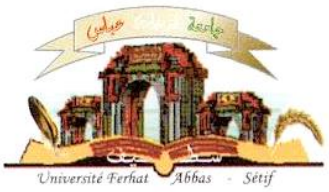
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة فرحات عباس، سطيف 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة



Université Ferhat Abbas Sétif 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم علم الأحياء الدقيقة

N°...../SNV/**2018**

أطروحة

مقدمة من طرف

جلال نجيحة

للحصول على شهادة

دكتوراه علوم

فرع: البيولوجيا

تخصص: الميكروبيولوجيا

الموضوع

المكافحة البيولوجية *لفطر* ***Aspergillus flavus*** *الملوث* لغذاء الدواجن باستعمال بكتيريا ***Bacillus megaterium*** و خميرة ***Pichia anomala***.

نوقشت بتاريخ 04 / 05 / 2019

أمام لجنة المناقشة

الرئيس :	محمد ميهوب زروق	أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف 1
المشرف :	لعروس العربي	أستاذ جامعة فرحات عباس سطيف 1
الممتحنون:		
السيدة:	سامية مزعاش عيشور	أستاذة محاضرة أ جامعة فرحات عباس سطيف 1
السيد:	حسين غروشة	أستاذ جامعة قسنطينة 1
السيد:	نور الدين قاسم شاوش	أستاذ جامعة قسنطينة 1
السيد:	مولود غضبان	أستاذ محاضر أ جامعة المسيلة

مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية

تشكرات

إن الحمد لله نحمده و نشكـــــره على نعـمـــة القلـــم و نصيب العلـــم الذي وهبنا إيـــــاه فلولاه ما كان لهذا العمل أن ينجز و لولاه ما كنا لنجني ثمرة مجهودنا، فله الحمد حتى يرضى و له الحمد إذا رضي.

أتقدم بفائق الشكر و التقدير إلى الأستاذ المشرف الدكتور* لعروس العربي * على مساعدته و توجيهاته و نصائحه القيمة طيلة هذا البحث.

وأشـكر جميع أعـضاء لـجنة المناقشة الذين قبـــلوا مناقشة هذا البـحث، الأستاذ: محمد ميهوب زروق، أستاذ بجامعة فرحات عباس سطيف 1 والأســتاذة: سامية مزعـــاش عيـــشور ،أستاذة محاضرة أ بجامعة فرحات عباس سطيف 1 والأساتـــذة الكـــرام: حسين غـــروشة ،أستاذ بجامعة قسنطينة 1 و نـــــور الـــدين قاسم شاوش، أستاذ بجامعة قسنطينة 1 و الأســتاذ مولود غضبان ،أستاذ محاضر أ بجامعة المسيلة.

كما أتقدم بالشكر الخاص إلى الأساتذة الكرام السيدة: سيليني حفصة، السيدة: بوسواليم نوال والسيدة: سميرة سعيدي و السيدة عريف فوزية والسيد: سيليني علاوة على كل المساعدات المقدمة و الدعم المعنوي لإنجاز هذا البـــــحـــث.

وأشكر جميع الزملاء و الزميلات الأساتذة الذين قدموا يد المساعدة و النصائح النيرة فجزاهم الله كل خير و بركة.

الملخص

تناولت هذه الدراسة عزل و تشخيص الفطريات و الخمائر الملوثة لستة عينات من غذاء الدواجن، تم جلبها من المجمع الشرقي للدواجن بالعلمة، ولاية سطيف. و أمكن تحديد أهم الأجناس الفطرية الملوثة مع نسب تلويثها لكل عينة، حيث شكل فطر *Penicillium* أكبر نسبة تلوث ب 74.58% (44 عزلة) يليه فطر *Aspergillus* 20.34 %(12 عزلة)، ثم فطر *Trichoderma* 3.39 %(2 عزلة) و أخيرا فطر *Rhizopus* ب 1.70 % (عزلة واحدة). ومن خلال الاختبار البيولوجي للفطريات المعزولة تم تحديد فطر *Aspergillus flavus* كأحد أهم الفطريات الملوثة حيث بينت النتائج قدرته على إنتاج سم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 إضافة إلى حمض – beta cyclopiazonique. و أوضحت التجارب المخبرية للمكافحة البيولوجية لفطر*A. flavus* باستعمال بكتيريا Bacillus *megaterium* فعالية كبيرة على الوسط الصلب، حيث ثبطت نمو الفطر بنسب تراوحت بين 40.75 و 47.56 % ، كما انخفض الوزن الجاف للميسيليوم من 1.25 غ إلى 0.83 غ من خلال تأثير الرشاحة البكتيرية على نموه، وهذا اعتمادا على عدة آليات للمكافحة كإنتاج الإنزيمات المحللة التي تم الكشف عنها في هذه الدراسة، و المتمثلة في إنزيمات: Chitinase, Cellulase, Amylase, Protéase .أما خميرة *Pichia anomala* وعزلتيها L_1 و L_2 ، فكانت قدرتها على تثبيط الفطر عالية هي الأخرى خاصة العزلة L_2 ، حيث تراوحت نسبة تثبيطهما لفطر *A. flavus* بين 72.22و 77.78 % على التوالي على وسط PDA ، في حين كان تأثير المركبات الطيارة الضد فطرية المنتجة من طرف الخميرة فعالا من خلال خفض النمو القطري للفطر بنسب تثبيط تراوحت بين 61.90 % بالنسبة ل L_1 و 60.75 % بالنسبة ل L_2 . كما سجل أيضا في هذه الدراسة قدرة عزلتي الخميرة على إنتاج الإنزيمات المحللة، خاصة منها: Chitinase Amylase، Cellulase و السموم القاتلة لدى العزلة L_2 و تبين ذلك من خلال قياس النشاطية القاتلة التي كانت بنسبة كبيرة لديها، إذ وصلت إلى 71.57 % مقارنة مع L_1 ب 14.18 %، أما مكافحة فطر *A flavus* مباشرة داخل المخازن المصغرة (mini-silo) لغذاء الدواجن بخميرة *P. anomala* فقد كانت جيدة حيث انخفض نمو الفطر بدرجة ملحوظة مع العزلة L_2 خلال فترة الحضن البالغة 12 يوم، مقارنة مع الشاهد.

الكلمات المفتاحية: غذاء الدواجن، المكافحة البيولوجية، *Aspergillus flavus*، Bacillus *megaterium*، *Pichia anomala*.

Résumé

Dans cette étude, on a isolé et identifié des champignons et des levures contaminants l'alimentation de la volaille du Groupe Avicole de l'Est (ENAP) –El-Eulma, Sétif. Les plus importantes espèces fongiques contaminantes identifiées sont: *Pénicillium* qui a été retrouvé avec un taux de 74,58% (44 isolats), suivie par *Aspergillus* avec 20,34% (12 isolats), puis *Trichoderma* avec 3,39% (deux isolats), le plus faible taux a été enregistré avec *Rhizopus* 1,70% où on n'a identifié qu'un seul isolat. À partir des tests biologiques un isolat d'*Aspergillus flavus* a été identifié comme un des plus importants contaminants et a montré sa capacité à produire de l'aflatoxine B1 et B2 ainsi que de la bêta-cyclopiazonique. Des expériences de lutte biologique menées *in vitro*, ont montré que la bactérie *Bacillus megaterium* était très efficace dans l'inhibition de la croissance d'*A. flavus* sur milieu solide avec des taux de croissance fongiques variant de 40,75% à 47,56%. D'autre part, le filtrat bactérien a influencé la croissance, où l'on a observé une diminution du poids sec du mycélium qui est passé de 1,25 g à 0,83 g. Ces activités peuvent être le résultat de plusieurs mécanismes de contrôle tels que la production d'enzymes hydrolytiques produites par la bactérie telles que: Protéase Amylase, Chitinase et Cellulase. La capacité inhibitrice des isolats de la levure *Pichia anomala* (L_1 et L_2), a été très élevé particulièrement L_2, avec des taux d'inhibition allant de 72,22 à 77,78% suxicivement sur PDA, alors que les composés volatils produits par les levures ont inhibé le champignon avec 61,90% pour L_1 et 60,75% pour L_2. Les levures aussi ont produits des enzymes telles que: l'Amylase, la Chitinase, la cellulase ; et des toxines particulièrement mortels par L_2. Ceci est montré par la mesure de la réactivité létale qui était importante par L_2, qui a atteint 71,57% par rapport à L_1 Avec 14,18% seulement. Le contrôle biologique d'A. flavus lors de l'emmagasinage (mini-silo) par la levure était non négligeable, où une diminution importante de la croissance fongique est obtenue lors d'une co-culture de 12 jours avec L_2, par rapport au témoin.

Mots Clés: l'aliment de la volaille, Lutte biologique, *Aspergillus flavus, Bacillus megaterium, Pichia anomala.*

Abstract

This study dealt with isolation and diagnosis of contaminants of Poultry feed from the Eastern Poultry Group (ENAP) El-Eulma Sétif. The most important species of fungal contaminants are identified: *Penicillium* which was found with a rate of 74.58% (44 isolates), followed by *Aspergillus* with 20.34% (12 isolates), *Trichoderma* with 3.39% (two isolates) and finally the lowest rate (1.7%) was obtained with *Rhizopus* (one isolate). *Aspergillus flavus* has been identified as one of the most important fungal fungi. The results showed its ability to produce aflatoxin B1 and B2 as well as beta cyclopiazone. *In vitro*, biological control experiments shown that *Bacillus megaterium* is very effective in inhibiting the growth of *A. flavus* on solid medium with and growth rate ranging from 40.75% to 47.56%. On the other hand, the bacterial filtrate influenced mycelium growth, which decreases its weight from 1.25 g to 0.83 g. These activities may be the result of several mechanisms as production of hydrolytic enzymes such as: Protease Amylase, Chitinase and Cellulase. Another group of contaminants were identified as two mating types of *Pichia anomala* (L_1 and L_2). The inhibitory capacity of these isolates was very high, particularly L_2. This latter inhibited *A. flavus* with a rate ranging from 72, 22 to 77, 78% on PDA, whereas the volatile compounds inhibited the fungus with 61, 90% for L_1 and 60,75% for L_2. Yeasts also produce amylase, chitinase, cellulase; and particularly killer toxins produced by L_2. This is shown by the measurement of the steady state reactivity which was important for L_2, which reaches 71.57% compared to L_1 with only 14,18%. The biological control of *Aspergillus flavus* during storage by yeasts was not negligible, where the fungal growth decline during the 12-days of co-culture with L_2, compared to the control.

