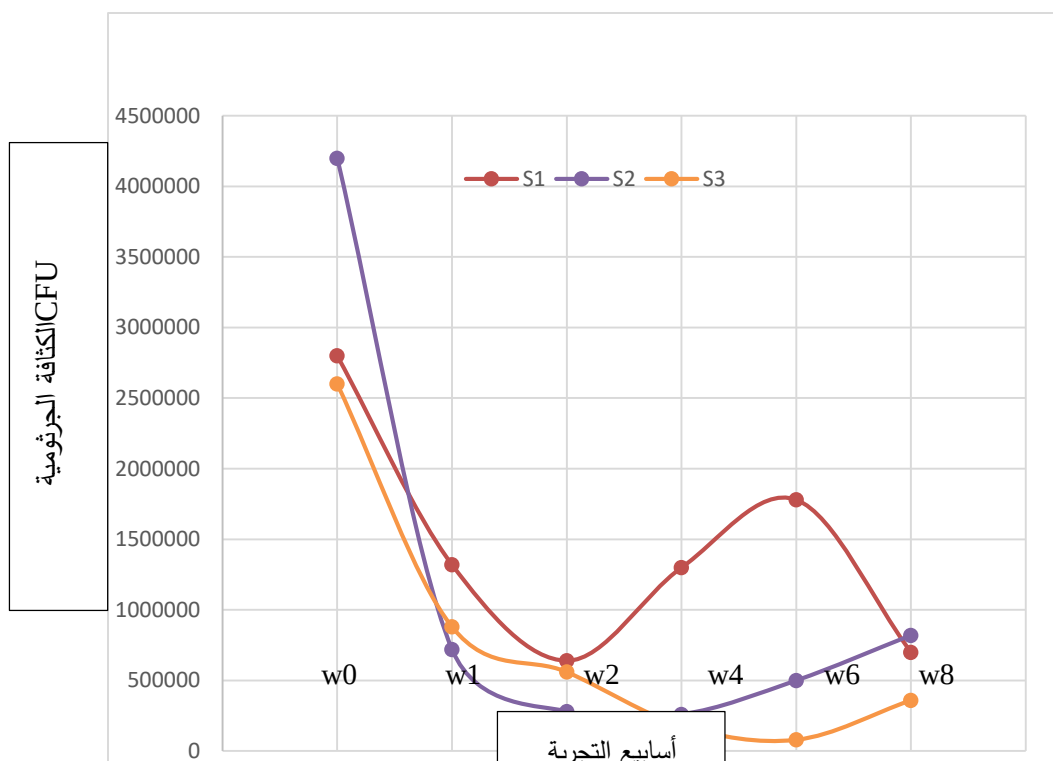
وكبح إفرازه لسمه.



الشكل 13: تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة موقع القنيطرة تربة دوار الشمس A1, A2, A3



الشكل 14: تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة موقع القنيطرة تربة الذرة B1, B2, B3



الشكل 15: تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة موقع الحسكة تربة القمح S1,S2,S3



الشكل 16: تأثير الفطر في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة موقع الحسكة تربة القطن M1,M2,M3

3-4- اختبار التثبيط الحيوي لفطر *A. flavus* ومقدرة الجراثيم على الحد من إفرازه للأفلاتوكسين B1:

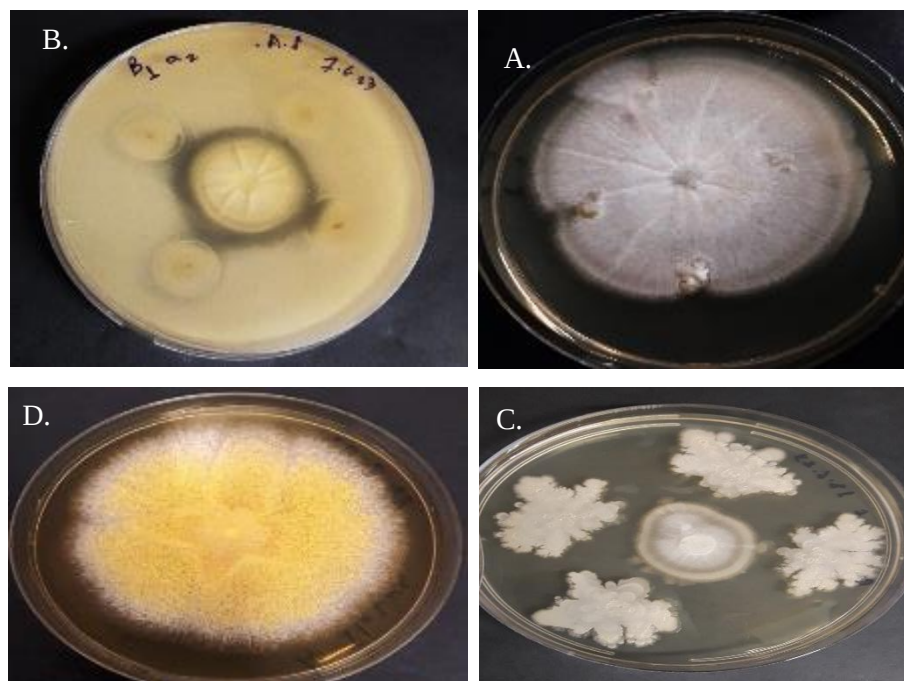
Bioinhibition test of *A. flavus* and the ability of bacteria to reduce its aflatoxin B1 secretion

أثر فطر *A. flavus* في بنية المجتمع الجرثومي في عينات الترب المدروسة، وقد انتُقيت العزلات الجرثومية المتعايشة في الترب إلى جانب الفطر؛ بعد تنقية العزلات تم اختبار فعاليتها التضادية على الوسط الزرعي، والتي تباينت بين غياب مقدرة التثبيط الحيوي عند بعض العزلات الجرثومية؛ إذ نمت الأفضورة Mycelium على حساب المستعمرات الجرثومية وتوسع نموها بكامل وسط الزراعة الشكل (A،17)، كما ظهرت نتائج مميزة للتضادية الحيوية إما بحد نمو الفطر وتشكيل هالة تثبيط حول المستعمرة الفطرية الشكل (B،17)، أو بحصر نموه ومنع تبوغه دون تشكيل هالة حوله الشكل (C، 17). جميع نتائج دراسة التضادية تمت مقارنتها بنمو مستعمرة الفطر الشاهد الشكل (D،17).

عُزل إحدى وتسعون عزلة جرثومية من عينات تربة موقعي القنيطرة A,B قبل تلقيحها بالفطر، وتمت التجربة على جميع العزلات الجرثومية خلال أسابيع التجربة الثمانية. تبين من خلال تجربة دراسة التضادية الحيوية فاعلية إيجابية لسبع عزلات جرثومية فقط من إجمالي العزلات؛ كما تزامنت كفاءة تثبيط نمو الفطر وتبوغه مع المقدرة على كبح إفراز الفطر للأفلاتوكسين B1 في الوسط الزرعي السائل. أما ترب موقع الحسكة S,M فقط لوحظ فيها انخفاض التنوع الجرثومي وفق الناحية المورفولوجية حيث عُزل اثنتان وخمسون عزلة جرثومية، انتُقي منها تسع عشرة عزلة جرثومية تفوقت في تثبيط نمو الفطر وحدت من إفرازه للسم في وسط الزراعة.

فيما يتعلق بتجربة عزل الأنواع الجرثومية المتعايشة في الترب المُعاملة مع الأفلاتوكسين B1، تم انتخاب أربع عزلات جرثومية من أصل سبع عشرة عزلة، تبعاً لإيجابية فاعليتها التضادية من جهة ومقدرتها على منع الفطر من إفرازه للأفلاتوكسين من جهة أخرى. يلخص الجدول 11 نتائج الفاعلية التضادية للعزلات الجرثومية المتباينة وفق نسبة

التثبيط الحيوي Bioinhibition.



الشكل 17: نتائج اختبار التضادية الحيوية لعزلات جرثومية مقارنة مع مستعمرة الفطر الشاهد، A. غياب التضادية مع ملاحظة نمو الفطر على حساب المستعمرات الجرثومية، B. تضادية حيوية إيجابية لأحد العزلات الجرثومية بملاحظة تشكل هالة تثبيط حول الفطر، C. تضادية حيوية إيجابية لأحد العزلات الجرثومية إذ لوحظ الحد من نمو الفطر إضافة إلى تثبيط تبوغه، D. مستعمرة فطر *A. flavus* الشاهد.

الجدول 11: العزلات الجرثومية التي أثبتت فاعلية تضادية ضد الفطر وتمكنت من تثبيط إفرازه للسلم B1

الموقع	العزلة الجرثومية	هالة التثبيط (+وجود/-غياب)	قطر مستعمرة الفطر (مليمتر)	نسبة التثبيط
موقع القنيطرة A,B	A3b0	-	22	60%
	B1a0	+ قطر الهالة 26	18	67.2%
	B1b0	+ قطر الهالة 20	14	74.5%
	B1c0	-	29	47.2%
	B2p0	-	10	81.8%
	A2b2	-	30	45.4%
	B1a2	+	24	56.3%

قطر الهالة 37				
				موقع الحسكة S,M
%50.9	27	–	M2bo	
%70.9	16	–	S1b1	
%81.8	10	+	S1c1	
		قطر الهالة 23		
%78.1	12	–	S2a1	
%78.1	12	–	M1b1	
%90.9	5	+	M2a1	
		قطر الهالة 10		
%90.9	5	–	M2b1	
%81.8	10	+	M3a2	
		قطر الهالة 13		
%81.8	10	+	S1b3	
		قطر الهالة 20		
%81.8	10	+	S2a3	
		قطر الهالة 20		
%47.2	29	–	S3a3	
%81.8	10	+	M1a3	
		قطر الهالة 14		
%87.2	7	+	M1a4	
		قطر الهالة 25		
%81.8	10	+	M1b4	
		قطر الهالة 26		
%87.2	7	+	S1a6	
		قطر الهالة 20		
%87.2	7	+	S2a6	
		قطر الهالة 15		

%78.1	12	+	S2b6	
		قطر الهالة 31		
%81.8	10	+	M1a6	
		قطر الهالة 24		
%87.2	7	+	S2a8	
		قطر الهالة 11		
العزلات الجرثومية المتعايشة في التربة المُعاملة بالأفلاتوكسين B1:				
%61.8	21	+	A2B	A,B
		قطر الهالة 23		
%78.1	12	-	B3A	S,M
%81.8	10	-	S1A	
%81.8	10	+	S1B	
		قطر الهالة 25		

تؤكد الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين نسب التنشيط الحيوي الجرثومي عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

3-5- المقدرة الجرثومية على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1:

Bacterial capacity for the biodegradation of aflatoxin B1:

عُزل ثلاثون عزلة إيجابية الكفاءة في تثبيط الفطر والحد من إفراز سمومه، تمت غربلة العزلات بعد إجراء اختبار لمقدرتها على تفكيك الأفلاتوكسين B1، بينت نتائج التجربة تفوق خمس عزلات جرثومية فقط؛ والتي أظهرت تقدراً مميزاً في النمو بالوسط الفقير بالمغذيات والحاوي على الأفلاتوكسين كمصدرٍ وحيدٍ للكربون والطاقة، بعد تتبع تفكك الأفلاتوكسين أسبوعياً لمدة ثمانية أسابيع، تبين اختفاء تآلق الأفلاتوكسين B1 على صفيحة TLC في وسط زراعة العزلات S2a1, S2b6؛ مما يدل على مقدرتها على تفكيكه لأدنى تركيز، أما العزلات الثلاث A2b2, B1a2, S1A، لوحظ انخفاض التآلق بوضوح مما يدل على مقدرة العزلات الجرثومية على تفكيك الأفلاتوكسين جزئياً، وذلك مقارنة بالأفلاتوكسين العياري الشكل 18.



الشكل 18: صورة تمثيلية توضح تباين نتائج المقدره الحيوية للعزلات الجرثومية على تفكيك الأفلاتوكسين B1

A. 1 ميكرو لتر من الأفلاتوكسين العياري، B. 15 ميكرو لتر من التجربة الشاهد (وسط PBS ملقحاً بالأفلاتوكسين)، C. 15 ميكرو لتر من عينة S2a1
D. 15 ميكرو لتر من عينة A2b2، E. 15 ميكرو لتر من عينة S2b6، F. 15 ميكرو لتر من عينة أحد العزلات سلبية مقدره التفكيك.

3-6- التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية التي أبدت أعلى كفاءة في الفاعلية التضادية والتفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1:

Molecular characterization of the bacterial isolates that showed the highest antagonistic activity and biodegradation of aflatoxin B1:

وصّفت العزلات الجرثومية الخمس ذات التأثير الفعّال والتي فاقت قدراتها تثبيط نمو الفطر والحد من سميته إلى تفكيك أشد الأفلاتوكسينات سمية والأكثر مقاومة لعمليات المعالجة جزيئياً اعتماداً على التتالي النكليوتيدي للمورثة 16s rRNA، تبين انتماؤها إلى الأنواع الآتية: *Delftia acidovorans*، *Bacillus licheniformis*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus anthracis* الجدول 12، بعد الحصول على نتائج التوصيف تم استبعاد السلالة S1A التي تنتمي لنوع *Bacillus anthracis* بسبب إمرضيتها المحتملة.