Keywords: Poultry feeds, Biological control, *Aspergillus flavus, Bacillus megaterium, Pichia anomala*

قائمة الجداول

الصفحة

جدول(1): أهم الكائنات الدقيقة الممرضة وأنواع الكائنات المضادة لها و ظروف التطبيق..... 9

جدول(2): بعض العوامل المقاومة و المرحلة التي يتأثر فيها العامل الممرض 13

جدول(3): بعض المضادات الحيوية المنتجة من طرف أنواع الجنس*Bacillus*..... 19

جدول(4): أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية..... 23

جدول(5):مصادر أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية..... 24

جدول(6): النسب المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من عينات غذاء الدواجن..... 47

جدول(7): الخصائص المزرعية لعزلة *A.flavus* النامية على أوساط التشخيص وعلى درجات حرارة مختلفة بعد أسبوع من الحضن 52

جدول(8): قطر هالة التثبيط لعزلات. *A. flavus* المختبرة على البكتيريا في الاختبار البيولوجي..... 54

جدول(9): التغيرات اللونية و الإشعاعية لمكونات مستخلص وسط زرع مستخلص الخميرة..... 55
لعزلة *A.flavus* بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في نظام الهجرة (T:E:F)

جدول(10): نتائج التشخيص البيوكيميائي لخميرة ***P. anomala*** *(L_1 ,L_2)* حسب شريحة API bio..... 61

قائمة الأشكال

الصفحة

الشكل(1): بعض الأعراض المرضية المتسببة عن سم الأفلاتوكسين.....6

الشكل(2):تثبيط الفطر وفق طريقة Arras (1993).....36

الشكل(3): تثبيط الفطر وفق طريقةVincent و آخرون (1991).....36

الشكل(4): تجربة نظام المخازن المصغرة (Mini-silo) لمكافحة فطر *A.flavus*.....45

الشكل(5): توزع النسب المئوية للأجناس الفطرية الملوثة لعينات غذاء الدواجن.....47

الشكل(6): نسبة التلوث لعينات غذاء الدواجن ($E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6$) بدلالة الفطريات المعزولة.....49

الشكل(7): الشكل المجهري (أ) و المظهري (ب) لفطر *A. flavus*.....51

الشكل(8): مستعمرات فطر *A.flavus* النامية على أوساط تشخيص مختلفة.....53

الشكل(9): التأثير التثبيطي لبكتيريا *B.megaterium* على فطر*A. flavus* 57

الشكل(10): التأثير التثبيطي للرشاحة البكتيرية على الوزن الجافللميسيليوم..... 58

الشكل(11): إنتاج الإنزيمات المحللة لبكتيريا *B.megaterium*.....59

الشكل(12): مستعمرات عزلتي خميرة *Pichia anomala* *على وسط YPD (28° م) (L_2 ,L_1)*.....60

الشكل(13): التسلسل الجزيئي لنواتج PCR للعزلة L2.....62

الشكل(14): التأثير التثبيطي لفطر *A. flavus* بعزلتي خميرة *Pichia anomala (L_2 ,L_1)*على الوسط الصلب....64

الشكل(15): تثبيط النمو القطري لفطر *A.flavus* بخميرة *Pichia anomala* على الوسط الصلب.....64

الشكل(16): التأثير التثبيطـــي للمركبات الطيـارة المفرزة من طرف *P anomala* على النمو القطري لفطر *A.flavus*.....65

الشكل(17): إنتاج الإنزيمات المحللة لخميرة *P anomala*.....67

الشكل(18): المعدل القطري لإنتاج الإنزيمات المحللة المنتجة من طرف عزلتي خميرة *P anomala* 68

الشكل(19): النشاطية القاتلة لخميرة *Pichia anomala* ضد فطر *A.flavus*.....68

الشكل(20): التأثير التثبيطي للسموم القاتلة للعزلتين L_1 و L_2 غلى نمو فطر *A.flavus* على وسط MBA عند درجة حرارة 20°م و$pH_=4$.....69

الشكل(21): نمو فطر *A.flavus في غياب و وجود عزلتي خميرة Pichia anomala* ($L1, L_2$).....70

المقدمة

المقدمة

تمثل الأعلاف أكثر العناصر كلفة في مشاريع الإنتاج الحيواني بكل أنواعه، حيث تتراوح نسبة التكلفة ما بين 60- 70% من التكلفة الكلية. (رشا محمد الميهي، 2014)، لذا فحماية الأعلاف من الفساد مهمة صعبة للحفاظ على جودتها ومواصفاتها بالنظر إلى صعوبة التغلب على أسباب الفساد.

وتعتبر أعلاف الدواجن من أهم وسائل نقل المسببات المرضية، حيث أنها تتكون من خليط من الحبوب سواء بشكلها المباشر كالذرة و الشعير أو بعد تصنيعها كمخلفات، إضافة إلى بعض المواد الأخرى كالفيتامينات والبروتينات والأملاح المعدنية المضافة لتحسين القيمة الغذائية لها، فهي بذلك تكون معرضة للتلوث بالكائنات الحية المختلفة، سواء كان ذلك في الحقل أو أثناء التخزين.

و تشكل الفطريات الممرضة نسبة كبيرة من هذه الملوثات، حيث تستمر في تطورها في الحبوب وتبقى داخلها دون أن تظهر خارجيا على سطحها، لكنها تحدث تغيرات داخلية كإنتاج السموم الفطرية في الحبوب المخزنة.ويرتبط تلوث الحبوب بالظروف البيئية أثناء تواجدها في الحقل إضافة إلى ظروف نقلها و تلوثها أثناء التخزين، تحت تأثير عوامل درجة الحرارة و الرطوبة ووفرة الأوكسجين. فهناك أكثر من 50 نوع فطري تسبب مشاكل صحية كبيرة للإنسان والحيوان، تفرز حوالي 350 نوع من السمـــوم الفطرية (ABO-SHAMA، 2015) والتي من أهمها : سموم الأفلاتوكسين و الأوكراتوكسين والزيرالينون، التي تتميز بكونها عالية الثباتية لا يمكن تحطيمها حراريا، مما يعني أن الحبوب الملوثة بها يمكن أن تكون مضرة للإنسان والحيوان، حيث تتجمع في جسم الحيوان لتنتقل إلى الإنسان عن طريق استهلاكه لمختلف منتجات الدواجن والحليب واللحوم والبيض، كما تسبب كذلك تأثيرات مرضية خطيرة للدواجن (سرطان الكبد، ضعف النمو و الخصوبة.....) إضافة إلى التأثير على الأعضاء الحيوية للدواجن كالكبد والطحال والرئتين، مما يؤثر على الإنتاجية لديها، وبالتالي خسائر اقتصادية كبيرة.

من هنا ندرك الأهمية التي تشكلها الفطريات الملوثة لأعلاف الدواجن وتأثيراتها السلبية الخطيرة على صحة الدواجن و الإنسان بدرجة أكبر. لذا كان من الضروري التفكير في إيجاد طرق مكافحة ناجحة وفعالة لتجنب تلوث الأعلاف والحد من التأثيرات الخطيرة للسموم الفطرية الملوثة لها.

طرحت آلية المكافحة البيولوجية (Biological Control) باستعمال كائنات دقيقة حية مضادة كالبكتيريا والفطريات، التي تبدو مشجعة جدا كحل بديل بيئيا وتجاريا، كونها غير ملوثة للبيئة وغير مكلفة مقارنة مع المبيدات الكيميائية والأحماض العضوية.

لذا فقد تناولت هذه الدراسة، عزل وتشخيص الفطريات الملوثة لغذاء الدواجن لعينات جلبت من المجمع الشرقي للدواجن (وحدة تغذية الأنعام) المتواجد بالعلمة، ولاية سطيف، ثم اختبار الأجناس الفطرية المعزولة بيولوجيا لتحديد أهم الفطريات الملوثة والكشف عن أهم السموم الفطرية التي تفرزها ثم مكافحتها بيولوجيا وهذا باستعمال بكتيريا *Bacillus megaterium* مع دراسة بعض أهم آليات المكافحة لديها، وكذلك استعمال خميرة *Pichia anomala* (عزلتي L_1 وL_2) المعزولة من غذاء الدواجن في المكافحة ومحاولة معرفة أهم الآليات التي تطبقها في مكافحة الفطر ثم تطبيقها مع الفطر الملوث مباشرة داخل مخازن مصغرة لغذاء الدواجن لتحديد مدى فعاليتها في تثبيط الفطر.

الفصل الأول
مراجعة المصادر

1– تلوث الأعلاف بالفطريات

يمثل العلف أكثر العناصر كلفة في مشاريع الإنتاج الحيواني بكل أنواعه، حيث تتراوح نسبة التكلفة مابين 60-70% من التكلفة الكلية، وقد يبدو أن حماية الأعلاف من الفساد تتمثل في المحافظة على جودة ومواصفات الأعلاف من الحصاد حتى التغذية، إلا أن هذه العملية تعتبر من الصعوبة بمكان نظرا لصعوبة التغلب على أسباب الفساد. عادة ما تشجع الظروف البيئية التي تخزن فيها الأعلاف نمو وتكاثر الفطريات، كما أن احتواء الأعلاف على مواد مختلفة كالمعادن والفيتامينات يشجع نمو أغلب الكائنات الحية (رشا محمد الميهي، 2014) مما يعني أن غذاء الدواجن يشكل بيئة جيدة لنمو الفطريات وتكاثرها (ABO-SHAMA، 2015 و سعدية ياسر الحبوري، 2006).

يسبب تلوث غذاء الدواجن بالفطريات خسائر كبيرة على الغذاء وتأثيرات سلبية على صحة وإنتاج الدواجن، فهناك أكثر من 100.000 نوع فطري يعتبر كملوث طبيعي للغذاء والمنتجات الزراعية (ABO-SHAMA، 2015) ومن بين أكثر الفطريـــات انتشارا في الأعلاف نجد أجناس *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* إضافة إلى *Mucor* و *Rhizopus* (Stuper وآخرون، 2015 ،Okoli وآخرون، 2006، Dalcero وآخرون 1997) .

1-1- التلوث بفطر *Aspergillus*

تنتشر الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* في الطبيعة بشكل كبير، مسببة تلوث المحاصيل قبل عملية الحصاد أو أثناء التخزين، والتي من أهمها: الذرة، الشعير، الفول السوداني، وغيرها، ويعد فطر *Aspergillus* من أكثر الفطريات سيطرة في فساد الأعلاف وخفض نوعية الغذاء والتأثير على صحة الحيوان (Rosa وآخرون، 2006 و محمد عبد العباس و آخرون،2011)، باعتبار أعلاف الدواجن بيئة جيدة لنمو الفطر وتكوين السموم، خاصة وأن تركيبها يحتوي على بقايا محاصيل أو حبوب غير صالحة للاستهلاك الآدمي، فعادة ما يضاف إليها بعض المواد لتحسين قيمتها الغذائية مثل البروتينات والفيتامينات والأملاح المعدنية أو إضافة دم مجفف أو مسحوق سمك.

إن أكثر أنواع *Aspergillus* التي تم عزلها، كانت تحت ظروف تخزين غير ملائمة، أين النشاط المائي يتراوح بين 0.8–0.9 ومجال حراري واسع يتراوح بين 19–35°م، فهذه الظروف تحفز وتسمح بالنمو النوعي لفطر

A.flavus بدرجة أكبر مقارنة مع باقي الفطريات الأخرى، فهذا الفطر من أكثر الأنواع انتشارا وتلوثا للمنتجات الزراعية في مناطق مختلفة من العالم مثل: البرازيل، الأرجنتين، اسبانيا، غانا، ايطاليا، باكستان وحتى الجزائر، ويرجع هذا إلى اعتبار الحبوب أكثر المكونات التي تدخل في تكوين الأعلاف (Iheanacho وآخرون ، 2014).

2- السموم الفطرية في الأعلاف

2-1- تعريف

السموم الفطرية هي مركبات أيضية ثانوية، تنتجها مجموعة من الفطريات عند نموها على بيئة مناسبة لها وهي نشطة بيولوجيا غير انتيجينية بمعنى خلو تركيبها الجزيئي من المكونات التي تدفع الجسم إلى تكوين أجسام مضادة لها، أغلبها سام للإنسان والحيوان والنبات والكائنات الحية الدقيقة (رشا محمد الميهي، 2014).فهناك أكثر من 400 نـوع ســم فــطري تم تشخيــصها أهمها: Aflatoxin ، Ochratoxin، Fumonisin، Vomitoxin و Zearalenone (Chi و Broomhead ، 2008).

تصل السموم الفطرية إلى طعام الإنسان والحيوان، سواء عن طريق تلوث الغذاء بالفطر المفرز لهذه السموم، ويسمى هذا بالتلوث المباشر، أو أثناء مراحل الإنتاج المختلفة أو أثناء النقل أو خلال فترة التخزين. ويسبب وجودها في الغذاء مشاكل صحية كبيرة للإنسان والحيوان (Parviz وآخرون، 2014 و Ghaemmaghami و آخرون، 2016).

2-2- العوامل المؤثرة على إنتاج السموم الفطرية

هناك عوامل وراثية تتعلق بالفطر وسلالته وقدرته المرضية، وعوامل بيئية منها:

- المحتوى الغذائي للمادة التي ينمو عليها الفطر.
- الرطوبة النسبية للوسط.
- درجة حرارة الوسط.
- محتوى الوسط من غاز الأكسجين و CO_2
- التلف الميكانيكي للحبوب الذي يسهل الإصابة بالفطر وإنتاج السم. (رشا محمد الميهي ، 2014).

2-3- سم الأفلاتوكسين

يتكون سم الأفلاتوكسين على المواد الغذائية المتمثلة في حبوب الذرة والقمح والأرز، حيث أنها من أكثر المواد المشجعة لإنتاج السموم الفطرية، مقارنة مع المواد ذات المحتوى الزيتي مثل الفول السوداني وفول الصويا. و يعد الأفلاتوكسين من أخطر السموم الفطرية، ينتجه فطري : *A. flavus* و *A. parasiticus* بتراكيز مرتفعة غالبا ما تتجاوز الحد الأقصى المسموح به والذي أقرته منظمة الأغذية و الزراعة (FAO) وهو 30 ميكروغرام/كلغ (ناهد محمد ونيفين عبد الغني، 2010).

يوجد الأفلاتوكسين في 4 أنواع رئيسية وهي: أفلاتوكسين B_1 ، B_2 ، G_1 ، G_2 ويعتبر B_1، G_1 الأكثر سمية، كما يوجد سم M_1 وهو مستقلب من B_1 يظهر في حليب الأبقار خاصة التي تتغذى على أعلاف ملوثة بسم B_1 (Parviz وآخرون، 2014; Chang-yem و Bidasse ،1992، Salwa و Anwar، 2009 و Morrison وآخرون، 2017).

2-3-1- تأثير الأفلاتوكسين على صحة الدواجن

تتأثر جميع أنواع الدواجن بالأفلاتوكسين، ويعتبر الدجاج البياض الأكثر تحملا للأفلاتوكسين على الكتاكيت الصغيرة، وتتفاوت درجة حساسيتها لحالات التسمم بالأفلاتوكسين، إذ تتراوح قيم الجرعات النصف مميتة (DL50) بين 0.3 – 17.9 ملغ/كلغ من وزن الجسم تبعا لنوع الحيوان، ويعد الكبد الأكثر تأثرا فقد أثبتت التجارب حدوث تلف للكبد مع تكتلات دهنية وتضخم القنوات المرارية لكلا من الدجاج والبط، وبيّنت دراسات أخرى أن لسم الأفلاتوكسين تأثير على الطحال والكلى والرئتين، حيث يحدث لهم نزيف وبقع دموية، هذا وقد أجمعت كل الأبحاث على حدوث سرطان الكبد. (Whithow و Hagler، 1998).

تختلف أشكال التسمم الفطري عند الدواجن حسب نوعية السموم وتركيزها في الأعلاف فمنها:

- **التسمم الحاد** : يحدث عند تناول الدواجن أعلاف ذات تراكيز عالية من السموم فيظهر عليها الضعف والخمول ونفش الريش واصفرار الوجه.
- **التسمم المزمن**: يحدث عند تناول الدواجن أعلاف ملوثة بسموم فطرية ذات تركيز منخفض، وهذا النوع من التسمم له أهمية اقتصادية كبيرة ويسبب الأعراض التالية:

- التهابات بالأمعاء واسهالات مختلفة الشدة.
- انخفاض أوزان الدجاج نتيجة فقد الشهية.
- رداءة نوع اللحم.
- انخفاض إنتاج البيض مع ارتفاع نسبة الكسر.
- ظهور نزيف دموي بشكل بقع حمراء وأحيانا كدمات زرقاء منتشرة في عضلات الجسم وتحت الجلد.
- انخفاض نسبة التفريخ والإخصاب وصغر حجم البيض، بسبب سوء امتصاص المواد الغذائية (الأحماض الأمينية والفيتامينات). (رشا محمد الميهي، 2014). (شكل 1)

شكل (1): بعض الأعراض المرضية المتسببة عن سم الأفلاتوكسين (رشا محمد الميهي، 2014).

2-3-2 - التحكم في سم الأفلاتوكسين

بهدف التقليل من التعرض لسم الأفلاتوكسين، تقوم الهيئات والمنظمات المسؤولة عن سلامة الأغذية بفحص الأغذية التي تعتبر مصدرا لهذا السم للتأكد من سلامتها، ولأنه لا يمكن تفادي تلوث الأغذية بهذه السموم، حتى باستخدام التقنيات العالية في التصنيع الغذائي، سمحت Food and Agriculture Organisation (FDA) بوجود مستويات محددة من سموم الافلاتوكسين في الأغذية، وأثبتت (FAO) أن 25 % من غذاء العالم ملوث بسموم الأفلاتوكسين وأن المستويات المقبولة عن هذا السم في الأغذية هي 20 ppb وهو الحد الأقصى المسموح به من السم. (Pleadin ، 2015 و Osho وآخرون، 2007).

3- الإجراءات الوقائية لمكافحة التسمم الفطري في الأعلاف

- تخزين الأعلاف في صوامع تتوفر فيها الشروط المناسبة من حرارة ورطوبة وتهوية.
- تجنب تعرض صوامع الأعلاف لأشعة الشمس المباشرة وتخزين كميات من العلف تكفي للاستهلاك لمدة قصيرة.
- غسل وتعقيم دوري للمعالف والمساقي وصوامع التخزين.
- استخدام مضادات الفطريات في مصانع العلف مثل الأحماض العضوية.(محمد عبد العباس و آخرون، 2011).

4- المكافحة البيولوجية

بدأ علم المكافحة البيولوجية منذ قرن واحد، وكان التركيز منصبا على الحشرات حتى وقت قريب، وتعتبر حاليا كواحدة من أكثر الطرق تقدما في مجال السيطرة على الآفات، ومن الأسباب الرئيسية لذلك، أن الإستفادة القصوى منها تعتمد على الإلمام الجيد بالمعلومات البيولوجية والبيئية لكل من الكائن الممرض والكائن المضاد له ضمن النظام البيئي الزراعي (Whipps و Lumsden، 1989). وقد تعدد تعريف المكافحة البيولوجية من باحث إلى آخر، فـ Baker (1987) عرّفها على أنها:"خفض تركيز لقاح الكائن الممرض، ونشاطيته المسببة للمرض من طرف كائن حي مضاد أو أكثر، وبمشاركة النبات العائل دون تدخل الإنسان" (Wilson و El-Ghaouth،

1993). أما وصفي عماد الدين (1993) فقد عرفها على أنها:"استعمال كائن أو كائنات حية دقيقة لمقاومة طفيل، لمنع حدوث المرض أو خفضه كلما أمكن ذلك، ويقاوم الطفيل قبل حدوث الإصابة أو بعدها".