الجدول 12: نتائج التوصيف الجزيئي للعزلات الجرثومية

العزلة	النوع الجرثومي الموصّف	نسبة التشابه %	الرقم التعريفي
A2b2	<i>Delftia acidovorans</i>	98.81	PQ533193
B1a2	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.07	PQ533194
S2a1	<i>Bacillus subtilis</i>	98.28	PQ533196
S2b6	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.95	PQ533197
S1A	<i>Bacillus anthracis</i>	95.98	PQ533195

3-7- الكشف الدقيق عن مقدرة السلالات الجرثومية المنتخبة على تفكيك الأفلاتوكسين B1:

Accurate detection of the ability of selected bacterial strains to degrade aflatoxin B1:

بينت نتائج التجربة مقدرة مميزة للسلالات الجرثومية على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 خلال أسابيع

التجربة، كانت أعلى نسبة تفكيك للنوع الجرثومي *Bacillus subtilis* مقدرة بنسبة 94.85% حيث تبين اختفاء التآلق

في نهاية التجربة، تلاها النوع الجرثومي *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 بنسبة تفكيك مميزة كما كانت أسرع

في مقدرتها على التفكيك؛ حيث لوحظ اختفاء التآلق في الأسبوع السادس من التجربة.

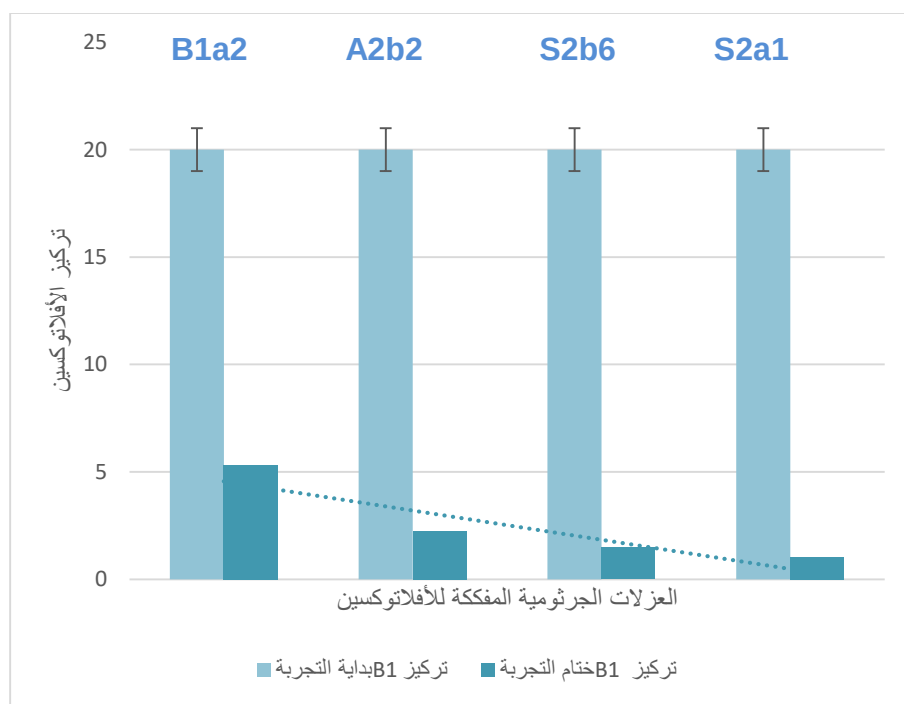
من الجدير بالملاحظة تباين نسبة التفكيك الحيوي لدى سلالتين مختلفتين تنتميان لنفس النوع الجرثومي B.

licheniformis الجدول 13 يلخص نتائج التفكيك الحيوي، كما يوضح المخطط البياني في الشكل 19 الفروقات

بتركيز الأفلاتوكسين البدائي ونتيجة التركيز في نهاية التجربة.

الجدول 13: نتائج التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1

	النوع الجرثومي	السلالة	نسبة التفكيك %
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	S2a1	94.85%
2.	<i>Bacillus licheniformis</i>	S2b6	92.55%
3.	<i>Delftia acidovorans</i>	A2b2	87.90%
4.	<i>Bacillus licheniformis</i>	B1a2	73.40%



الشكل 19: نتيجة التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين والفرق بين التركيز الأولي والتركيز النهائي في نهاية التجربة بعد ثمانية أسابيع.

تؤكد الأبحاث العلمية السابقة على الدور الحيوي المميز الذي تؤديه الأنواع الجرثومية الموصفة في دراستنا على مستوى مقدرة المعالجة الحيوية للسموم، إذ تبين دراسة (Shetty, et al., 2015) مقدرة جراثيم *Delftia acidovorans* المعزولة من التربة على التفكيك الحيوي لأحد مركبات الهيدروكربونات العطرية Phenanthrene وهو أحد الملوثات البيئية الشائعة، كما تشير الدراسات لمقدرتها على تحويل المعادن السامة كشوارد السيلينيوم والكروم إلى منتجات أقل خطورة (Ubalde, et al., 2012).

كذلك أثبتت نتائج أبحاث سابقة كفاءة النوع الجرثومي *Delftia acidovorans* في عمليات المعالجة الحيوية (Park and Lee, 2010, Kučić Grgić, et al. 2021, Bule Možar, et al., 2023).

توافقت نتائج البحث مع دراسات سابقة تمحورت حول تفوق النوعين الجرثوميين: *B. subtilis*، *B. licheniformis* في التنشيط الحيوي للفطر *Aspergillus flavus*، من جهة كبح نموه الإعاشي ومنعه من التبوغ، والحد من إفرازه لسمومه من جهة أخرى.

حيث تشير الأبحاث السابقة إلى كفاءة جراثيم *Bacillus licheniformis* في مكافحة العوامل الممرضة للنباتات لاسيما الفطريات المفترزة للسموم (Gomaa and Technology, 2013, Jeong, et al., 2017, Ling, et al., 2022).

تميزت جراثيم *Bacillus licheniformis* بتنوع مقدراتها الحيوية؛ فمن ناحية تثبيطها الحيوي للفطر السام توافقت نتائج البحث حول إيجابية التضادية الحيوية مع نتيجة دراسة في عام 2019 أكدت على دورها الحيوي الفعال في تثبيط أنواع من الفطريات السامة تنتمي لجنسي *Aspergillus, penicillium* (Ul Hassan, et al., 2019).

كما تفوقت السلالتان التابعتان لجراثيم *Bacillus licheniformis* بقدرتها على كبح إفراز فطر *A. flavus* للأفلاتوكسين وبذلك توافقت نتائج البحث مع دراسة (Risan and Muhsin, 2015) التي أكدت على كفاءتها في خفض مقدرة الفطر على إفراز الأفلاتوكسين B1 واختلفت مع نتائج هذه الدراسة من حيث نسبة تثبيط نمو الفطر إذ بلغت 85% أما في دراستنا فتم تقدير نسبة التثبيط للسلالتين التابعتين S2b6, B1a2 لذات النوع 56.3%، 78.1% على الترتيب.

كما توافقت نتائج دراستنا التي بينت كفاءة جراثيم *B. licheniformis* في هدم مركب الأفلاتوكسين مع دراسات سابقة متعددة؛ إذ أثبتت دراستي (Rao, et al., 2017, Wang, et al., 2018) انخفاض تركيز الأفلاتوكسين بنسبة عالية بعد المعاملة بالمستخلص الخالي من الخلايا.

كما تمتاز جراثيم *Bacillus subtilis* بمقدرات حيوية مميزة لهذا النوع، حيث أكدت دراسات عديدة دورها في التثبيط الحيوي للفطريات السامة التابعة لأجناس *Aspergillus, Fusarium, Alternaria* (Kim and Park 2024, Narmukhamedova, et al., 2024)، كما بينت دراسة أجريت في عام 2016 استعمال المستخلص الميثانولي للسائل الخلوي الطافي لجراثيم *Bacillus subtilis* السلالة UTBSP1 في المعالجة الحيوية لحبات الفستق (Farzaneh, et al., 2016).

كذلك بينت دراسة مقدرة النوع الجرثومي *B. subtilis* على تثبيط نمو فطر *Aspergillus parasiticus* وتفكيك الأفلاتوكسين B1, G1 بنسبة 60% (Siahmoshteh, et al., 2016)، كما تشير دراسة أجريت في عام 2017 أن

السلاسل الجرثومية JSW-1 تابعة للنوع *B. subtilis* عُزلت من التربة تمكنت من تثبيط فطر *Aspergillus flavus* بنسبة 58.3% إلى جانب تفكيكها لمركب B1 بنسبة 67.2%، وعُزي نشاط التفكيك لإنزيمات خارج خلوية (Xia, et al., 2017).

كما أثبتت أحدث الأبحاث دور السلالة E11 التابعة لنوع *Bacillus subtilis* في السيطرة الحيوية على فطر *A. flavus* بهدف الحد من عدوى المحاصيل المعرضة للإصابة لاسيما توابل الفلفل الحار، إضافة لقيامها بنزع سمية الأفلاتوكسين B1 بنسبة عالية فُدرت بنسبة 81.34% (Yuan, et al., 2023).

كذلك وصفت دراسة (Yang, et al., 2023) دور الإنزيمات المفزة خارج خلويًا بواسطة جراثيم *Bacillus subtilis* في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1.

3-8- التوصيف المجهرى والمورفولوجي للسلاسل الجرثومية عالية الكفاءة في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين:

Microscopic and morphological characterization of highly efficient aflatoxin biodegrading bacterial strains

بغية معرفة الخصائص الدقيقة المميزة للسلاسل الجرثومية التي أثبتت نشاطها الحيوي في تثبيط الفطريات السامة والتي أبدت تقوفاً ملحوظاً في التعامل مع السم وتفكيكه حيويًا في شروط المختبر، أجريت اختبارات لتوصيفها على المستوى المجهرى والمورفولوجي وخصائصها الحيوية الكيميائية في الجدول 14، كما يبين الشكل 20 نمو السلاسل الجرثومية المدروسة على وسط LB. يميز جميع الأنواع الجرثومية المدروسة شكل خلاياها العصوي مع تباين في أبعاد الخلية وطريقة تجمعها في الشكل 21، ومقدرة جميعها على الحركة كما هو موضح في الشكل 22. تتميز الأنواع الجرثومية المدروسة التابعة لجنس *Bacillus* بأنها متبوعة، لها القدرة على حل النشاء وذلك لفعالية إنزيم الأميلاز لديها كما هو موضح في الشكل 23. كما يوضح الشكل 24 نمو السلاسل الجرثومية المدروسة على وسط الآغار المدمى.

تمتلك السلاسل الجرثومية المدروسة المقدرة على تحمل الملوحة، الشكل 25 يوضح نتائج اختبار الملوحة، بالنسبة إلى نتيجة اختبار الستراز موضحة في الشكل 26، من بين السلاسل الجرثومية المدروسة فقط النوع الجرثومي *Delftia acidovorans* إيجابي الستراز.

من بين السلاسل المدروسة النوع الجرثومي *Delftia acidovorans* فقط ينتمي لسلبيات صبغة الغرام لذا وصف نموه على أوساط نوعية خاصة كما يبين الشكل 27.

الجدول 14: نتائج توصيف السلاسل الجرثومية مجهرياً ومورفولوجياً و أهم خصائصها الحيوية

النوع الجرثومي	<i>Delftia acidovorans</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>
السلالة	A2b2	B1a2	S2a1	S2b6
الفحص المجهري	عصيات مكورة سلبية الغرام، مفردة أو مزدوجة. (غير متبوعة)	عصيات إيجابية الغرام، مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل. (متبوعة)	عصيات إيجابية الغرام، تصطف بشكل خلايا مفردة أو سلاسل. (متبوعة)	عصيات إيجابية الغرام، مفردة أو مزدوجة أو بشكل سلاسل. (متبوعة)
التوصيف المورفولوجي على وسط الزراعة	مستعمرات جرثومية دائرية، متعرجة الحواف، قليلة الارتفاع، لامعة بلون أصفر كريمي، ملساء.	مستعمرات بيضاء اللون، مجمدة، الحواف مشرشرة، مسطحة وخشنة.	مستعمرات بيضاء اللون شاحبة، مجمدة، متعرجة ومتفرعة الحواف، مسطحة.	مستعمرات بيضاء اللون مائل للكريمي، متغيرة الشكل، خشنة وعاتمة، حواف مشرشرة، بعض مستعمراتها مسطحة وأخرى مرتفعة منتقخة.
الاحتياجات الهوائية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية	هوائية اختيارية
اختبار الحركة	+	+	+	+
اختبار تحمل الملوحة	+	+	+	+
اختبار حل الدم	-	-	+	+
			β -hemolysis	β -hemolysis
(+ اختبار إيجابي، - اختبار سلبي)				



Bacillus licheniformis - B1a2



Delftia acidovorans - A2b2

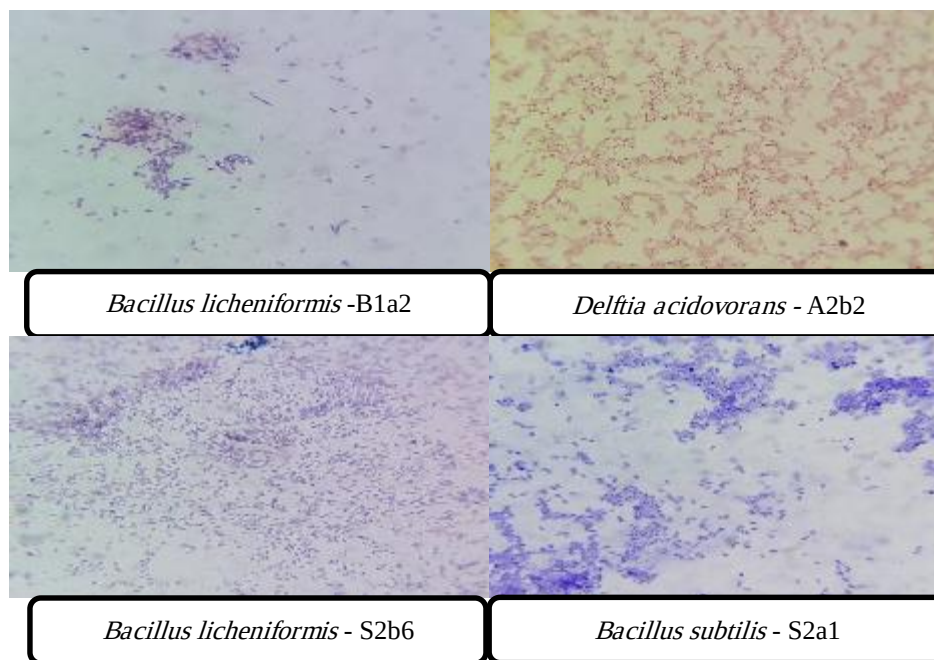


Bacillus licheniformis - S2b6

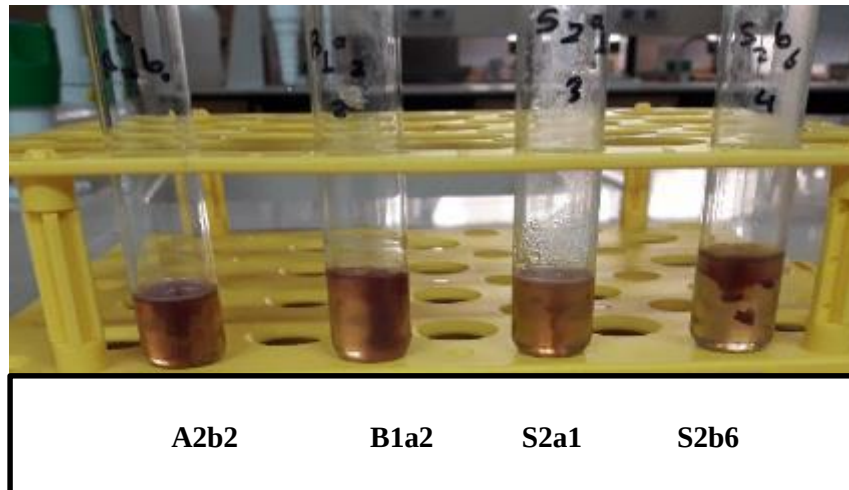


Bacillus subtilis - S2a1

الشكل 20: نمو السلالات الجرثومية المدروسة على وسط LB



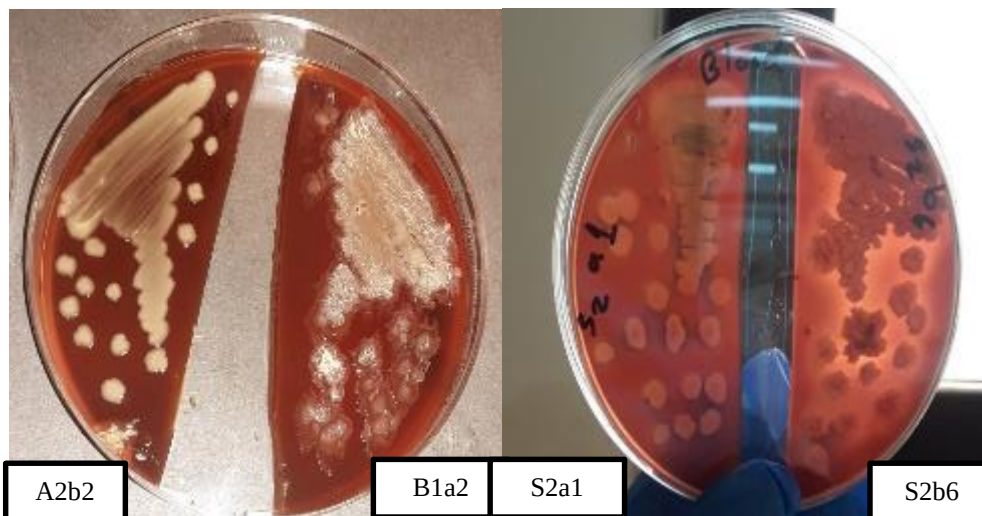
الشكل 21: السلاسل الجرثومية المدروسة تحت المجهر الضوئي باستعمال العدسة الغاطسة $\times 100$



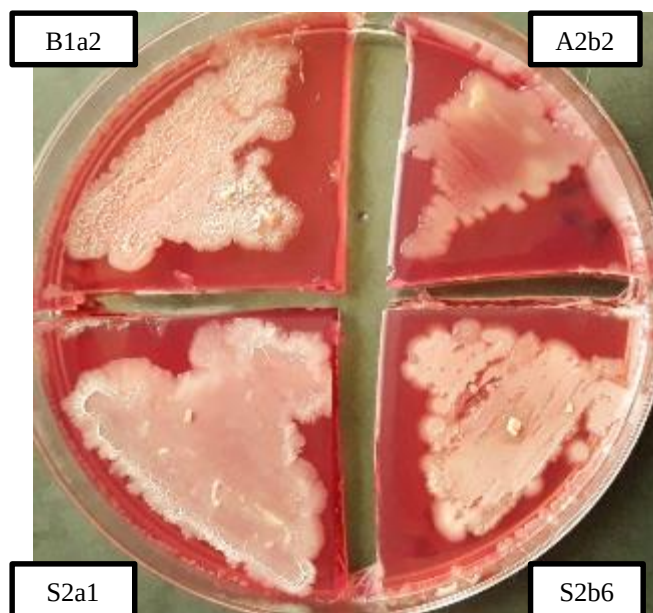
الشكل 22: نتائج اختبار الحركة للسلاسل الجرثومية الأربع يوضح القدرة على الحركة لدى السلاسل المدروسة جميعها



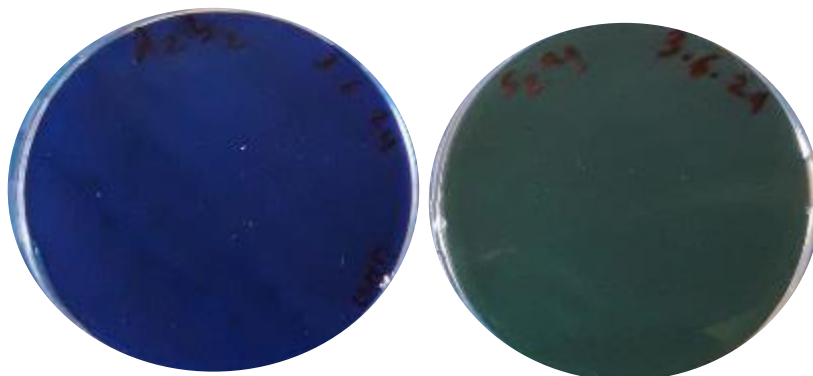
الشكل 23: نتائج اختبار حل النشاء، جميع السلالات الجرثومية إيجابية الأميلاز، حالة للنشاء.



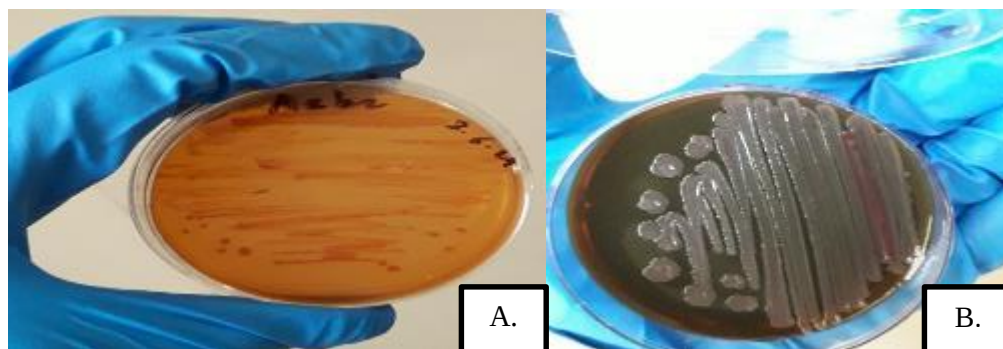
الشكل 24: نمو السلالات الجرثومية المدروسة على وسط الآغار الدمى Blood agar.



الشكل 25: اختبار تحمل الملوحة، يوضح نمو السلالات الجرثومية المدروسة على وسط MYP (الحاوي على تركيز ملح NaCl 7.5%).



الشكل 26: اختبار الستراز: A. نتيجة إيجابية للسلالة A2b2 يظهر تحول لون الوسط للأزرق، نتيجة سلبية للسلالة S2a1



الشكل 27: نمو النوع الجرثومي *Delftia acidovorans* (A. على وسط MacConkey agar، B. على وسط EMB).

3-9- النشاط الإنزيمي عند السلالات الجرثومية المدروسة Enzymatic activity in the studied

:Bacterial strains

أبدت السلالات الجرثومية الأربع نشاطاً إنزيمياً عالياً، ومتبايناً، يلخص الجدول 15 نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية الموصّفة للفعالية الإنزيمية، حيث توافقت نتائج الفاعلية عند السلالات الجرثومية المدروسة مع نتائج أبحاث سابقة تثبت النشاط الإنزيمي عند سلالات تابعة للنوع الجرثومي نفسه، إذ بينت دراسة (Harris et al., 2022) أن الدور الحيوي الفعّال لجراثيم *Delftia acidovorans* في عمليات المعالجة الحيوية يعود لنشاطها الإنزيمي المتنوع، كما أثبتت أبحاث سابقة استثمار المقدرة الحيوية لجراثيم *Bacillus licheniformis* في عمليات الإنتاج الصناعي نظراً لإفرازها مجموعة متنوعة من الإنزيمات (Dumitru et al., 2021, Zhang et al., 2023)، كما بينت دراسة حول إفراز جراثيم *B. subtilis* طيفاً واسعاً من الإنزيمات الخارج خلوية من بينها ستة إنزيمات من البروتياز، إضافة لإنزيم الأميلاز (Eggert, et al., 2023).

من الجدير بالملاحظة والاهتمام؛ اشتراك السلالات الجرثومية الأربع فيما بينها بفاعلية إيجابية لنوعين من الإنزيمات المرتبطة مرجعياً كعوامل مؤثرة في آلية التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 " إنزيمي الكاتالاز والأوكسيداز" الشكّلين 28، 29. إذ تشير دراسات سابقة حول الدور الحيوي الفعّال الذي تقوم به هذه الإنزيمات في مسار تفكيك ونزع سمية الأفلاتوكسين (Qin et al., 2021, Yanhua et al., 2023).

تتسم البنية الكيميائية للأفلاتوكسين B1 بثباتية عالية ويستمد سميته من هياكل حلقتي الفوران واللاكتون لذلك تستهدف الإنزيمات المفككة للأفلاتوكسين تغيير هياكل الحلقات بأساليب عدة إما عن طريق إضافة زمرة الهيدروكسيل hydroxylation أو بتحويل الرابطة كربون- كربون إلى إيبوكسيد epoxidation أو من خلال تفاعل الإرجاع reduction أو بنزع جذر الميثيل demethylation (Guo et al., 2020, Loi et al., 2020).

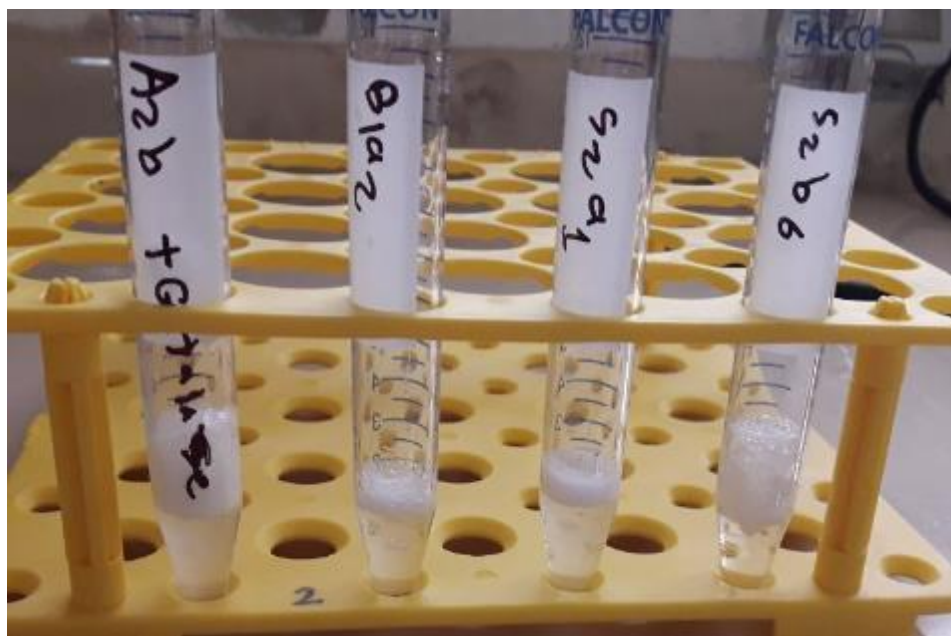
تشير دراسة (Gonzalez et al., 2019) إلى أن التحلل المائي hydrolysis لبنية حلقة اللاكتون يسهل عمل الإنزيمات المفككة للسم والمفرزة بواسطة جراثيم تابعة لجنس *Bacillus* من بينها نوع *Bacillus subtilis*، ومن الآليات

المحتملة لنزع سمية الأفلاتوكسين أكسدة البنية ثنائية الهيدرو فوران فيتكون مركب AFB1-epoxide والذي يتحول بدوره إلى مركب AFB1-dihydrodiol (sun et al., 2023).