من هنا يتضح أن المكافحة البيولوجية تتم بطرق متنوعة ففي بعض الحالات تضاف مضادات المرض إلى النظام الزراعي وفي حالات أخرى نحو البيئة بما يلائم التضاد والمضادات، فمعظم الطرق تتضمن المكافحة التي توجه لخفض المرض الابتدائي الذي يحدث بواسطة الممرضات التي تسكن التربة، ذلك أن البيئة الأرضية أكثر ثباتا وأقل انجرافا من البيئة الهوائية. وقد بذلت مجهودات منذ الثمانينات في اتجاه المكافحة البيولوجية عما كان في الوقت السابق.بالنظر إلى الأثر الإيجابي لها فإن التخلي عن الاستعمال الدائم والمتكرر للمبيدات الفطرية في مكافحة مختلف الأمراض النباتية أصبح واضحا في السنوات الأخيرة. (Bartagnolli و آخرون، 1998) والحاجة إلى إيجاد طرق بديلة بات ضروريا، خاصة مع ظهور وتطور سلالات مقاومة من جهة، إضافة إلى التأثير السلبي على صحة المستهلك وبيئته من جهة أخرى. (El-Ghaouth و آخرون، 2000 و Sharifazizi،2017) وتشكل هذه المبيدات ما نسبته 60% من مجموع الأخطار التي تهدد صحة الإنسان. (Wilsonو El- Ghaouth ، 1993). لذا وجدت طرق المكافحة البيولوجية كأسلوب جديد يمكن الاعتماد عليه في مكافحة الآفات مع أقل تقدير من المشاكـــل و الأضرار، وهذا باستعمال كائنات حية دقيقة كعوامل مكافحة، والتي تشمل الفطريات والبكتيريا والخمائر (جدول 1).حيث كانت الفطريات أكثر فعالية على مستوى الحقل، بينما سجلت البكتيريا والخمائر فعاليتها على الثمار بعد جنيها، وهذا ما يدل على قدرة الفطريات على النمو تحت ظروف قاسية وقدرة البكتيريا والخمائر على النمو الجيد في محيط غني بالمواد الغذائية داخل جروح الثمار الناضجة. (El- Ghaouth و آخرون، 2000).

جدول (1): أهم الكائنات الدقيقة الممرضة وأنواع الكائنات المضادة لها و ظروف التطبيق (Komen و Jeffries، 1993).

الفاكهة	الممرض	المضاد	التطبيق
1- البكتيريا			
الليمون	*Alternaria citri* *Geotrichum candidum* *Penicillium digitatum*	*Bacillus subtilus*	مخبري
الخوخ	*Monilinia fruticola* *Colletotrichum gloeosporoides*	*B. subtilus* B3	مخبري
الكرز	*Monilinia fruticola* *Alternaria alternata*	*B. subtilus* *Enterobacter aerogenes*	مخبري مخبري
التفاح	*P. expansum*	*Pseudomonas cepacia*	مخبري
التفاح و الإجاص	*Botrytis cinerea*	*P. syringae* *Acremonium breve*	مخبري مخبري
2- الخمائر			
الليمون	*P. digitatum* *P. italicum* *Geotrichum candidum*	*Candida guilliermondii*	مخبري
التفاح	*Botrytis cinerea*	*C. guilliermondii* *Cryptococcus laurentii*	مخبري مخبري
3- الفطريات			
الخوخ	*Monilinia loxa*	*Penicillium frequentans*	حقلي
الأناناس	*P. funiculosum*	*P. funiculosum*	حقلي
الفراولة	*Botrytis cinerea*	*Trichoderma sp.*	حقلي

وقد أثبتت المكافحة البيولوجية قدرة فائقة على مراقبة مختلف الأمراض التي تصيب النبات سواء في الحقل أو بعد جني المحصول وتخزينه. ففي البداية كانت التقنية ناجحة مخبريا وفاشلة على مستوى الحقل، لكن باستعمال كائنات مضادة فعالة، وباستيعاب مختلف التفاعلات الحاصلة بين النبات والعوامل البيئية والمحصول المنتج والعامل الممرض والكائن المضاد، أمكن مراقبة المرض حقليا. (Swadling و Jeffries، 1998). ومن بين الآليات الممكنة المستعملة في التضاد الحاصل بين الكائن الممرض والمضاد نجد: إنتاج الإنزيمات المحللة، التطفل التنافس على الغذاء والمكان و إنتاج المضادات الحيوية. (Janisiewicz ، 2001).

بهدف تطوير نظام المكافحة البيولوجية لا بد من تحسين فعالية العامل المضاد وتوسيع مجال نشاطيته بتطوير طرق تطبيقه في مجالات مختلفة كاستعمال مواد غذائية تنشط نمو المضاد وتقلل منه لدى العامل الممرض. (Boland و Kuykendall، 1998) كإضافة بعض المواد النتروجينية كالأحماض الأمينية مثل L. Asparagine و L. proline، التي تحسن من إنتاج الكتلة الحيوية والمركبات المضادة للفطريات كما هو الحال بالنسبة للفطرين *Gliocladium virens* و *Trichoderma spp.*، اللذان يدخلان في المكافحة البيولوجية للكائنات الممرضة الموجودة في التربة الزراعية الخصبة. (Janisiewicz، 1994)، ووجد بأن إضافة الكالسيوم تزيد من فعالية الخمائر المضادة وتخفض إنتاش أبواغ ونمو أنبوب الإنبات لدى فطري *Penicillium expansum* و *Botrytis cinerea*. كما يثبط أيضا نشاطية الإنزيمات المحللة للبكتين المنتجة من طرف هاذين الفطريين (Wisnieweski و آخرون، 1995 و Janisiewicz، 1998).

4-1- عزل عوامل المكافحة البيولوجية

وجد أن العديد من الكائنات الحية المضادة المعزولة من التربة ومختلف أجزاء النبات والثمار المخزنة، تملك قدرة كبيرة على مراقبة أمراض مابعد الحصاد التي تصيب مختلف الفواكه (Janisiewicz و Yourman، 1991). وهي كائنات مختلفة التصنيف، تضم إلى مجاميع مختلفة تشمل بكتيريا غرام موجب وغرام سالب و خمائر وفطريات خيطية، والتي تطبق آليات تأثير مختلفة وتملك مجال محصور الفعالية، فبعضها يكون فعالا ضد بعض الممرضات وعلى العديد من المواد والبعض الآخر أقل تخصصا (Janisiewicz، 1994). وقد تم عزل البعض من هذه العوامل مثل بكتيريا *Pseudomonas spp.* من على أوراق وبراعم وثمار أشجار التفاح، على مستوى الحقل والثمار المخزنة، والتي استعملت في مكافحة العفن الأزرق *Penicillicum expansum* والعفن الرمادي *Botorytis cinerea* (Janisiewicz و Roitman، 1988) وبكتيريا *P.fluorescens* المعزولة من أوراق و أزهار وفاكهة الفراولة (Swadling و Jeffries، 1996)، بينما بكتيريا *Bacillus pumillus* فقد عزلت من جذور نبات القمح (Milus و Rothrock، 1997). أما الخمائر فقد عزلت خميرتي *Pichia guilliermondii* و*Debaryomyces hansenii* من سطح فاكهة الليمون. (Chalutz وWilson،1990). بينما خميرة *Candida oleophila* فقد تم عزلها من على سطح ثمار الطماطم. (Wisniewski و آخرون، 1995) وعلى مستوى جروح فاكهة التفاح عند درجتي حرارة 4 و 18°م، حيث تساهم في حماية ثمار التفاح من عفن *Botrytis cinerea* بعد 23 إلى 30 يوم من تخزينها (Mercier و Wilson، 1994). و من بين الخصائص الواجب توفرها في العامل المقاوم، للحصول على مكافحة بيولوجية جيدة ما يلي:

- الفعالية عند التراكيز المنخفضة.
- الثبات الوراثي.

- الفعالية ضد عدد كبير من المسببات المرضية.
- سهولة النمو على وسط بسيط.
- سهولة بقاءها لفترة طويلة.
- عدم إنتاج مستقلبات مضرة بصحة المستهلك.
- مقاومة المبيدات الحشرية.
- الانسجام مع المعاملات التجارية السارية.
- عدم التطفل على النبات العائل.(Sharma و آخرون، 2013 و Arras، 1993).

كما يتأثر التصادم الحادث بين العامل المقاوم والممرض بالمرحلة التي يوجد فيها هذا الأخير، لذا فاختيار العامل المقاوم يكون حسب المرحلة التي يوجد فيها العامل الممرض (Zamir، 1997) (جدول 2).

جدول (2): بعض العوامل المقاومة و المرحلة التي يتأثر فيها العامل الممرض (Zamir، 1997).

العوامل البيولوجية المقاومة	المرحلة التي يتأثر فيها استمرار نمو الفطر الممرض
Conithrium minitans *Gliocladium virens* *Sporidesmium sclerotivorum* *Ta laromyces flavus* *Trichoderma spp.*	مرحلة التكاثر
C. minitans *G. virens* *S. sclerotivorum* *T. flavus* *Trichoderma spp.*	الإنبات و العدوى
Epicoccum purpurascens *Rhizoctonia* *Trichoderma harzianum*	التموقع على مستوى الأنسجة
Ampelomyces quisqualis *Tilletriopsis spp.* *Sporothrix flocculosa*	النمو و التبوغ

4-2- إستعمال البكتيريا في المكافحة البيولوجية

للبكتيريا دور هام في مجال المكافحة البيولوجية، لكونها فعالة في مكافحة أمراض النبات والمحاصيل الزراعية وتكمن أهميتها في إنتاجها للمضادات الحيوية وقدرتها التنافسية على الغذاء و المكان إضافة إلى سهولة تأقلمها ونموها (Zamir، 1997). وقد حضيت بكتيريا غرام موجبة باهتمام خاص مقارنة مع غرام سالب حيث استعملت عدة أجناس بكتيرية في هذا المجال أهمها: *Pseudomonas* و *Bacillus* و *Enterobater* الممثل في النوع *E. coloacae* في مكافحة أمراض نباتية مختلفة أهمها: أمراض سقوط البادرات (damping-off) المتسببة عن الفطريات *Pythium spp.* و *R. solani* و *Sclerothium rolfsii*، والتعفن الجذري المتسبب عن Aphanomyces euteiches و *Fusarium oxysporum* و *Thielaviopsis basicola*. وقد كان من السهل تنميتها وتطبيقها سواء كانت المعالجة بالمسح أو رش التربة والبذور، مما أدى إلى خفض شدة المرض أو زيادة نمو النبات. وقد طبقت على البصل والطماطم والكرافس والخيار، في الحقل وداخل البيوت البلاستيكية، مما أدى إلى إرتفاع المردود بنسبة 18%. (Zamir، 1997).