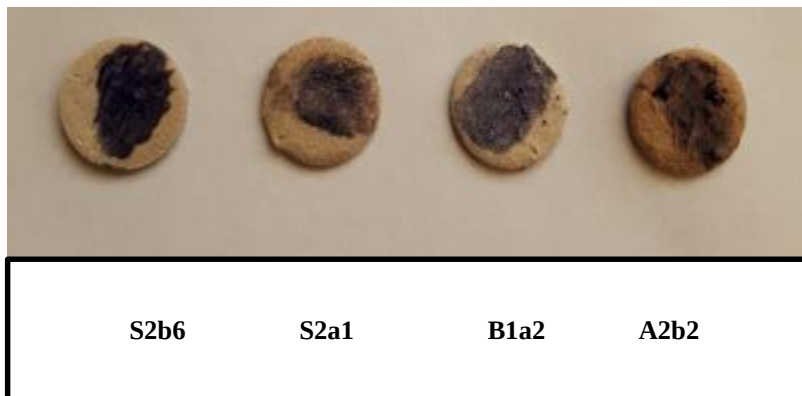
الجدول 15: نتائج اختبار النشاط الإنزيمي عند السلالات الجرثومية المدروسة

السلالة الجرثومية	أميلاز Amylase	اليورياز Urease	بروتياز Protease	اندول indole	ستراز Citrase	أوكسيداز oxidase	الكاتالاز Catalase
A2b2	+	-	-	-	+	+	+
B1a2	+	-	-	-	-	+	+
S2a1	+	-	+	-	-	+	+
S2b6	+	+	-	-	-	+	+

(+ الاختبار إيجابي، - الاختبار سلبي)



الشكل 28: نتائج اختبار الكاتالاز للسلالات الجرثومية، تتضح الفاعلية الإيجابية لكل السلالات من تشكل الفقاعات الغازية الناتجة عن تفكك الماء الأوكسجيني بواسطة إنزيم الكاتالاز المفرز بواسطة الجراثيم.

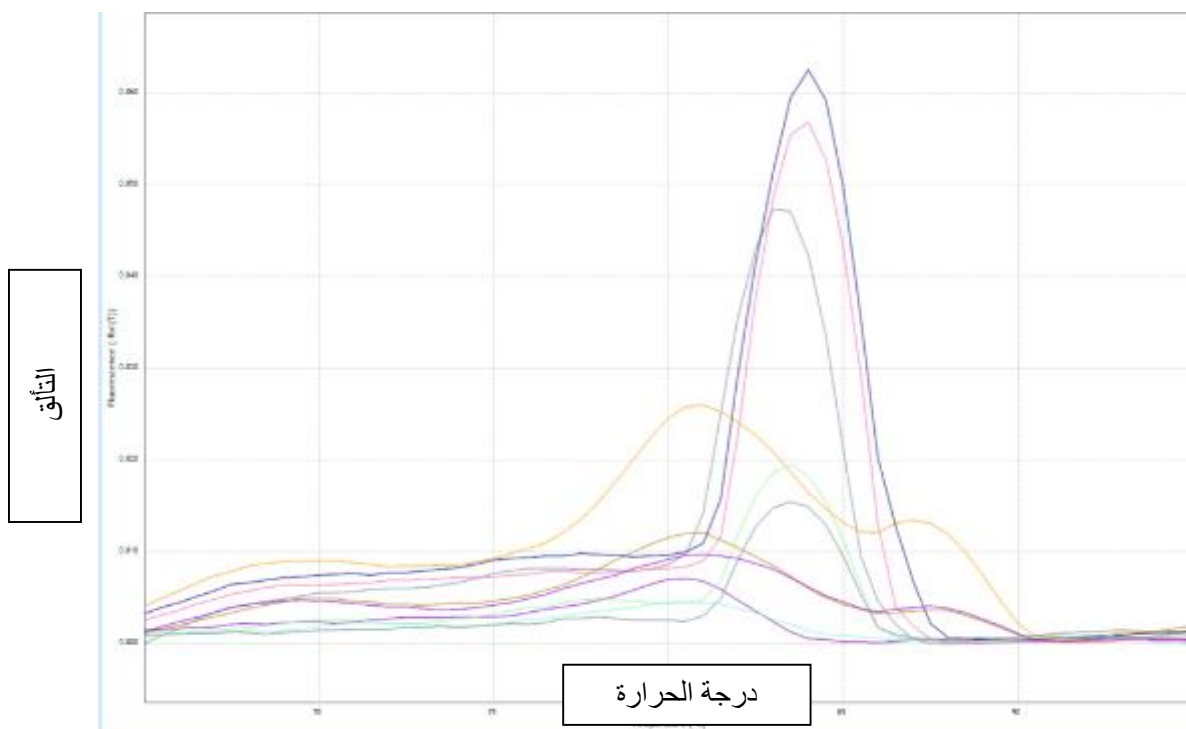


الشكل 29: نتائج اختبار الأوكسيداز للسلالات الجرثومية، يبين إيجابية التفاعل لكل من الأنواع المدروسة من خلال ظهور اللون الأزرق البنفسجي.

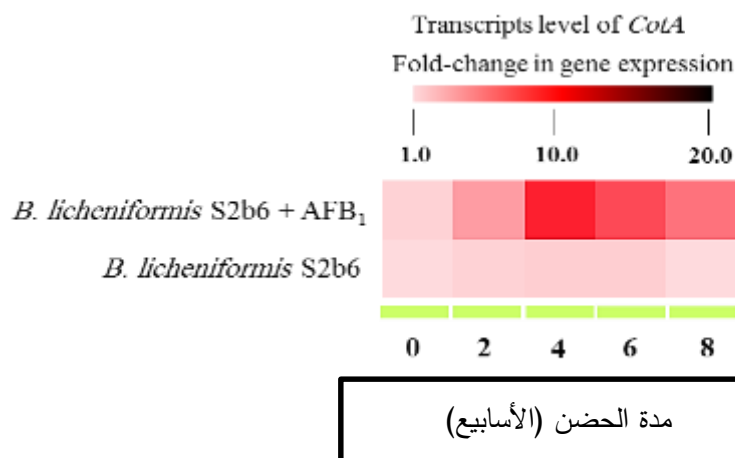
3-10- دراسة التعبير المورثي للمورثة CotA المسؤولة عن تفكيك الأفلاتوكسين B1:

Study of the gene expression of the CotA gene responsible for the biodegradation of B1

بينت النتائج أن جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 تتميز بفعالية حيوية عالية تمكنها من السيطرة على فطر *A. flavus* وتثبيط إفرازه للسم، إلى جانب كفاءتها في استقلاب الأفلاتوكسين واستعماله كمصدر للكربون والطاقة عند زراعتها في وسط فقير بالمغذيات وذلك في أقصر مدة زمنية، ولفهم الآلية الجزيئية الدقيقة التي تتبعها في عملية التفكيك الحيوي، تم تقدير التغيرات في التعبير المورثي الكمي باستعمال تقانة Rt-qPCR الشكل 30، تم تحليل نتائج التعبير المورثي عن واحدة من أهم المورثات المسؤولة عن إفراز نوع من الإنزيمات الذي يُعرف بـ CotA laccase الذي يُنسب له الدور الوظيفي الرئيسي في تفكيك الأفلاتوكسين B1 أشد السموم الفطرية سمية. بينت نتائج التعبير عن المورثة CotA زيادة تدريجية خلال أسابيع التجربة تزامناً مع تحلل الأفلاتوكسين. بلغت ذروة التعبير المورثي بعد الأسبوع الرابع من الحضان، بزيادة قدرت بنحو 9 أضعاف. يبين الشكل 31 التغيرات في التعبير المورثي خلال أسابيع التجربة.



الشكل 30: التعبير المورثي للمورثتين 16S rRNA، CotA في جينوم السلالة الجرثومية *B. licheniformis* S2b6

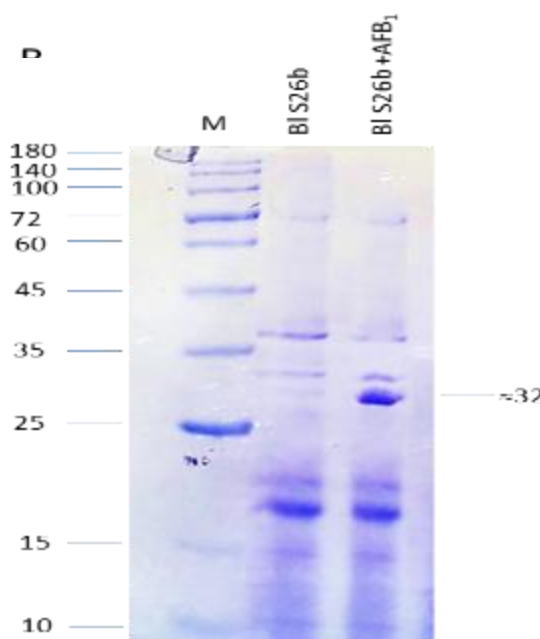


الشكل 31: مستويات النسخ للمورثة CotA عند جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 بعد الحضانة مع مركب الأفلاتوكسين B1 في الأسابيع (2, 4, 6, 8)، إضافة للنقطة 0 والتي ترمز للنقطة الأولى قبل المعاملة بالأفلاتوكسين، يشير مقياس التدرج اللوني (زهر، أحمر، أسود) إلى التغيرات النسبية في معدل النسخ (1.0، 10.0، 20 ضعف) على الترتيب.

3-11- الكشف عن البروتينات الكلية عند جراثيم *B. licheniformis* المعاملة بالأفلاتوكسين B1:

Detection of total proteins in aflatoxin B1-treated *Bacillus licheniformis* :

بينت نتائج معايرة البروتينات الكلية عند جراثيم *Bacillus licheniformis* تبايناً واضحاً قبل المعاملة بالأفلاتوكسين وبعد الحضان، كان من الجدير بالملاحظة ظهور شريط بروتيني جديد بعد معاملة السلالة الجرثومية بالأفلاتوكسين عند وزن جزيئي يقارب 32 kD، وهذا ماترافق مع زيادة مثبتة في مستوى التعبير عن المورثة CotA. يتكون إنزيم CotA laccase في هذه السلالة من وحدتين فرعيتين dimer تحتوي كل منهما على نطاقين نستنتج مما سبق أن التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين مرتبط بتحفيز إنتاج إنزيم CotA laccase.



الشكل 32: نتائج ترحيل البروتينات الكلية للسلالة الجرثومية *B. licheniformis* S2b6 على هلامة عديد الأكريلاميد SDS-

PAGE قبل وبعد المعاملة بالأفلاتوكسين B1.

كشفت نتائج اختبار كفاءة جراثيم *B. licheniformis* السلالة S2b6 أنها تمتلك آليتين متكاملتين الأولى: وقائية تتمثل في منع إنتاج السم بوساطة الفطر، والثانية: علاجية إذ تعمل على التفكيك الحيوي للسم في الوسط الذي تعيش فيه، واستثماره كمصدر للكربون والطاقة؛ مما يعكس تكيّفاً فيزيولوجياً فريداً، والذي يُفسر بتطويرها لمسارات إنزيمية فعالة أهمها إفراز إنزيم CotA laccase، وهذا ماتم إثباته عند دراسة نتائج التعبير المورثي بوساطة تقانة-Rt qPCR .

حيث تشير الزيادة التدريجية في التعبير المورثي وصولاً لتسعة أضعاف بعد الأسبوع الرابع، والتي تزامنت مع انخفاض تركيز الأفلاتوكسين بنسبة كبيرة؛ إلى الدور الحاسم لإنزيم CotA laccase في مسار التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين والمعبّر عنه بإفراط، نتيجة التحفيز الناجم عن نمو الخلايا الجرثومية في وسط فقير بالمغذيات والحاوي على السم كمصدر وحيد للكربون.

تم ترسيخ نتائج التعبير المورثي للمورثة CotA وظيفياً بدراسة البروتينات الكلية بعد المعاملة بالأفلاتوكسين، وكان من اللافت للانتباه ظهور شريط بروتيني جديد عند وزن جزيئي تقريبي يقدر بـ 32 kD، وهو الحجم المتوقع للوحدة الفرعية لإنزيم CotA laccase، وغيابه قبل المعاملة يُفسر أن السم هو المحفز الرئيس لإفراز الإنزيم وتفعيل المسار الاستقلابي.

توافقت نتائج البحث مع الدراسات السابقة التي تؤكد على دور عملية الأكسدة بوساطة إنزيم CotA laccase في التفكيك الحيوي لسم الأفلاتوكسين؛ حيث تؤكد دراسة (Guo, et al., 2020) على فاعلية إنزيم CotA laccase المُستسخ من جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة ANSB821، إذ يعمل الإنزيم المُنقى على تفكيك الأفلاتوكسين في الوسط، كما تم التأكد من نواتج عملية التحلل إلى المركبين: الأفلاتوكسين Q₁، ومركب -epi- aflatoxin Q₁

وفي دراسة (Sun, et al., 2023) خلصت النتائج إلى كفاءة جراثيم *Bacillus licheniformis* في التحليل بطريقة الأكسدة لنوعين من السموم أحدها الأفلاتوكسين وسم الزيرالينون بوساطة إنزيم CotA laccase.

3-12- تقييم الفاعلية الجرثومية في حماية الغذاء من الإصابة الفطرية بشروط المختبر:

Evaluating the effectiveness of Bacteria in protecting food from fungal infection under laboratory conditions:

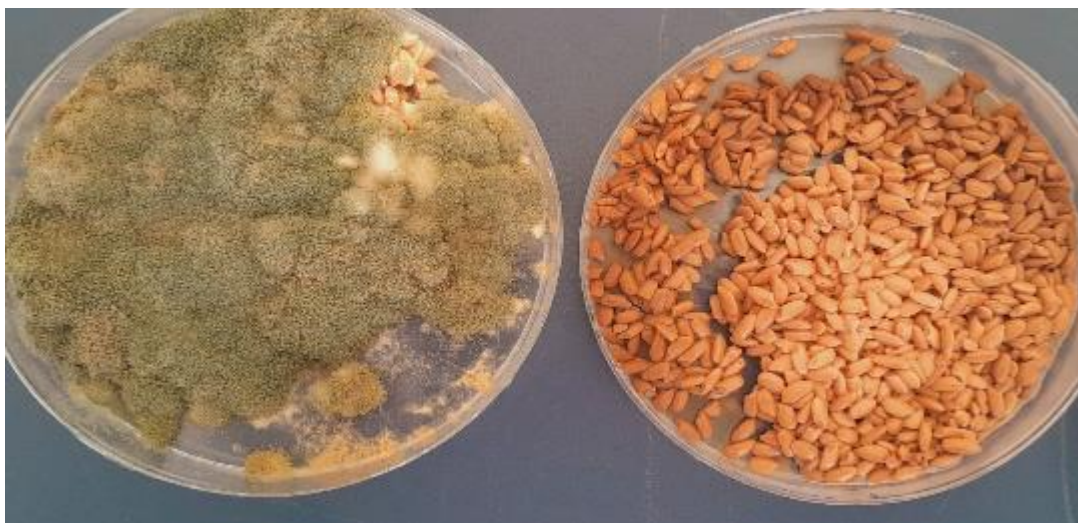
لنتوحيج دراسة الآلية الجزيئية في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين مخبرياً؛ اختُبرت كفاءتها عملياً في الحفظ الحيوي لأحد أهم الحبوب المُعرضة للإصابة، وهي الرز، إذ تم تقييم مقدرتها على حمايتها من غزو الفطر، وكانت النتائج حاسمة ومثيرة للاهتمام؛ ففي ختام أسبوع تجربة اختبار مقدرة جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6، وجراثيم *Bacillus subtilis* السلالة S2a1 على حفظ الرز من الإصابة الفطرية، نجحت كلتا السلالتين في منع نمو الفطر بشكل كامل وبكفاءة عالية، في حين شهدت العينة الشاهد غزواً فطرياً كثيفاً كما هو موضح في الشكل 33.

هذا لا يؤكد على الفاعلية الحيوية التي تمتلكها هذه السلالات فحسب؛ بل يُضفي بعداً تطبيقياً بالغ الأهمية، نظراً لتفوق تلك السلالتين الجرثوميتين في تثبيط نمو الفطر وكبح إفرازه لسمومه، والتفكيك الحيوي لأخطر أنواع السموم الفطرية، تكللت هذه النتائج بنجاح الجراثيم المدروسة في التجربة التي تحاكي البيئة الطبيعية، حيث عملت على منع الإصابة، مما يحفظ المُنتج من التلف، ويحمي المستهلك من خطر السموم، وهذا ما يفتح آفاقاً واسعاً للناحية التطبيقية العملية وإجراء المزيد من التجارب لاستثمار هذه السلالات كحلٍ متكاملٍ وواعد لواحدة من أخطر المشكلات التي تهدد الأمن الغذائي العالمي، وتتسبب بخسائر اقتصادية فادحة، فضلاً عن التأثيرات السمية الجسيمة في صحة الكائنات الحية المستهلكة.

لانتقصر أهمية السلالتين الجرثوميتين من ناحية تفوقهما في المكافحة الحيوية للفطر وتفكيك مفرزاته السامة فحسب؛ بل تمتازان بخاصية بالغة الأهمية من المنظور التطبيقي، إذ تمتازان بأنها سلالات آمنة Safe، فكلتا السلالتين تنتميان إلى الأجناس الجرثومية المُصنفة عالمياً ككائنات آمنة (GRAS- Generally Reconized As Safe) من قبل الهيئات الصحية الدولية، كما تُستعمل على نطاق واسع في المكملات الغذائية كعوامل بروبوتيك (Cutting, 2011, Elshaghabee et al., 2017, Ji, et al., 2024).

توسع هذه الخاصية التي تميز السلالتين الجرثوميتين الآفاق التطبيقية المحتملة، من عامل حفظ حيوي إلى عامل بروبيوتيك مبتكر متعدد الوظائف، مما يضيف بُعداً اقتصادياً واستراتيجياً هاماً، ويمهد الطريق لاستعمالها في برامج مكافحة الحيوية من جهة والحفظ الحيوي والمعالجة الحيوية من جهة أخرى المُستدامة والأمنة.

A.



B.



الشكل 33: نتيجة الحفظ الحيوي للرز بشروط المختبر: A. الفرق بين عينة الرز المعاملة بالمعلق الجرثومي لجراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 الذي عمل على منع نمو الفطر مقارنةً مع العينة الشاهد، B. الفرق بين عينة الرز المعاملة بالمعلق الجرثومي لجراثيم *Bacillus subtilis* السلالة S2a1 الذي عمل على منع نمو الفطر مقارنةً مع الشاهد.

الفصل الرابع

الاستنتاجات العامة والتوصيات

General Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

1. يؤثر فطر *A. flavus* في بنية المجتمع الجرثومي في عينات التربة المدروسة، والدليل على ذلك انخفاض الكثافة الجرثومية بوضوح بعد تلقيح الترب بالعزلة الفطرية.
2. الفاعلية الحيوية الإيجابية العالية لسبع عزلات جرثومية في تثبيط نمو فطر *A. flavus* وكبح تبوغه، ومنعه من إفراز الأفلاتوكسين من مجموع إحدى وتسعون عزلة عُزلت من ترب موقع القنيطرة A,B.
3. الفاعلية الحيوية الإيجابية العالية في تثبيط نمو الفطر وكبح تبوغه والتحكم في إفراز الفطر للأفلاتوكسين لتسع عشرة عزلة جرثومية من مجموع اثنان وخمسون عزلة عُزلت من ترب موقع الحسكة S,M.
4. عزل أربع عزلات جرثومية من الترب المُعاملة مع الأفلاتوكسين B1 إيجابية التضادية الحيوية في الحد من نمو الفطر ومنعه من التبوغ، وإفراز السم.
5. تبين أن خمس عزلات جرثومية هي الأكثر كفاءة في تثبيط الفطر وعملية تبوغه من جهة، والتي تمكنت من منعه من إفراز الأفلاتوكسين في وسط الزراعة من جهة أخرى، كانت الأكثر تفوقاً في التفكيك الحيوي لأشد أنواع السموم الفطرية سمية "الأفلاتوكسين B1".
6. حُددت هوية العزلات الجرثومية الخمس بعد توصيفها جزيئياً باستعمال تقانة سلسلة المورثة 16sRNA، تبين انتمائها للأنواع الآتية: *Delftia acidovorans* السلالة A2b2، *Bacillus licheniformis* السلالة B1a2، *Bacillus subtilis* السلالة S2a1، *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6، *Bacillus anthracis* السلالة S1A (تم استبعادها لإمراضيتها المُحتملة).
7. تفوق النوع الجرثومي *Bacillus subtilis* بأعلى نسبة تفكيك إذ بلغت 94.85% يليه النوع الجرثومي *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 بنسبة تفكيك قدرت بـ 92.55%.

8. بينت الاختبارات الحيوية الكيميائية نشاطاً إنزيمياً عالياً لدى السلاسل الجرثومية المدروسة. كما تميزت السلاسل الجرثومية الأربع بإيجابية عالية لأهم الإنزيمات المرتبطة مرجعياً بآلية التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين (الكاتالاز، الأوكسيداز).

9. ترافقت الكفاءة العالية لجراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6 على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 بزيادة بالتعبير المورثي عن المورثة Cot A بلغت ذروتها عند الأسبوع الرابع من الحضان، والتي قدرت بنحو 9 أضعاف.

10. ارتبط المستوى العالي من التعبير عن المورثة CotA بظهور حزمة بروتينية تقارب 32 kD، التي توافقت الحجم المتوقع لإنزيم CotA laccase، مما يؤكد أن هذا الإنزيم هو العامل الرئيسي في مسار التفكيك الحيوي.

11. بينت جراثيم *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6، وجراثيم *Bacillus subtilis* السلالة S2a1 فاعلية حيوية عالية، إذ أثبتت كفاءة النوعين في حفظ عينة الرز من الإصابة الفطرية مقارنة بالغزو الفطري الكثيف في التجربة الشاهد.

توصيات ومقترحات البحث:

1. دراسة الظروف المؤثرة في التفكيك الحيوي من درجة حرارة، ودرجة حموضة الوسط..
2. دراسة التغيرات في التعبير المورثي الناجمة عن تغير ظروف الحضان.
3. إجراء دراسة جزيئية دقيقة حول تأثير الجراثيم المفككة على المورثات الوظيفية المسؤولة عن إفراز السموم.
4. استثمار المقدرة الحيوية للسلاسل الجرثومية الموصفة واختبار مقدرتها على تفكيك أنواع أخرى من السموم البيئية.
5. العمل على توظيف المقدرة الحيوية التي اتسمت بها السلاسل الموصفة في البحث كعوامل حفظ حيوي ومعالجة حيوية.
6. كما يوصى بإجراء دراسة لتقييم استعمال جراثيم *Bacillus subtilis* السلالة S2a1، *Bacillus licheniformis* السلالة S2b6، التي تمكنت من التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين كعوامل بروبيوتيك غذائية.

الأبحاث العلمية المنشورة		
العنوان	مكان النشر	رقم البحث - تاريخ القبول
تقييم كفاءة سلالات جرثومية معزولة من التربة في كبح نشاط فطر <i>Aspergillus flavus</i> والتحري عن مقدرتها في التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1 بشروط المختبر	مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية	رقم البحث 293/ تاريخ القبول 2024/9/23
توصيف المقدرة الحيوية لسلالات جرثومية معزولة من التربة على تفكيك الأفلاتوكسين AFB1 واختبار فعالية نشاطها الإنزيمي	مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية	رقم البحث 302/ تاريخ القبول 2024/11/10
التوصيف الوظيفي والجزئي للمقدرة الحيوية لجراثيم <i>Bacillus licheniformis</i> على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1	مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية	رقم البحث 362/ تاريخ القبول 2025/8/19
التحري عن مقدرة سلالات جرثومية معزولة من ترب محلية على التثبيط الحيوي لفطر <i>Aspergillus flavus</i> السام واختبار أولي لمقدرتها على التفكيك الحيوي للأفلاتوكسين B1	مجلة جامعة حمص	رقم البحث 857/ تاريخ القبول 2024/6/3

المراجع References

1. Abdel-Nasser, A., Badr, A. N., Fathy, H. M., Ghareeb, M. A., Barakat, O. S., & Hathout, A. S. (2024). Antifungal, antiaflatoxicogenic, and cytotoxic properties of bioactive secondary metabolites derived from *Bacillus* species. *Scientific Reports*, 14(1), 16590
2. Aiko, V., P. Edamana, A. J. J. o. t. S. o. F. Mehta and Agriculture (2016). Decomposition and detoxification of aflatoxin B1 by lactic acid. 96(6): 1959-1966.
3. Al-Mamari, A., A. Al-Sadi, M. Al-Harrasi, S. S. Babu, I. Al-Mahmooli and R. J. I. F. R. J. Velazhahan (2023). Biodegradation of aflatoxin B1 by *Bacillus subtilis* YGT1 isolated from yoghurt. *International Food Research Journal*, 30(1): 142-150.
4. Aliabadi, M. A., F. E. Alikhani, M. Mohammadi and R. K. J. E. J. o. E. B. Darsanaki (2013). Biological control of aflatoxins. *Experimental Biology*, 3(2): 162-166.
5. Alshannaq, A., J.-H. J. I. j. o. e. r. Yu and p. health (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International journal of environmental research and public health*, 14(6): 632.
6. Balasubramanian, A. J. U. M. (2017). "Soil microorganisms." 5-22.
7. Basu, S., G. Kumar, S. Chhabra and R. Prasad (2021). Role of soil microbes in biogeochemical cycle for enhancing soil fertility. *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Elsevier: 149-157.
8. Bata-Vidács, I., C. El Hathat, K. Inotai, J. Kosztik, A. Szekeres, E. Horváth-Szancics, Z. Zalán and J. J. J. o. F. S. Kukolya (2025). The Effects of pH, Temperature, and Oxygen Availability on the Production of Aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus* Zt41 and Sterigmatocystin Production of *Aspergillus creber* 2663 Isolates. *Journal of Food Safety*, 45(2): e70015.
9. Benkerroum, N. J. I. j. o. e. r. and p. health (2019). Retrospective and prospective look at aflatoxin research and development from a practical standpoint. *International journal of environmental research and public health*, 16(19): 3633.
10. Benkerroum, N. J. I. j. o. e. r. and p. health (2020). Chronic and acute toxicities of aflatoxins: Mechanisms of action. *International journal of environmental research and public health*, 17(2): 423.
11. Bhattarai, A., B. Bhattarai and S. J. J. M. E. Pandey (2015). Variation of soil microbial population in different soil horizons. *J Microbiol Exp*, 2(2): 00044.
12. Bonattera, A., E. Badosa, N. Daranas, J. Francés, G. Roselló and E. J. M. Montesinos (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*, 10(9): 1759.
13. Bot, A. and J. Benites (2005). The importance of soil organic matter: k to drought-resistant soil and sustained food production, (Vol. 80). *Food & Agriculture Org.*
14. Bule Možar, K., M. Miloloža, V. Martinjak, M. Cvetnić, V. Ocelić Bulatović, V. Mandić, A. Bafti, Š. Ukić, D. Kučić Grgić and T. J. E. Bolanča (2023). Bacteria and yeasts isolated from the environment in biodegradation of PS and PVC microplastics: screening and treatment optimization. *Environments*, 10(12): 207.
15. Caceres, I., A. Al Khoury, R. El Khoury, S. Lorber, I. P. Oswald, A. El Khoury, A. Atoui, O. Puel and J.-D. J. T. Bailly (2020). Aflatoxin biosynthesis and genetic regulation: A review. *Toxins*, 12(3): 150.