يضم جنس *Pseudomonas* أنواعا كثيرة تدخل في مجال المكافحة، وهي قادرة على استعمال مكونات التربة كمصدر للنتروجين والطاقة والكاربوهيدرات، كما تستطيع تحويل nitrate إلى nitrite. فقد استعمل النوع *P. cepacia* المعزول من أوراق التفاح في مراقبة ثمار التفاح والإجاص وحمايتها من الإصابة بالعفن الرمادي المتسبب عن *Botrytis cinerea* والعفن الأزرق *Penicillium expansum*، وهذا من خلال إفرازها لمادة Pyrrolnitrin ذات النشاط التثبيطي القوي على نمو الفطرين عند التركيز 10 ملغ/ل (Rosales و آخرون، 1995). و كذلك المضاد الحيوي Altericidin الذي يقوم بتثبيط نمو الفطر *Alternaria kikuchaiana* عند التركيز 8 ملغ/ل (Janisiewicz و Marchi، 1992).

كما استعملت *P. cepacia* في مراقبة فطر *Biopolaris maydis* على أوراق الذرة و فطر *Fusarium oxysporum* على نبات البصل، وفي خفض مرض التقرح الذي يسببه فطر *Colletotrichum bagenarium* في الخيار، ومرض الحنطة لدى الطماطم المتسبب عن *Alternaria solani* (Koomenو Jeffries، 1993). في حين تمكنت بكتيريا *P. putida* في خفض نسبة التعفن الطري بنسبة 15% عند معاملة بذور نبات الطماطم قبل زرعها بالمعلق البكتيري وهذا من خلال إنتاجها للمضاد الحيوي Pseudobacin، الذي يخفض من إستقلاب الغلوكوز بدرجة كبيرة لدى الفطر الممرض. (Janisiewicz، 1996).

و قد كشف Janisiewicz و Marchi (1992) فعالية النوع *P .syringae* في مراقبة فطري *B. cinerea* *P.expansum* المسبب لتعفنات الإجاص والتفاح (Janisiewicz، 2001) وتوصل إلى أن تركيز 5.4×10^{8} CFU / ملل تثبط نمـــو 10^{4} بوغ / ملل لكلا الفطـــرين. وقد تم تسويق هذه البكـــتيريا تجاريا تحت إسم 100- Biosave و110-Biosave لمعالجة الفـواكـــه التجـــارية ضد مختلف الأعفـــان التي تصيبها (El- Ghaouth وآخرون، 2000). أما النوع *P. fluorescens* فقد استعمل في تثبيط نمو وإنتاش أبواغ فطر *Colletotrichum glocospoides* على وسط مستخلص الشعير، بنسبة تصـل إلى أعلى من 20%. (Koomenو Jeffries، 1993). وحسنت من نمو نبات القمح وزادت من إنتاجه من خلال إنتاجها لمستقلبات خارج خلوية مضادة تتمثل في 2.4 - Phloroglucinol diacetyl ومضادات حيوية أخرى منها Pyoluteorin (Swadling و Jeffries، 1998؛ Schniderو آخرون، 2000). بينما استعملت بكتيريا *Enterobacter cloacae* في حماية فاكـهة الخوخ من فطـر *R.solani* عن طريق إختراق هيفاته وتحليلها في الوسط. (Koomen ، 1997).

4-2-1- استعمال الجنس *Bacillus* في المكافحة البيولوجية

من بين الأجناس البكتيرية المستعملة في مجال المكافحة البيولوجية، جنس *Bacillus*، خاصة النوع *B. subtilis* الذي أستعمل في مقاومة فطر *Monilinia fructicola* ، المسبب للتعفن البني الذي يصيب الفواكه وبعض فطريات الصدأ مثل *Uromyces phaseoli* (Gregory و آخرون، 1994) ، خاصة وأن هذه البكتيريا يمكنها الإستقرار في التربة على شكل أبواغ، مما يجعلها سهلة الإستعمال و التطبيق. كما وجد أن جميع المعالجات التي تمت سواء بإستعمال المعلق الخلوي أو المستخلص البكتيري، كانت كلها ناجحة في مكافـــحة الأمراض (Asaka و Shoda، 1996). كما أن معاملة ثمار الخوخ والمشمش بعد الجني بمعلق بكتيريا *B. subtilis* يؤدي إلى حمايتها من الإصابة بالعفن البني ويقلل إصابة ندب أوراق التفاح بالفطر *Nactria galligena* (الزميتي، 1997).

إضافة إلى منع تطور الفطريـات الممرضـــة *Rhizoctonia solani* و *Fusarium spp.* و *Alternaria oradicina* و مسببات التعفن لدى الحبوب (Dolej و Bochow، 1996). إضافة إلى إفرازها لبعض المستقلبات الأخرى مثل البيبتيدات الدهنية و Plipastantin و Fungymycin ذات النشاطية العالية ضد ممرضات النبات وللمضاد الحيوي Iturin A (Koomen، 1997). أما النوع *B. cereus* فيمتاز بآلية أخرى في المكافحة البيولوجية من حيث إنتاجه للمضادات الحيوية مثل:Zwittermicin A (بيبتيد) و Kanosamine (سكر أميني). وتستعمل هذه البكتيريا في مكافحة الأمراض التي تسببها الفطريات البيضية (*Oomycetes*) بصفة خاصة ، وفي حماية نبات البرسيم من الذبول المتسبب عن فطر *Rhytophtora medicaginis* ، ونبات التبغ من فطر *P. nicotianae* إضافة إلى الفول السوداني من فطر *Sclerotinia minor*. كما تسبب تغيرات عميقة على الفلورا البكتيرية الموجودة على مستوى جذور فول الصويا.

أما *B. pumilus* فكان تثبيطها لنمو فطر *B. cinerea* عن طريق رفع درجة الأس الهيدروجيني لوسط النمو من 6 إلى 8–8.5،إضافة إلى إنتاجها لعوامل مضادة للفطريات ومستقلبات سمية لها تأثيرات قاتلة على بعض الأنواع الفطرية أثناء الإنتاش البوغي (Swadling و Jeffries، 1998).

4-2-2- آليات المكافحة البيولوجية لدى جنس *Bacillus*

تكمن فعالية الجنس *Bacillus* في خفض المرض و تحسين نمو النبات، لاستعماله آليات تأثير مختلفة، منها إنتاجه للعديد من المستقلبات الحيوية والنشطة، كالمضادات الحيوية والإنزيمات المحللة إضافة إلى الإنجذاب الكيميائي والتنافس على الغذاء، الذي يعرقل دخول العامل الممرض ويزيد من نمو ونشاط البكتيريا الجذرية ويحافظ على كثافتها البيولوجية المناسبة، مما يزيد من نشاطيتها ضد الأمراض. (Zamir، 1997). كما تمتاز البكتيريا التابعة لهذا الجنس بقدرتها على تكوين أبواغ ذات مقاومة عالية وثابتة تمكنها من العيش لمرحلة أطول عند تطبيقها في الحقل أين تكون الظروف البيئية متغيرة. (Silo - Suh و آخرون، 1994).

أ- إنتاج المضادات الحيوية

تنتشر ظاهرة إنتاج المضادات الحيوية في الطبيعة وهي تلعب دورا كبيرا في وقاية مختلف المنتوجات من الأمراض التي تصيبها، فهي إحدى آليات المكافحة البيولوجية المهمة التي تستعملها الكائنات المضادة في حماية النبات من المسببات المرضية.(Wilson و آخرون، 1991). تنتج الفطريات حوالي 1600 نوع مثل penicilline في حين تنتج *Actinomycetes* حوالي 3000 نوع مثل Tetracycline، الذي تنتجه *Streptomyces* (Botton و آخرون، 1990). بينما تنتج البكتيريا حوالي 500 نوع من بينها أنواع *Bacillus* التي تنتج حوالي 66 مضادا حيويا مختلفا أغلبها عبارة عن متعدد البيبتيدات.

ينتج النوع *Bacillus megaterium* المضاد الحيوي Baciméthrine، الذي يظهر خاصية التضاد داخل الكائن الحي (Asselineau و Zalta، 1973). بينما تنتج الأنواع الأخرى مضادات حيوية مختلفة، ثبت دورها الفعال في مقاومة بعض الامراض النباتية.جدول رقم (3).

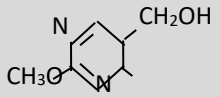
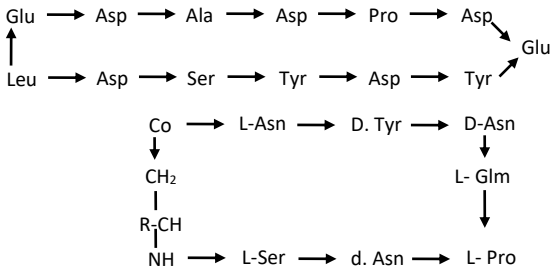
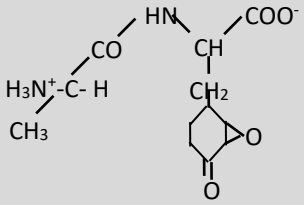
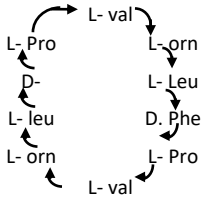
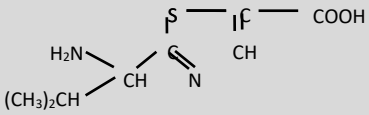
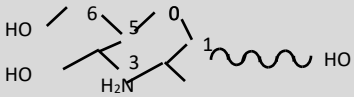
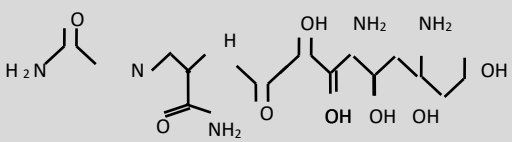
ويكون تأثير المضادات الحيوية على تركيب البروتين مباشرة، حيث تؤثر على مراكز تكوينه وهي الريبوزومات.وتؤدي إلى عرقلة قراءة الشفرة الوراثية وتحريفها، مما يمنع تثبيت الحمض النووي ARNt بـ ARNm، فينتج أحماض آمينية إضافية غير مناسبة في البروتين المصنع، الذي يعطي بروتين مشوه لا يواكب الوظائف الحيوية للكائن الدقيق. كما تؤثر أيضا على تضاعف الاحماض النووية عن طريق تشكيل جسور بين سلسلتي ADN ، مانعة بذلك هجرتها عند الإنقسام الخلوي. (Leclerc و Mossel، 1989).

ب- الإنجذاب الكيميائي

أظهرت الكائنات الحية الدقيقة آلية أخرى في المكافحة البيولوجية، تتمثل في الإنجذاب الكيميائي (Chemotactic)، الذي يسمح للبكتيريا المتحركة نحو المواد العضوية المفرزة من طرف البذور والجذور النباتية بالتموضع حولها وحمايتها من مسببات المرض التي تصيبها. ومن أهم البكتيريا التي درست في هذا النطاق سلالة *B. megaterium* B 153-2-2 المقاومة طبيعيا لـ Rifampicin والمتمركزة حول بذور نبات فول الصويا، وتتسبب في حمايتها من الممرضات التي تصيبها. كما تبدي هذه البكتيريا تجاوبا هاما مع مفرزات البذرة المتمثلة في الأحماض الآمينية والأحماض العضوية والسكريات.وقد وجد أن هذه السلالة تنجذب نحو البذور أكثر منها نحو مفرزات الجذور، كون البذور تحتوي على كميات مهمة من الأحماض الآمينية و malat، إضافة إلى بعض الاحماض العطرية والفلافونيدات ويحدث هذا الإنجذاب في مجال من pH يتراوح بين 6 و 7 و درجة حرارة مثلى

جدول (3): بعض المضادات الحيوية المنتجة من طرف أنواع الجنس *Bacillus*

(Assilineau و Zalta ، 1973؛ Asaka و Shoda ، 1996؛ Silo–Suh و آخرون، 1998).

البكتيريا	المضاد الحيوي	الصيغة الكيميائية
B. megaterium	Bacimithrine	
B. subtilis	Mycobaciline	
	Iturin A	
	Surfactin	
B. subtilis و *B. pumilus*	Bacilycine	
B. brevis	Gramicidines	
B. pumilus	Micrococcinep	
B. lechenmifornii. Var *mesentericus*	Proticine	$C_{31}H_{44}O_7$
B. cereus	Kanosamine	
	Zwittermicin A	

من 25° م – 30° م. ويتطلب 0.03 ملغ /ملل من تركيز مفرزات الجذور والبذور لبدأ إنجـذاب كيميائي هـــام وهو تركيز منخفض بالمقارنة مع *Pseudomonos fluorescens* و *P. putida* اللذان يتطلبان تركيز 0.5 ملغ /ملل (Zheng و Sinclair ، 1996_b). ومن أهم المستقبلات الكيميائية لسلالـــة B 153-2-2، مستقبل Serine وAspartate. و قد أثبتت دراسة Zheng و Sinclair (1996) أن الخلايا الأصلية لـ B 153-2-2 تكون متحركة وتنجذب كيميائيا في المرحلة اللوغاريتمية، ولكنها تتوقف عن الحركة والتبوغ في مرحلة الثبات، أين يبدأ إنتاج المضادات الحيوية، وأظهرت متغيرات هذه السلالة التي تملك إنجذاب كيميائي مرتفع قدرة على الحركة، وهذه القدرات في الإنجذاب والحركة ينتج عنها التبوغ والمنافسة ضد فطر *R.solani*.

جـ- إنتاج الإنزيمات المحللة

تفرز الكائنات الحية الدقيقة المختلفة إنزيمات خلوية محللة تستعملها كآليات مقاومة ضد الكائنات الحية الحساسة لها. حيث تتعرض الفطريات الممرضة إلى تحلل إنزيمي يمس خاصة جدارها الخلوي المتكون أساسا من الكتين، كفطر *R.solani* المقاوم من طرف *B.megaterium* المفرزة لإنزيمات Endochitinase، إضافة إلى كميات كبيرة نسبيا من DNase و Endoproteinase و Phospholipase وإنزيمات خارج خلوية نشطة مثل Lipase و Glucanase و Protease (Bertagnolli و آخرون، 1996).

4-3- استعمال الخمائر في المكافحة البيولوجية

4-3-1- تعريف الخمائر

الخمائر فطريات حقيقية النواة، وحيدة الخلية بمعنى أن جسم الفطر عبارة عن خلية واحدة عكس الأعفان التي يتكون جسمها من ميسليوم، مما يجعل نسبة السطح كبيرة، وبالتالي يسمح لها بنشاط حيوي أعلى عمّا لو كانت في صورة ميسليوم. (عمرو عبد الرحمان، 2001).

عزلت الخمائر من بيئات مختلفة كالماء والهواء والتربة، وبالرغم من أنها ملوثة للأغذية إلا أنها لا تشكل خطرا على الصحة العمومية باستثناء البعض منها كالنوعين : *Candida. albicans* و *Cryptococcus neoformans*، بالإضافة إلى ذلك فهي تدخل في عدة صناعات غذائية وبيوتكنولوجية مثل خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae*. (Begum و Parveen ، 2010).

4-3-2- الصفات العامة للخمائر

تكون مستعمرات معظم الخمائر حديثة العمر والنامية على البيئات الصلبة ذات قوام لزج ولون أبيض أو كريمي أو ملونة، وبزيادة العمر تتغير فتصبح جافة أو مجعدة، تأخذ خلايا الخمائر أشكالا متعددة أهمها: الكروي والبيضوي والمستطيل، إضافة إلى الشكل الكمثري وشكل الليمون، يتراوح حجمها ما بين 5-8 ميكرون وعادة ما تكون الخلايا منفردة أو مزدوجة أو تكون تراكيب متعددة الخلايا مثل سلاسل، فتسمى بهيفات كاذبة (Pseudohyphes) . (عمرو عبد الرحمان، 2001 و عبير هاشم، 2015).

تتكاثر جميع الخمائر لاجنسيا، والذي يتم عادة عن طريق التبرعم (Budding) كما تتكاثر جنسيا عندما تكون الظروف البيئية غير ملائمة، فتتوقف الخميرة عن التكاثر اللاجنسي ويصبح تكاثرها جنسي، ويقتصر هذا النوع من التكاثر على بعض الخمائر. (Larpent ، 1997)

4-3-3- الخمائر كعوامل مكافحة بيولوجية

تطورت طرق المكافحة البيولوجية ضد نمو الفطريات الممرضة باستعمال الكائنات الحية الدقيقة المثبطة لنموها في العديد من البلدان في العالم، كالولايات المتحدة الأمريكية وانجلترا، لمعالجة الأمراض التي تصيب محاصيل الخضر والفواكه بعد جنيها، وتعتبر الخمائر من أهم الكائنات المستعملة في المكافحة لقدرتها على النمو السريع والتأقلم مع المحيط، فبإمكانها أن تبقى نشطة لمدة طويلة تحت ظروف بيئية متغيرة من الاس الهيدروجيني والنشاط المائي وكمية محدودة من الغذاء، إضافة إلى قدرتها على الحد من نمو الفطريات الممرضة باستعمال عدّة آليات للمكافحة. (Pimenta وآخرون، 2008، Medina-Cordova وآخرون، 2016، Hermandez-Mentiel وآخرون، 2012). وقد استعملت الخمائر في هذا المجال لتحسين المنتوج الزراعي، والجدول رقم (4) يبيّن أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية، خاصة ضد أمراض ما بعد الجني للعديد من الفواكه.وعلى العموم فإن اغلب الخمائر المستعملة في المكافحة تم عزلها من الأجزاء الهوائية للنباتات كالأوراق والإزهار والثمار، إضافة إلى الجذور وكذلك التربة والماء. (Montiel-Hernandez وآخرون، 2010) والجدول رقم (5) يوضح أهم الخمائر المضادة والمصادر المختلفة التي عزلت منها.

وانحصر استعمال الخمائر في مكافحة العديد من الأمراض خاصة تلك المتعلقة بمحاصيل الخضر والفواكه بعد الجني، مقارنة مع تطبيقها أثناء التخزين. واستعملت العديد من أنواع الخمائر كعوامل مكافحة فعالة ضد العديد من الأمراض، كمكافحة فطر *Botrytis cinerea* بخميرة *C. aleophila* المسبب للعفن الأخضر على فاكهة التفاح، واستعمال خميرة *C. sake* ضد فطر *P. expansum* على التفاح والاجاص. (Ziedan و Farrag، 2011).