16. Cao, H., Liu, D., Mo, X., Xie, C., & Yao, D. (2011). A fungal enzyme with the ability of aflatoxin B1 conversion: Purification and ESI-MS/MS identification. *Microbiological Research*, 166(6), 475-483.
17. International Agency for Research on Cancer. (2012). A Review of Human Carcinogens: Chemical Agents and Related Occupations. World health organization.
18. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (2013). *Microbiology: a laboratory manual*, (p. 507). San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings.
19. Cary, J. W., M. K. Gilbert, M. D. Lebar, R. Majumdar and A. M. J. F. S. Calvo (2018). *Aspergillus flavus* secondary metabolites: more than just aflatoxins. *Food safety*, 6(1):7-32.
20. Chandra, P. (2021). Aflatoxins: Food safety, human health hazards and their prevention. *Aflatoxins-Occurrence, Detoxification, Determination and Health Risks*, IntechOpen.
21. Chen, G., Fang, Q. A., Liao, Z., Xu, C., Liang, Z., Liu, T., & Wang, J. (2022). Detoxification of aflatoxin B1 by a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF2020. *Frontiers in microbiology*, 13, 891091
22. Cho, S.-J., M.-H. Kim, Y.-O. J. J. o. E. Lee and Environment (2016). Effect of pH on soil bacterial diversity. 40: 1-9.
23. Cho, W. I., & Chung, M. S. (2020). *Bacillus* spores: a review of their properties and inactivation processing technologies. *Food science and biotechnology*, 29(11), 1447-1461.
24. Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical microbiology reviews*, 33(4), 10-1128.
25. Crowley, S., J. Mahony, D. J. T. i. f. s. van Sinderen and technology (2013). "Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in food science & technology*, 33(2): 93-109.
26. Cutting, S. M. (2011). *Bacillus* probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220.
27. Das, S., Dash, H. R., Mangwani, N., Chakraborty, J., & Kumari, S. (2014). Understanding molecular identification and polyphasic taxonomic approaches for genetic relatedness and phylogenetic relationships of microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 103, 80-100.
28. Devi, R., B. Behera, M. B. Raza, V. Mangal, M. A. Altaf, R. Kumar, A. Kumar, R. K. Tiwari, M. K. Lal, B. J. J. o. S. S. Singh and P. Nutrition (2021). An insight into microbes mediated heavy metal detoxification in plants: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 1-23.
29. Edoamodu, C. E., & Nwodo, U. U. (2022). Decolourization of synthetic dyes by laccase produced from *Bacillus sp.* NU2. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 36(1), 95-106.
30. El-Debaiky, S. A. (2017). Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*. *Microbial pathogenesis*, 113, 135-143.
31. El-Sayed, R. A., A. B. Jebur, W. Kang and F. M. J. J. o. F. F. El-Demerdash (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: Characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2): 91-102.

32. Elshaghabee, F. M., Rokana, N., Gulhane, R. D., Sharma, C., & Panwar, H. (2017). *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 8, 1490.
33. Eltariki, F. E. M., K. Tiwari, I. A. Ariffin, M. A. J. J. o. P. Alhoot and A. Microbiology (2018). Genetic Diversity of Fungi Producing Mycotoxins in Stored Crops. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 12(4).
34. Farzaneh, M., Z.-Q. Shi, M. Ahmadzadeh, L.-B. Hu and A. J. T. p. p. j. Ghassempour (2016). Inhibition of the *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 contamination on pistachio nut by fengycin and surfactin-producing *Bacillus subtilis* UTBSP1. *The plant pathology journal*, 32(3): 209.
35. Feng, Z., Dong, W., Ge, L., Zhu, T., & Zhu, W. (2025). Identification of AFB1-degrading strain *Bacillus subtilis* HQ3 and its biodegradation mechanism. *Journal of Stored Products Research*, 114, 102746.
36. Fouad, F. A., D. G. Youssef, F. M. Shahat and M. N. Abd El-Ghany (2022). Role of microorganisms in biodegradation of pollutants. *Handbook of biodegradable materials* (pp. 221-260). Cham: Springer International Publishing.
37. Furian, A. F., M. R. Figuera, L. F. F. Royes and M. S. J. C. O. i. F. S. Oliveira (2022). Recent advances in assessing the effects of mycotoxins using animal models. *Current Opinion in Food Science*, 47: 100874.
38. Gasperini, A., A. Medina and N. Magan (2025). Climate change and mycotoxins. *Mycotoxins*, Wageningen Academic: 394-412.
39. Gerke, J. J. S. S. (2022). The central role of soil organic matter in soil fertility and carbon storage. *Soil Systems*, 6(2): 33.
40. Gomaa, E. Z., M. F. Abdelall, O. M. J. P. El-Mahdy and a. proteins (2018). Detoxification of aflatoxin B1 by antifungal compounds from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*, isolated from dairy products. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(2): 201-209.
41. Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 259-268.
42. Gong, Y. Y., S. Watson and M. N. J. F. s. Routledge (2016). Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. *Food safety*, 4(1): 14-27.
43. Grace, D., G. Mahuku, V. Hoffmann, C. Atherstone, H. D. Upadhyaya and R. J. F. S. Bandyopadhyay (2015). International agricultural research to reduce food risks: case studies on aflatoxins. *Food Security*, 7: 569-582.
44. Grain, U. Fungal Diseases and Mycotoxin Reference; United States Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration: Washington, DC, USA, 2016.
45. Guchi, E. J. A. J. o. F. and Nutrition (2015). Implication of aflatoxin contamination in agricultural products. 3(1): 12-20.
46. Guimarães, A., A. Venancio, L. J. F. A. Abrunhosa and C. P. A (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives & Contaminants*, 35(9): 1803-1818.

47. Guo, B., J. Yu, C. C. Holbrook, T. E. Cleveland, W. C. Nierman and B. T. J. P. S. Scully (2009). Strategies in prevention of preharvest aflatoxin contamination in peanuts: aflatoxin biosynthesis, genetics and genomics. *Peanut Science*, 36(1): 11-20.
48. Guo, H., Lin, C., Wang, S., Jiang, D., Zheng, B., Liu, Y., & Qin, W. (2017). Characterization of a Novel Laccase-producing *Bacillus* sp. A4 and its Application in *Miscanthus* Degradation. *Bioresources*, 12(3).
49. Guo, Y., Qin, X., Tang, Y., Ma, Q., Zhang, J., & Zhao, L. (2020). CotA laccase, a novel aflatoxin oxidase from *Bacillus licheniformis*, transforms aflatoxin B1 to aflatoxin Q1 and epi-aflatoxin Q1. *Food chemistry*, 325, 126877.
50. Guo, J., Zhang, H., Zhao, Y., Hao, X., Liu, Y., Li, S., & Wu, R. (2024). Identification of a Novel Aflatoxin B1-Degrading Strain, *Bacillus halotolerans* DDC-4, and Its Response Mechanisms to Aflatoxin B1. *Toxins*, 16(6), 256.
51. Harkai, P., I. Szabó, M. Cserhádi, C. Krifaton, A. Risa, J. Radó, A. Balázs, K. Berta, B. J. I. B. Kriszt and Biodegradation (2016). Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 108: 48-56.
52. Hayat, R., S. Ali, U. Amara, R. Khalid and I. J. A. o. m. Ahmed (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of microbiology*, 60: 579-598.
53. He, W., Ge, X., & Li, Y. (2025). Activity and stability improvement: structure-function insights into CotA from *Bacillus subtilis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145156.
54. James, A. and V. L. J. F. C. Zikankuba (2018). Mycotoxins contamination in maize alarms food safety in sub-Sahara Africa. *Food Control*, 90: 372-381.
55. Jard, G., T. Liboz, F. Mathieu, A. Guyonvarc'h, A. J. F. A. Lebrihi and C. P. A (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives & Contaminants*, 28(11): 1590-1609.
56. Javed, A., E. Ali, K. B. Afzal, A. Osman, S. J. I. J. o. P. Riaz, Animal and E. Sciences (2022). Soil fertility: Factors affecting soil fertility, and biodiversity responsible for soil fertility. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 12(1): 21-33.
57. Jeong, M.-H., Y.-S. Lee, J.-Y. Cho, Y.-S. Ahn, J.-H. Moon, H.-N. Hyun, G.-S. Cha and K.-Y. J. M. p. Kim (2017). Isolation and characterization of metabolites from *Bacillus licheniformis* MH48 with antifungal activity against plant pathogens. *Microbial pathogenesis*, 110: 645-653.
58. Jeong, J., Mun, S., Oh, Y., Cho, C. S., Yun, K., Ahn, Y., ... & Han, K. (2022). A qRT-PCR method capable of quantifying specific microorganisms compared to NGS-based metagenome profiling data. *Microorganisms*, 10(2), 324.
59. Ji, Y., Li, J., Liang, Y., Li, L., Wang, Y., Pi, L., ... & Wang, Q. (2024). Engineering the Tat-secretion pathway of *Bacillus licheniformis* for the secretion of cytoplasmic enzyme arginase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 89.
60. Jin, J., T. T. H. Nguyen, S. Humayun, S. Park, H. Oh, S. Lim, I.-K. Mok, Y. Li, K. Pal and D. J. F. C. Kim (2021). Characteristics of sourdough bread fermented with *Pediococcus pentosaceus* and *Saccharomyces cerevisiae* and its bio-preservative effect against *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, 345: 128787.

61. Jousset, A., J. Becker, S. Chatterjee, P. Karlovsky, S. Scheu and N. J. E. Eisenhauer (2014). Biodiversity and species identity shape the antifungal activity of bacterial communities. *Ecology*, 95(5): 1184-1190.
62. Jung, m. y., k. c. choi, l. byung-doo, S. Min-Kyoung, O. Boung-Jun and P. I. J. kim (2013). Isolation and Characterization of a Proteinaceous Antifungal Compounds from *Lactobacillus plantarum* BC-K30 with Probiotic Properties. 216-216.
63. Karlovsky, P., M. Suman, F. Berthiller, J. De Meester, G. Eisenbrand, I. Perrin, I. P. Oswald, G. Speijers, A. Chiodini and T. J. M. r. Recker (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin research*, 32(4): 179-205.
64. Kellogg, (2014). *Soil Survey laboratory methods manual*.
65. Kensler, T. W., B. D. Roebuck, G. N. Wogan and J. D. J. T. s. Groopman (2011). Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological sciences*, 120(suppl_1), S28-S48.
66. Khan, R., F. Anwar and F. M. J. H. Ghazali (2024). A comprehensive review of mycotoxins: Toxicology, detection, and effective mitigation approaches. *Heliyon*, 10(8).
67. Khodaei, D., F. Javanmardi and A. M. J. C. O. i. F. S. Khaneghah (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: A three-year survey. *Current Opinion in Food Science*, 39: 36-42.
68. Kim, J.-G. and J.-Y. J. A. M. Park (2024). Inhibitory Effects of *Bacillus subtilis* Isolated from Meju (Fermented Soybean Brick) on the Growth of *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology*, 4(1): 354-363.
69. Klich, M. A. J. M. p. p. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular plant pathology*, 8(6): 713-722.
70. Kučić Grgić, D., M. Miloloža, E. Lovrinčić, A. Kovačević, M. Cvetnić, V. Ocelić Bulatović, V. Prevarić, K. Bule, Š. Ukić, M. J. C. Markić and b. e. quarterly (2021). Bioremediation of MP-polluted waters using bacteria *Bacillus licheniformis*, *Lysinibacillus massiliensis*, and mixed culture of *Bacillus sp.* and *Delftia acidovorans*. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, 35(2): 205-224.
71. Kumar, A., H. Pathak, S. Bhadauria, J. J. F. P. Sudan, Processing and Nutrition (2021). Aflatoxin contamination in food crops: causes, detection, and management: a review. *Food Production, Processing and Nutrition* 3: 1-9.
72. Kumar, P., D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta and S. G. J. F. i. m. Kang (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7: 2170.
73. Lahlali, R., S. Ezrari, N. Radouane, J. Kenfaoui, Q. Esmaeel, H. El Hamss, Z. Belabess and E. A. J. M. Barka (2022). Biological control of plant pathogens: A global perspective. *Microorganisms*, 10(3): 596.
74. Lal, R., C. Monger, L. Nave and P. J. P. T. o. t. R. S. B. Smith (2021). The role of soil in regulation of climate. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1834), 20210084.
75. Latham, R. L., J. T. Boyle, A. Barbano, W. G. Loveman and N. A. J. E. i. b. Brown (2023). Diverse mycotoxin threats to safe food and feed cereals. *Essays in biochemistry*, 67(5): 797-809.