جدول (4) : أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية (Talibi وآخرون، 2014)

الخمائر المضادة	العامل الممرض	آلية التفاعـــــل
Pichia guilliermondi	*Botrys cinera* *Penicillium expansum* *P. italicum*	– التنافس على الغذاء والمكان. – التطفل
P.anomala	*P. digitatum*	– تحريض المقاومة لدى النبات. - التنافس على الغذاء والمكان.
Debaryomyces hansenii	*P. digitatum*	– التنافس – التطفل – تحريض المقاومة لدى النبات.
Canida famata *C.guilliermondi* *C.aleophila* *C.sake*	*P. digitatum*	– التنافس على الغذاء والمكان
Rodotorule glutins	*P.expansum* *B.cinera*	– المنافسة على الغذاء والمكان
Cryptococcus laurentié	*P.italicum*	– المنافسة على الغذاء والمكان
Kloeckera apiculata	*P.italicum*	– المنافسة على الغذاء والمكان
Wickerhamomyces anomalus	*P. digitatum*	– المنافسة على الغذاء والمكان - إنتاج مضادات حيوية

جدول (5) : مصادر أهم الخمائر المستعملة في المكافحة البيولوجية (Liu وآخرون، 2013)

المصدر	الخمائر المضادة
سطح الفواكه والطماطم	*Candina oleophila* *Metschnikouria fructicola*
الليمون	*Pichia guilliermondii*
البرتقال	*C. saitoana*
التفاح	*C. ciferrii (283)* *C. sake (CPA-1)* *Cryptococcus laurentii* *Rhodotorula glutinis*
الخوخ	*P.membranaefaciens*
أوراق الطماطم	*R. glutinis Y-44*
جذور الليمون	*Kloeckora apiculata 34-9*
التربة	*Leucosporidium scotti (A+17)*
ماء البحر	*Rhodosporidium paludigenium* *Debaryomyces hansenii*

وكذلك تطبيق خميرة *Ampelomyces quisqualis* في مكافحة العفن الحبيبي الذي يصيب الطماطم والمتسبب عن فطر *B.cinerea* (Zamir، 1997). واستطاعت خميرة *S. schoenu* خفض حدّة المرض على البرتقال بنسبة 86.8 % ضد فطر P.digitatum وهذا عند تركيز 10^8 خ/ملل.

أما خميرة *D. hansenii* فطبقت هي الأخرى في مكافحة العديد من الفطريات الممرضة كفطـــــر *P. italicum* على ثمار البرتقال المخزنة، حيث خفضت نسبة الإصابة بالفطر إلى 80 % ، وهذا بعد أسبوعين من التخزين. (Hernandez – Montiel وآخرون، 2010). أما Medina-cordova وآخرون (2016) فتوصل إلى إثبات قدرة *D. hansenii* عزلة (BCS 003) في مكافحة أربعة فطريات ملوثة لحبوب الذرة والمتمثلة في: *Fusarium proliferatum* ، *Aspergillus sp* ، *Mucor aranelloides* و *F. subglutimans* ، حيث استطاعت خفض النمو الفطري للميسيليوم مخبريا بنسب تراوحت بين 98.3 – 97.2 % وهذا عند اختبارها على الوسط الصلب. وبالنسبة للخمائر التابعة لجنس Pichia، أعطت نتائج جيدة في مكافحة الفطريات الممرضة، كالنوعين *P. anomala* و *P. membranifaciens* ضد فطر *B. cinera* وهذا على جروح ثمار التفاح إضافة إلى فطري *Rhizoctonia solani* ، *Ophiostosna ulmi*. (Santos و آخرون، 2004) وخميرة *P. albicans* ضد مرض البياض الدقيقي (Powdery midew) المتسبب عن *Cercospora beticola* الممرض لقصب السكر بمصر (Zeidan و Farrag، 2011) أما خميرة *Cryptococcus laurentii* فأثبتت فعاليتها في مكافحة فطري *P.digitatum* و *P. expansum* على جروح فاكهة البرتقال حيث خفضت نسبة الاصابة بـ 80- 90 % على درجة حرارة 7°م لمدة 30 يوم من التخزين. (Xiao-Dong Zheng وآخرون، 2003 و Mekbib وآخرون، 2011).

4-3-4- آليات المكافحة البيولوجية لدى الخمائر

أثبتت العديد من الدراسات الأدوار الفعالة التي تقوم بها الخمائر المضادة في مكافحه مسببات المرض المختلفة وهذا بالاعتماد على عدة آليات مكافحة تستطيع من خلالها الحد من شده المرض، من أهم هذه الآليات المطبقة نجد التنافس على الغذاء و المكان إنتاج الإنزيمات المحللة ،التطفل و إنتاج السموم القاتلة.

أ- التنافس على الغذاء والمكان

تعتمد الكائنات الحية الدقيقة على هذه الآلية في المكافحة من أجل المنافسة على المواد الغذائية خاصة إذا وجدت بكميات محدودة، فحسب Janiseiwiz (1994)، يعد التنافس على الغذاء أكثر أهمية من التنافس على المكان خاصة على مصدر الكربون العضوي الذي يعد عاملا مهما لنشاط الكائنات الحية. (Nunes وآخرون، 2009).

وبينت العديد من الأبحاث ظاهرة التنافس بين الخمائر والفطريات على مستوى موضع الإصابة ، خاصة خلال 24 ساعة الأولى ، فخميرة *D. hansenii* تنافس العديد من الممرضات الفطرية خاصة على مستوى موضع الإصابة في الفواكه، كما هو الحال في التفاح ضد فطر *P. digitatum*. (Parveen وآخرون، 2016) وخميرتي *P. guilliermondii* و *P. aleophila* ضد فطر *B. cinerea*. (Mercier و Wilson ، 1994 و Spadaro و Droby، 2015).

ب-إنتاج الإنزيمات المحللة

تنتج العديد من الخمائر المضادة مجموعة من الإنزيمات، ثبتت فعالتها في الحد من نشاطية العوامل الممرضة أهمها إنزيمات chitinase ، Cellulase ، Lipase ، Glucanase المفرزة من طرف خمائر *Pichia anomala*،

D.hansenii، *Rhodotorula glutinis* وغيرها. حيث تعمل هذه الإنزيمات على تحليل الجدار الخلوي للفطريات بدرجة أكبر. (Liu وآخرون، 2013).

جـ- التطفل

يعد التطفل لدى الخمائر من آليات المكافحة البيولوجية ضد الفطريات، فحسب Wisniewski وآخرون (1991) فإن التطفل يحدث عن طريق ارتباط الخميرة مع هيفا الفطر الممرض بواسطة مستقبلات موجودة على سطح الخلايا، شخصت على أنها carbo hydrate biding protein واثبت ذلك عن طريق ارتباط خميرة D. hansenii على هيفا الفطر *B.cinerea* في التفاح.

د- إنتاج السموم القاتلة (killer toxin)

السموم القاتلة عبارة عن بروتينات أو غليكوبروتينات ذات وزن جزيئي منخفض (10-30 كيلو دالتون) اكتشفت لأول مرة من طرف Makower و Bevan عام 1963 لدى خميرة *S. cerevisiae* المفرزة لسموم K_1، K_2، K_3 و K_{28} ضد عدد من العزلات التابعة لنفس النوع. (Benjara ، 2014). حاليا سجلت نشاطية هذه السموم لدى أكثر من 100 نوع تابعة لـ 20 جنس من الخمائر البازيدية والاسكية مثل : *Candida*، *Cryptococcus*، *Debaryomyces*، Kluyveromyces، *Pichia*، *Rhodotorula* وغيرها. (Marquina و آخرون، 2002 و Wojicik و Kordowska، 2015 و Banjara وآخرون، 2016).

يمر التأثير البيولوجي لهذه الخمائر بمرحلتين ، تتمثل المرحلة الاولى في تثبيت السم على الجدار الخلوي للخلايا المستهدفة عن طريق مستقبلات خاصة بكل سم عبارة عن B(1.6) glucane ، monoprotein و residus de chitine. (Santos وآخرون، 2004). تتبع بعد ذلك بارتباط السم مع الغشاء الخلوي محدثة تغير كبير في وظيفته عن طريق تشكيل قنوات عبره ، تتسبب في تسرب أيونات البوتاسيوم (K^+) و ATP ، إضافة إلى

تثبيط إنتاج بعض البروتينات والأحماض النووية، وفي النهاية ينخفض P_H مما يتسبب في موت الخلايا بعد 2-3 ساعات من التماس مع السم.

وتمتاز الخمائر التابعة لجنس *Pichia* بقدرة عالية في إنتاج السموم القاتلة على غرار خميرة *P membranifaciens*. التي ثبت انتاجها لسم قاتل ذو وزن جزيئي 18 كيلو داتون، له تأثير فعال على العديد من الخمائر والفطريات ويكون نشط على درجة حرارة 20°م و P_H = 4,8. (Santos وآخرون، 2004).

أما *P. anomala* فثبت إنتاجها للسموم القاتلة ضد 19 نوع مرضي يضم 10 أجناس تابعة لخمائر Candida، *Clavispora*، *Cryptococcus*، *Filobasidiella*، *Issatchenkia*، *Kluyvermocyes*، Pichia، *Saccharomyces* ، *Stephanoascus* و *Trichosporon* وهذا عند درجة حرارة 37°م.(Buzzini و Martini، 2001).

الفصل الثاني
المواد والطرق

المواد و الطرق

1- جلب العينات

جلبت 06 عينات من الغذاء الموجه لتغذية الدواجن من المجمع الشرقي للدواجن - وحدة أغذية الأنعام- بمدينة العلمة ،شرق ولاية سطيف ، خلال شهر أفريل سنة 2005 وتتعلق بنوعين من الغذاء :

- الغذاء الموجه لدجاج الاستهلاك.
- الغذاء الموجه لدجاج البياض.

العينة (1): غذاء موجه لدجاج الاستهلاك في مرحلة النمو.

العينة (2): غذاء موجه لدجاج الاستهلاك في أوائل مرحلة التربية.

العينة (3): غذاء موجه لدجاج الاستهلاك في نهاية مرحلة التربية.

العينة (4): غذاء موجه لدجاج البياض.

العينة (5): غذاء موجه لدجاج البياض المنتج.

العينة (6): غذاء موجه لفرخه بياضه من 8 إلى 18 أسبوع.(ملحق 1)

1-1 ظروف التخزين

أخذت العينات من صوامع التخزين المحمية من أشعة الشمس و الأمطار، أين نسبة الرطوبة المسموح بها في المواد المنتهية لا تفوت 13 %، أما درجة الحرارة فهي تخضع لدرجة الحرارة الفصلية (الصوامع موجودة في الخلاء) و مدة التخزين لاتفوت 6 أشهر في أحسن الأحوال. تم قياس نسبة الرطوبة و درجة الحرارة للعينات مباشرة بعد وصولها إلى المختبر، ثم حفظت داخل الثلاجة (4°م) لحين خضوعها للدراسة.