76. Leyva Salas, M., J. Mounier, F. Valence, M. Coton, A. Thierry and E. J. M. Coton (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—A review. *Microorganisms*, 5(3): 37.
77. Li, K., S. Cheng, Z. Liu, Q. Pan, X. Zuo, A. Guo and J. J. F. B. Lv (2024). Characteristics of inhibition of *Aspergillus flavus* growth and degradation of Aflatoxin B1 by cell-free fermentation supernatant of *Bacillus velezensis* 906. *Food Bioscience*, 61, 104954.
78. Li, S., M. Peng, Z. Liu and S. S. J. M. M. R. Shah (2017). The role of soil microbes in promoting plant growth. *Molecular Microbiology Research*, 7.
79. Ling, L., W. Cheng, K. Jiang, Z. Jiao, H. Luo, C. Yang, M. Pang and L. J. A. o. M. Lu (2022). The antifungal activity of a serine protease and the enzyme production of characteristics of *Bacillus licheniformis* TG116. *Archives of Microbiology*, 204(10): 601.
80. Liu, Y., Guo, Y., Liu, L., Tang, Y., Wang, Y., Ma, Q., & Zhao, L. (2023). Improvement of aflatoxin B1 degradation ability by *Bacillus licheniformis* CotA-laccase Q441A mutant. *Heliyon*, 9(11).
81. Liu, L., M. Xie and D. J. I. J. o. M. S. Wei (2022). Biological detoxification of mycotoxins: Current status and future advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1064.
82. Liu, Y., C.-C. H. Chang, G. M. Marsh and F. J. E. j. o. c. Wu (2012). Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer*, 48(14): 2125-2136.
83. Lopes, M. J. d. S., M. B. Dias-Filho and E. S. C. Gurgel (2021). Successful Plant Growth-Promoting Microbes: Inoculation Methods and Abiotic Factors. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 606454.
84. Luz, C., J. Ferrer, J. Mañes, G. J. F. Meca and c. toxicology (2018). Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and chemical toxicology*, 112: 60-66.
85. Lyagin, I., & Efremenko, E. (2019). Enzymes for detoxification of various mycotoxins: origins and mechanisms of catalytic action. *Molecules*, 24(13), 2362
86. MacFaddin, J. J. P., PA (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, williams and wilkins. 113(7).
87. Mahato, D. K., K. E. Lee, M. Kamle, S. Devi, K. N. Dewangan, P. Kumar and S. G. J. F. i. m. Kang (2019). Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Frontiers in microbiology*, 10: 483502.
88. Matchado, A., J. W. Smith, K. J. Schulze, J. D. Groopman, E. Kortekangas, D. Chaima, C. D. Arnold, K. Maleta, U. Ashorn and P. J. C. d. i. n. Ashorn (2023). Child aflatoxin exposure is associated with poor child growth outcomes: a prospective cohort study in rural Malawi. *Current developments in nutrition*, 7(7): 101962.
89. Medina, A., A. Akbar, A. Baazeem, A. Rodriguez and N. J. F. b. r. Magan (2017). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough?. *Fungal biology reviews*, 31(3): 143-154.
90. Miklós, G., C. Angeli, Á. Ambrus, A. Nagy, V. Kardos, A. Zentai, K. Kerekes, Z. Farkas, Á. Jóźwiak and T. J. F. i. M. Bartók (2020). Detection of aflatoxins in different matrices and food-chain positions. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1916.
91. Milićević, D., I. Nastasić, Z. J. J. o. E. S. Petrovic and P. C. Health (2016). Mycotoxin in the food supply chain—Implications for public health program. *Journal of Environmental Science and Health*, 34(4): 293-319.

92. Mitchell, N. J., E. Bowers, C. Hurburgh, F. J. F. A. Wu and C. P. A (2016). Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives & Contaminants*, 33(3): 540-550.
93. Narmukhamedova, M., T. Khusanov, G. Kadirova, S. Jumayorov and M. Kalandarova (2024). Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and its potential in biocontrol of phytopathogenic fungi. *E3S Web of Conferences*, EDP Sciences.
94. Nazhand, A., A. Durazzo, M. Lucarini, E. B. Souto and A. J. F. Santini (2020). Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. *foods*, 9(5): 644.
95. Nierman, W. C., J. Yu, N. D. Fedorova-Abrams, L. Losada, T. E. Cleveland, D. Bhatnagar, J. W. Bennett, R. Dean and G. A. J. G. a. Payne (2015). Genome sequence of *Aspergillus flavus* NRRL 3357, a strain that causes aflatoxin contamination of food and feed. *Genome announcements*, 3(2): 10.1128.
96. Oliveira, P. M., B. Brosnan, A. Furey, A. Coffey, E. Zannini and E. K. J. F. C. Arendt (2015). Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: Strain characterization and identification of antifungal compounds. *Food Control*, 51: 433-443.
97. Park, W.-J. and S.-S. J. K. J. o. M. Lee (2010). The biological degradation of high concentration of trichloroethylene (TCE) by *Delftia acidovorans* EK2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 46(2): 183-191.
98. Payne, J., Bellmer, D., Jadeja, R., & Muriana, P. (2024). The potential of *Bacillus* species as probiotics in the food industry: A review. *Foods*, 13(15), 2444.
99. Qi, L., Chen, K., Zheng, L., Guan, H., Hao, T., Yang, J., ... & Guan, C. (2025). Improving the phytoremediation efficiency of soil phenanthrene contamination by addition of exogenous laccase with soil temperature regulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 147371.
100. Qin, M., L. Cheng, Y. Li, X. Tang, Y. Gan, J. Zhao, S. Luo, H. Zhang, L. Zhang and J. J. F. i. M. Chen (2023). Disease burden contributed by dietary exposure to aflatoxins in a mountainous city in Southwest China. *Frontiers in Microbiology*, 14: 1215428.
101. Ouyang, B., Xu, W., Ni, D., Zhang, W., Ding, J., & Mu, W. (2025). Microbial and enzymatic strategies for aflatoxin control: Integrating intelligent detection and computational design. *Food Chemistry*, 145584.
100. Rajarajan, P., K. Sylvia, M. P. Periasamy, M. J. E. A. Subramanian, Health and Toxicology (2021). Detection of aflatoxin producing *Aspergillus flavus* from animal feed in Karnataka, India. *Environmental analysis, health and toxicology*, 36(3).
101. Rao, K. R., A. Vipin, P. Hariprasad, K. A. Appaiah and G. J. F. C. Venkateswaran (2017). Biological detoxification of Aflatoxin B1 by *Bacillus licheniformis* CFR1. *Food Control*, 71: 234-241.
102. Risan, M. H. and A. H. J. A.-N. J. o. S. Muhsin (2015). Efficiency of *Bacillus licheniformis* to reduce aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 18(2): 108-113.
103. Sadiq, F. A., B. Yan, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang and W. Chen (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: a comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5): 1403-1436.
104. Samson, R. A., C. M. Visagie, J. Houburken, S.-B. Hong, V. Hubka, C. H. Klaassen, G. Perrone, K. A. Seifert, A. Susca and J. B. J. S. i. m. Tanney (2014). Phylogeny,

- identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Studies in mycology, 78(1): 141-173.
105. Samuel, M. S., A. Sivaramakrishna, A. J. I. B. Mehta and Biodegradation (2014). Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by *Pseudomonas putida*. International Biodeterioration & Biodegradation, 86: 202-209.
 106. Schmidt-Heydt, M., A. Abdel-Hadi, N. Magan and R. J. I. j. o. f. m. Geisen (2009). Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. International journal of food microbiology, 135(3): 231-237.
 107. Shetty, A. R., V. de Gannes, C. C. Obi, S. Lucas, A. Lapidus, J.-F. Cheng, L. A. Goodwin, S. Pitluck, L. Peters and N. J. S. i. g. s. Mikhailova (2015). "Complete genome sequence of the phenanthrene-degrading soil bacterium *Delftia acidovorans* Cs1-4. Standards in genomic sciences, 10: 1-10.
 108. Shleeve, M. O., Kondratieva, D. A., & Kaprelyants, A. S. (2023). *Bacillus licheniformis*: a producer of antimicrobial substances, including antimycobacterials, which are feasible for medical applications. Pharmaceutics, 15(7), 1893.
 109. Shu, X., Y. Wang, Q. Zhou, M. Li, H. Hu, Y. Ma, X. Chen, J. Ni, W. Zhao and S. J. T. Huang (2018). Biological degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Bacillus velezensis* DY3108 with broad pH stability and excellent thermostability. Toxins, 10(8): 330.
 110. Siahmoshteh, F., Z. Hamidi-Esfahani, M. J. J. o. P. Razzaghi-Abyaneh and A. Microbiology (2016). Antifungal Activity, Biodegradation and Production Inhibition of Aflatoxins B 1 and G 1 by a Soil Isolate of *Bacillus subtilis* against *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Journal of Pure & Applied Microbiology, 10(4).
 111. Singh, J. and A. J. H. Mehta (2022). The main Aflatoxin B1 degrading enzyme in *Pseudomonas putida* is thermostable lipase. Heliyon, 8(10).
 112. Sun, F., D. Yu, H. Zhou, H. Lin, Z. Yan and A. J. F. C. Wu (2023). CotA laccase from *Bacillus licheniformis* ZOM-1 effectively degrades zearalenone, aflatoxin B1 and alternariol. Food Control, 145: 109472.
 113. Sun, H., He, Z., Xiong, D., & Long, M. (2023). Mechanisms by which microbial enzymes degrade four mycotoxins and application in animal production: A review. Animal nutrition, 15, 256-274.
 114. Svanström, Å., S. Boveri, E. Boström and P. J. B. R. N. Melin (2013). The lactic acid bacteria metabolite phenyllactic acid inhibits both radial growth and sporulation of filamentous fungi. BMC Research Notes, 6(1): 1-9.
 115. Tang, J., D. Deng, M. Song, Z. Liu, S. Ma and Y. J. b. Wang (2021). The genomic context for aflatoxin B1-degrading *Pseudomonas* strains. bioRxiv, 2021-09
 116. Ubalde, M. C., V. Braña, F. Sueiro, M. A. Morel, C. Martínez-Rosales, C. Marquez and S. J. C. m. Castro-Sowinski (2012). The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. Current microbiology, 64: 597-603.
 117. Ul Hassan, Z., R. Al Thani, H. Alnaimi, Q. Migheli and S. J. A. o. Jaoua (2019). Investigation and application of *Bacillus licheniformis* volatile compounds for the biological control of toxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* spp. ACS omega, 4(17): 17186-17193.

118. Verga, J. U., Padovano, C., da Silveira, W. A., Hazard, E. S., Nugent, A. P., Elliott, C. T., ... & Hardiman, G (2024). A systems biology approach reveals the endocrine disrupting potential of aflatoxin B1. *Exposure and Health* 16(2): 321-340.
119. Wacoo, A. P., D. Wendo, P. C. Vuzi and J. F. Hawumba (2014). Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry* 2014: 706291.
120. Wang, X., Bai, Y., Huang, H., Tu, T., Wang, Y., Wang, Y., ... & Su, X. (2019). Degradation of aflatoxin B1 and zearalenone by bacterial and fungal laccases in presence of structurally defined chemicals and complex natural mediators. *Toxins*, 11(10), 609.
121. Wang, Y., J. Wu, M. Lv, Z. Shao, M. Hungwe, J. Wang, X. Bai, J. Xie, Y. Wang, W. J. F. i. b. Geng and biotechnology (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9: 612285.
122. Wang, Y., H. Zhang, H. Yan, C. Yin, Y. Liu, Q. Xu, X. Liu and Z. J. T. Zhang (2018). Effective biodegradation of aflatoxin B1 using the *Bacillus licheniformis* (BL010) strain. *Toxins*, 10(12): 497.
123. Watson, S., S. E. Moore, M. K. Darboe, G. Chen, Y.-K. Tu, Y.-T. Huang, K. G. Eriksen, R. M. Bernstein, A. M. Prentice and C. P. J. B. p. h. Wild (2018). Impaired growth in rural Gambian infants exposed to aflatoxin: a prospective cohort study. *BMC public health*, 18: 1-9.
124. Wild, C. P. and Y. Y. J. C. Gong (2010). "Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis*, 31(1): 71-82.
125. Wongsariya, K. and C. J. J. o. A. A. T. V. Thawai (2019). Antifungal activity against the growth of Aflatoxin producing fungi from soil Actinobacteria. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*. 6(3).
126. Xia, X., Y. Zhang, M. Li, B. Garba, Q. Zhang, Y. Wang, H. Zhang and P. J. F. C. Li (2017). Isolation and characterization of a *Bacillus subtilis* strain with aflatoxin B1 biodegradation capability. *Food Control*, 75: 92-98.
127. Xiong, D., Wen, J., Lu, G., Li, T., & Long, M. (2022). Isolation, purification, and characterization of a laccase-degrading aflatoxin B1 from *Bacillus amyloliquefaciens* B10. *Toxins*, 14(4), 250
128. Xiang, L., J. D. Harindintwali, F. Wang, M. Redmile-Gordon, S. X. Chang, Y. Fu, C. He, B. Muhoza, F. Brahusi, N. J. E. S. Bolan and Technology (2022). Integrating biochar, bacteria, and plants for sustainable remediation of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Science & Technology*, 56(23): 16546-16566.
129. Xiong, R., X. He, N. Gao, Q. Li, Z. Qiu, Y. Hou and W. J. M. S. Shen (2024). Soil pH amendment alters the abundance, diversity, and composition of microbial communities in two contrasting agricultural soils. *Microbiology Spectrum*, 12(8): e04165-04123.
130. Xu, X., Lin, P., Lu, Y., & Jia, R. (2025). Degradation and detoxification of aflatoxin B1 by two peroxidase enzymes from *Irpex lacteus* F17. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 48(4), 693-704.
131. Yabe, K., H. J. A. m. Nakajima and biotechnology (2004). Enzyme reactions and genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 64: 745-755.
132. Yang, P., W. Wu, D. Zhang, L. Cao and J. J. M. Cheng (2023). AFB1 microbial degradation by *Bacillus subtilis* WJ6 and its degradation mechanism exploration based on the comparative transcriptomics approach. *Metabolites*, 13(7): 785.

133. Yao, H., Z. Hruska and J. D. J. W. m. j. Di Mavungu (2015). Developments in detection and determination of aflatoxins. World mycotoxin journal, 8(2): 181-192.
134. Younas, T., M. Umer, A. Husnain Gondal, H. Aziz, M. S. Khan, A. Jabbar, H. Shahzad, N. M. Panduro-Tenazoa, M. Jamil and F. J. J. o. B. M. Ore Areche (2022). A comprehensive review on impact of microorganisms on soil and plant. Bioresource Management, 9(2): 12.
135. Yu, J., D. Bhatnagar and K. C. J. R. i. d. m. Ehrlich (2002). Aflatoxin biosynthesis. 19(4): 191-200.
136. Yuan, S., Y. Wu, J. Jin, S. Tong, L. Zhang and Y. J. T. Cai (2023). Biocontrol capabilities of *Bacillus subtilis* E11 against *Aspergillus flavus* in vitro and for dried red chili (*Capsicum annuum* L). Toxins, 15(5): 308.
137. Zou, M., K. Yu, H. Liu, Q. Sheng and Y. J. A. Zhang (2024). Effects of *Bacillus subtilis* on rose growth promotion and rhizosphere microbial community changes under saline–alkaline stress. Agronomy, 14(4): 730.

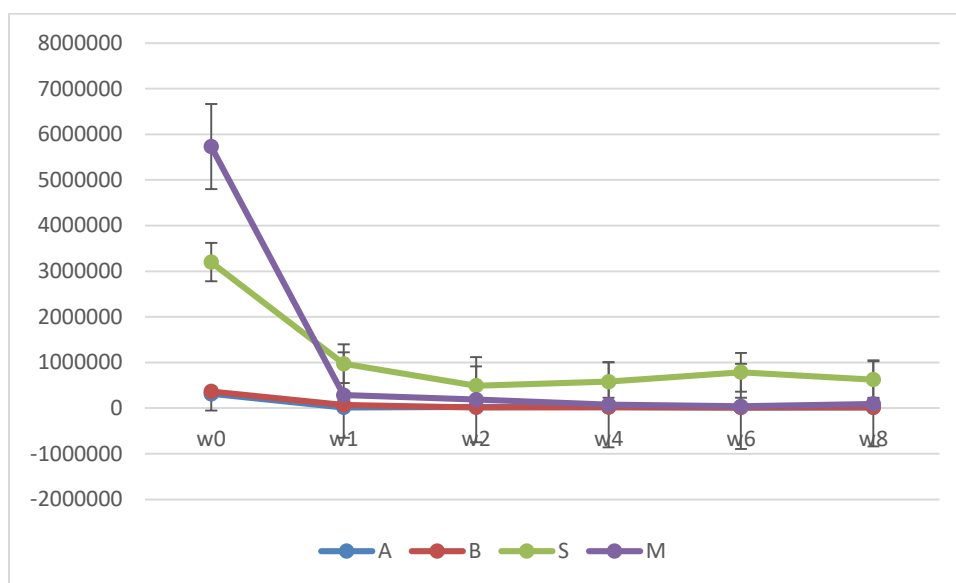
ملحق الرسالة

نتائج الدراسة الإحصائية:

بينت دراسة الفروق المعنوية للكثافة الجرثومية بين المناطق الأربعة خلال أسابيع التجربة قبل وبعد تلقيح

التربة، وجود فروق معنوية بين قيم الكثافة الجرثومية في الموقعين بين جميع عينات التربة عند قيمة المعنوية $P < 0.05$,

نتائج متوسطات الكثافة الجرثومية موضحة في المخطط البياني الآتي:



نتائج متوسطات الكثافة الجرثومية في عينات التربة في المواقع المدروسة بعد معاملتها بالفطر، مقارنة بالتجربة الشاهد قبل المعاملة w0

الجدول الإحصائية:

نتائج اختبار one sample t test وذلك لمعرفة الفروق المعنوية بين محافظتي القنيطرة والحسكة في قيم درجة الحموضة pH ضمن التربة.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسطات درجة الحموضة في الموقعين عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

Independent Samples Test

Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					
F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference

									Lower	Upper
درجة PH	Equal variances assumed	.098	.760	- 4.953-	10	.001	-.54333-	.10969	- .78774-	- .29893-
	Equal variances not assumed			- 4.953-	9.710	.001	-.54333-	.10969	- .78873-	- .29793-

نتائج اختبار one Way Anova وذلك لمعرفة الفروق المعنوية بين المناطق الأربعة في محافظتي القنيطرة والحسكة على درجة pH ضمن التربة.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسطات درجة الحموضة بين جميع عينات التربة في المناطق الأربعة في المحافظتين عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: درجة PH

LSD

(I) المنطقة	(J) المنطقة	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
A	B	.29000*	.09764	.018	.0648	.5152
	S	-.25667*	.09764	.030	-.4818-	-.0315-
	M	-.54000*	.09764	.001	-.7652-	-.3148-
B	A	-.29000*	.09764	.018	-.5152-	-.0648-
	S	-.54667*	.09764	.001	-.7718-	-.3215-
	M	-.83000*	.09764	.000	-1.0552-	-.6048-
S	A	.25667*	.09764	.030	.0315	.4818
	B	.54667*	.09764	.001	.3215	.7718
	M	-.28333*	.09764	.020	-.5085-	-.0582-
M	A	.54000*	.09764	.001	.3148	.7652
	B	.83000*	.09764	.000	.6048	1.0552
	S	.28333*	.09764	.020	.0582	.5085

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

نتائج اختبار one sample t test وذلك لمعرفة الفروق المعنوية بين محافظتي القنيطرة والحسكة لمحتوى المادة العضوية ضمن التربة.

حيث أكدت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات محتوى المادة العضوية في المحافظتين وبخطأ مقداره 0.05%.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
محتوى المادة العضوية	Equal variances assumed	10.935	.008	2.759	10	.020	1.67000	.60539	.32111	3.01889
	Equal variances not assumed			2.759	5.192	.038	1.67000	.60539	.13093	3.20907

نتائج اختبار one Way Anova وذلك لمعرفة الفروق المعنوية بين المناطق الأربعة في محافظتي القنيطرة والحسكة لمحتوى المادة العضوية ضمن التربة.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين متوسطات محتوى المادة العضوية في جميع عينات التربة في المناطق الأربعة في المحافظتين عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: محتوى المادة العضوية

LSD

(I) المنطقة	(J) المنطقة	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	Upper Bound
A	B	2.09667*	.60366	.008	.7046	3.4887
	S	2.65000*	.60366	.002	1.2580	4.0420
	M	2.78667*	.60366	.002	1.3946	4.1787
B	A	-2.09667*	.60366	.008	-3.4887	-.7046
	S	.55333	.60366	.386	-.8387	1.9454
	M	.69000	.60366	.286	-.7020	2.0820
S	A	-2.65000*	.60366	.002	-4.0420	-1.2580
	B	-.55333	.60366	.386	-1.9454	.8387
	M	.13667	.60366	.827	-1.2554	1.5287
M	A	-2.78667*	.60366	.002	-4.1787	-1.3946
	B	-.69000	.60366	.286	-2.0820	.7020
	S	-.13667	.60366	.827	-1.5287	1.2554

*, The mean difference is significant at the 0.05 level.

أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية باستعمال معامل بيرسون وجود علاقة ارتباط عكسية متوسطة (-0.4) بين درجة الحموضة ومحتوى المادة العضوية في محافظتي الحسكة والقنيطرة.

Correlations

		درجة PH	محتوى المادة العضوية
درجة PH	Pearson Correlation	1	-.455-
	Sig. (2-tailed)		.138
	N	12	12
محتوى المادة العضوية	Pearson Correlation	-.455-	1
	Sig. (2-tailed)	.138	
	N	12	12

نتائج اختبار Repeated Measures ANOVA وذلك لمعرفة الفروق المعنوية للكثافة الجرثومية بين المواقع الأربعة قبل وبعد تلقيح التربة بالفطر.

إحصائياً تبين وجود فروق معنوية بين قيم الكثافة الجرثومية في الموقعين بين جميع عينات التربة عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

Tests of Within-Subjects Effects

Measure: MEASURE_1

		Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	Partial Eta Squared
time	Sphericity Assumed	47835429166666.6	5	9567085833333.328	22.945	.000	.741
	Greenhouse-Geisser	47835429166666.6	1.153	41471767854953.140	22.945	.001	.741
	Huynh-Feldt	47835429166666.6	1.730	27657989691208.120	22.945	.000	.741
	Lower-bound	47835429166666.6	1.000	47835429166666.640	22.945	.001	.741
time * المنطقة	Sphericity Assumed	47268655499999.9	15	3151243700000.000	7.558	.000	.739
	Greenhouse-Geisser	47268655499999.9	3.460	13660131147297.326	7.558	.006	.739
	Huynh-Feldt	47268655499999.9	5.189	9110095517844.600	7.558	.001	.739
	Lower-bound	47268655499999.9	3.000	15756218499999.998	7.558	.010	.739
Error(time)	Sphericity Assumed	16678152000000.0	40	416953800000.000			

Greenhouse-Geisser	16678152000000.002	9.228	1807427204174.650			
Huynh-Feldt	16678152000000.002	13.836	1205393586198.451			
Lower-bound	16678152000000.002	8.000	2084769000000.000			

نتائج اختبار one Way Anova لمعرفة الفروق المعنوية بين نسب التنشيط الحيوي للعزلات الجرثومية المعزولة من المواقع الأربعة في محافظتي القنيطرة والحسكة.

تؤكد الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين نسب التنشيط الحيوي الجرثومي عند قيمة المعنوية $P < 0.05$.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: نسبة_التنشيط

(I) المنطقة	(J) المنطقة	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	LSD 95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	-11.78333-	8.24351	.165	-28.7281-	5.1614
	S	-23.00833*	7.52526	.005	-38.4767-	-7.5399-
	M	-24.84444*	7.77205	.004	-40.8201-	-8.8688-
B	A	11.78333	8.24351	.165	-5.1614-	28.7281
	S	-11.22500-	5.82904	.065	-23.2068-	.7568
	M	-13.06111*	6.14435	.043	-25.6910-	-.4312-
S	A	23.00833*	7.52526	.005	7.5399	38.4767
	B	11.22500	5.82904	.065	-.7568-	23.2068
	M	-1.83611-	5.14073	.724	-12.4030-	8.7308
M	A	24.84444*	7.77205	.004	8.8688	40.8201
	B	13.06111*	6.14435	.043	.4312	25.6910
	S	1.83611	5.14073	.724	-8.7308-	12.4030

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ABSTRACT

Aflatoxin B1 is classified as one of the most dangerous and toxic mycotoxins. It is produced by several fungal species, the most notably produced by *Aspergillus flavus*. It threatens global food security by damaging strategic agricultural crops susceptible to fungal invasion. Its role in the development of liver cancer cells in humans and animals has also been proven. Aflatoxin B1 derives its danger from its resistance to processing and degradation processes, due to the stability of its chemical structure. Given the effective biological role played by soil microbes in treating various types of environmental toxins and organic pollutants, the aim of this study was to isolate bacterial strains and evaluate their ability to bioinhibit *A. flavus* and inhibit its toxin secretion. This study also aimed to test their ability to biodegrade the most toxic aflatoxin, AFB1 *in vitro* and to molecularly characterize the degradation pathway. For this purpose, twelve local soil samples were collected, and bacteria were isolated from them to test their antibiosis against *A. flavus* strain NRRL 3357. Bacterial isolates that demonstrated superiority in inhibiting the toxic fungus, suppressing its sporulation, and limiting its toxin secretion, on the one hand, and were able to metabolize aflatoxin B1, on the other hand, were selected. These isolates were molecularly characterized using 16S rRNA gene sequencing technology. The superior bacterial isolates were identified based on their tested bioactivity as follows: *Delftia acidovorans* strain A2b2, *Bacillus licheniformis* strain B1a2, *Bacillus subtilis* strain S2a1, *Bacillus licheniformis* strain S2b6, and *Bacillus anthracis* strain S1A. The progressively decreasing biodegradation was accurately estimated using thin-layer chromatography (TLC). The research yielded promising results, as two bacterial strains belonging to the genus *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus*

licheniformis) excelled with a unique ability to metabolize and degrade the AFB1 at high rates of 94.85% and 92.55%, respectively.

The effectiveness of the enzymatic activity was tested using biochemical assays to interpret the ability to degrade the toxin. The results demonstrated a high and diverse enzymatic activity that distinguished the proven bacterial strains. The molecular mechanism of aflatoxin biodegradation was also tracked by detecting the proteins of bacterial cells extracted after treatment with the toxin and comparing them to the protein profile of the control before treatment. The quantitative changes in gene expression of the CotA gene, the most important gene with a proven role in aflatoxin degrading, were also assessed. The research results provide a future vision for exploiting the biological potential of bacterial strains in prevention and bioremediation processes.

Key words: Soil bacteria, *Aspergillus flavus*, aflatoxin B1, antifungal activity, biodegradation, enzymatic activity, 16S rRNA gene, CotA gene.

**Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Sciences
Plant Biology Department**



**Studying the antibiotic effect of bacterial strains isolated from
the soil on the growth of toxin-producing fungi and testing
their ability to degrade aflatoxins**

A dissertation submitted in fulfillment of the requirements for the degree
of Ph.D. in Plant Biology (Microbiology)

by

Sabrin Zaher Mahfouz

Supervisors

The main supervisor
Assist.Prof. Dr. Mohamad Bashir Arnous

The associate supervisor
Prof. Dr. Abdulsamie Hanano

1447-2025