2- عزل و تشخيص الفطريات

2-1- العزل

خضعت العينات (6) لعزل الفطريات الملوثة ،بوضع 10 غ من كل عينة في حوجلة سعتها 500 ملل، مع إضافة 90 ملل من الماء البيبتوني المعقم 0.1 %(وزن/حجم) بعدها تترك الحوجلات في درجة حرارة المخبر لمدة 30 دقيقة ثم ترج جيدا في جهاز الرج، لتجرى تخافيف عشارية حتى 10^{-4} ليتم مسح 0.1 ملل من كل تخفيف على وسط Potato Dextrose Agar (PDA) .

تحضن الأطباق على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام بثلاث مكررات لكل تخفيف.

يتم تقدير عدد الفطريات المتواجدة ، بحساب عدد المستعمرات النامية بكل تخفيف ثم تجرى عملية الزرع المتكرر على الأطباق لتنقية العزلات النامية.

2-2- تشخيص الفطريات المعزولة

2-2-1- تحديد الأجناس

تم التعرف على الأجناس الفطرية المعزولة بالاعتماد على المميزات المظهرية للمستعمرة و الفحص المجهري انطلاقا من مفاتيح تصنيف الفطريات لكل من Botton و آخرون (1990) و Pitt و آخرون (1983).

*المميزات المظهرية :

- لون المستعمرة الفطرية و خلفيتها و تغير اللون.
- معدل نمو المستعمرة: سريع، معتدل، بطيء، أو بطيء جدا.
- التركيب السطحي للمستعمرة: مستوي،مجعد،ملتوي،ناعم،متين أو مرن....

- الرائحة: كريهة، عطرية أو تفتقد لميزة الرائحة.
- إفراز قطرات سائلة و بالتالي تكون المستعمرة هوائية النمو.

* المميزات المجهرية :

- ميزة الخيط الفطري (الهيفا) المغمور في الوسط : وجود اللون أو غيابه، مقسم أو غير مقسم و مميزاته الشكلية.
- الأبواغ : لونها، حجمها و شكلها المظهري.
- وجود الأجسام الحجرية أو عدم وجودها.

2-2-2- تحديد الأنواع

تم تحديد أنواع *Aspergillus* و *Penicillium* بالاعتماد على الأوساط الخاصة بالتشخيص وهي: GzapekYeast Agar (CYA) و Malt Extract Agar (MEA) و Glycérol Nitrate Agar (G25N) والتي تعتمد بالدرجة الأولى على تركيب الوسط ودرجة حرارة الحضن و هي : 5°م و25°م و37°م. (Pitt و آخرون 1983).

تمت معاينة المستعمرات النامية بعد 7 أيام من الحضن وذلك بمراعاة الصفات التالية:

- قطر المستعمرة.
- الصفات المظهرية.
- الصفات المجهرية.

أما المستعمرات الصغيرة التي نمت على درجة حرارة 5°م فتلاحظ مباشرة في الطبق باستعمال المكبرة في حين تفحص المستعمرات النامية على درجة 37°م بالعين المجردة فقط، من حيث لون و شكل المستعمرة.

3- الإختبار البيولوجي لعزلات *Aspergillus* و *Penicillium*

يهدف هذا الاختبار بالدرجة الأولى إلى الكشف الأولي عن قدرة عزلات فطري *Aspergillus* و*Penicillium* (8 عزلات تابعة للجنس *Aspergillus flavus* و 11 تابعة لفطر *Penicillium citrinum*) على إفراز مستقلبات ثانوية مثبطة لنمو البكتيريا المختبرة و هي : (ATCC25922) *Bacillus subtilus, E .coli*, *Pseudomonas sp.* (ATCC 27853), *Staphylococcus sp.* (ATCC 25932).

زرعت العزلات الفطرية على وسط PDA على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام في حين تم تنشيط البكتيريا المختبرة في المرق المغذي بحضنها لمدة 24 ساعة على 37°م. بعد ذلك ينشر 0.1 ملل من المعلق البكتيري على الوسط المغذي ثم تأخذ 3 أقراص بقطر 5 ملم من حواف مزرعة كل عزلة فطرية، وتوضع في 3 نقاط متباعدة عن بعضها البعض على هيئة مثلث متساوي الأضلاع وبمكررين لكل عزلة. تحضن الأطباق على درجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة.

بعد انتهاء فترة الحضن، يقاس قطر هالة التثبيط ويحدد التثبيط كما يلي:

تثبيط ضعيف إذا كان محصورا بين 8- 14 ملم.

تثبيط متوسط إذا كان محصورا بين 14- 20 ملم.

تثبيط عالي إذا كان أكبر من أو يساوي 20 ملم. (Mazza، 1983)

4- إختبار قدرة عزلة *A. flavus* على إنتاج السموم الفطرية

اختيرت عزلة (A 13) من فطر *A. flavus* التي ثبت تثبيطها للبكتيريا المستعملة في الاختبار البيولوجي والتي كان قطر تثبيطها للبكتيريا أكبر من 20 ملم وتم الكشف عن إنتاج السموم الفطرية بطريقتين هما:

- الكشف في الأوساط السائلة.
- الكشف في الوسط الصلب.

4-1- الكشف في الأوساط السائلة

تلقح 50 ملل من وسط Yeast Extract Sucrose (YES) الموجود في حوجلات سعتها 250 ملل بقرص فطري قطره 3 ملم من حواف مستعمرات عزلة *A. flavus* والمنماة على وسط PDA في درجة حرارة 28°م لمدة 12 يوم بمعدل 3 مكررات. (Davis وآخرون، 1966 و Masimango و آخرون، 1977).

-الإستخلاص

بعد انتهاء فترة الحضن، يرشح الوسط عبر ورق ترشيح (Wathman N° 1) ويضاف للرشاحة الموجودة في حوجلة سعتها 250 ملل ما يعادل حجمها (50 ملل) من بالكلوروفورم، يرج الخليط بعد ذلك جيدا لمدة 10 دقائق ،ثم يفرغ في حوجلة ترسيب ويترك حتى تنفصل المرحلتين.

تسترجع مرحلة المذيب (الموجودة في الأسفل) في حوجلة جديدة، في حين تخضع المرحلة المائية للاستخلاص مرة ثانية بنفس الطريقة. يمرر المستخلص عبر ورق Wathman N° 42 المحتوي على الكبريتات اللامائية (Na_2SO_4 anydryde) لإزالة الماء المتبقي، يركز بعدها المستخلص بواسطة جهاز التبخير الدوراني (Rota vapeur) على درجة حرارة 40°م، يسترجع بعدها ناتج التبخير في أنابيب مع الغسل الجيد لجدران كرة التبخير بالكلوروفورم (1ملل). تحفظ الأنابيب في الظلام على درجة حرارة 4°م لحين الاستعمال.(Davis وآخرون، 1987).

-الفصل بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (CCM)

يوضع حجم 20 ميكرولتر من ناتج التبخير على خط الانطلاق الوهمي في ألواح تم تنشيطها مسبقا على درجة حرارة 110°م لمدة 30 دقيقـــة، وعلى نفس الخـــط توضع 5 ميكرولتر من الســموم القياسية: أفلاتوكسين AFB_1 و AFB_2 وفق نظام المذيبات العضوية: Tuluene :Ethyl d acetate :Formique acid 1 :3 :6 (V/V/V) TFE

4-2-الكشف في الأوساط الصلبة

هي طريقة اقتصادية لدراسة السموم المفرزة من العزلات الفطرية المنتجة للسموم، حيث زرع *A. flavus* على وسط (YES) الصلب، وينمى على 28°م لمدة 7 أيام. بعدها يتم أخذ قرص فطري قطره 4 ملم من وسط المزرعة الفطرية، و توضع مباشرة على لوحة السيليس بعد أن يبلل بقطرة من خليط: كلوروفورم: ميثانول (2:1) ثم توضع مباشرة على لوحة السيليس مع الضغط بلطف حتى ينتشر السائل داخل السيليس بحيث لا يتجاوز قطر البقعة 0.6 سم، تترك البقعة لتجف ثم يتـم تحليلـــــها عبر نظـام المذيبات (T F E: 5/4/1) (ح/ح/ح) (Filtenberg وFrisvad ، 1983).

- **الكشف**

بعد تعيين البقع و مقارنتها من حيث اللون ومعامل الإنسياب R_f مع السموم القياسية، يستعمل الكاشف الكيميائي H_2SO_4 50 %، لرش الألواح ثم توضع بعد ذلك في الحاضنة على درجة حرارة 110°م لمدة 10 دقائق. (Scott و آخرون، 1972; Hadidane و آخرون،1985; Patterson، 1986) ، ثم تشاهـد في الضـــوء المـرئي وتحت الأشعة الفوق بنفسجية عند طول الموجة 365 نانو متر، وتدون جميع المعلومات عن معامل الإنسياب R_f

وعدد البقع و تغيراتها اللونية قبل وبعد المعاملة الكيميائية، وتقارن مع السموم القياسية المستخدمة والمعطيات المرجعية.

5- المكافحة البيولوجية لفطر *A. flavus*

5-1- المكافحة باستعمال بكتيريا *Bacillus megaterium*

5-1-1- عزلة البكتيريا المضادة

تم الحصول على بكتيريا *B. megaterium* المعزولة من التفاح في دراسة سابقة على مستوى مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية جامعة فرحات عباس سطيف -1- حيث تم تشخيصها بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية.

اختبرت بكتيريا *B. megaterium* في مدى قدرتها على تثبيط الفطر على الوسط الزراعي PDA، وذلك بتنميتها في المرق المغذي لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 28°م وزرعها مع الفطر ثم حضنها لمدة 7 أيام على درجة حرارة 28°م وفق طريقتين هما:

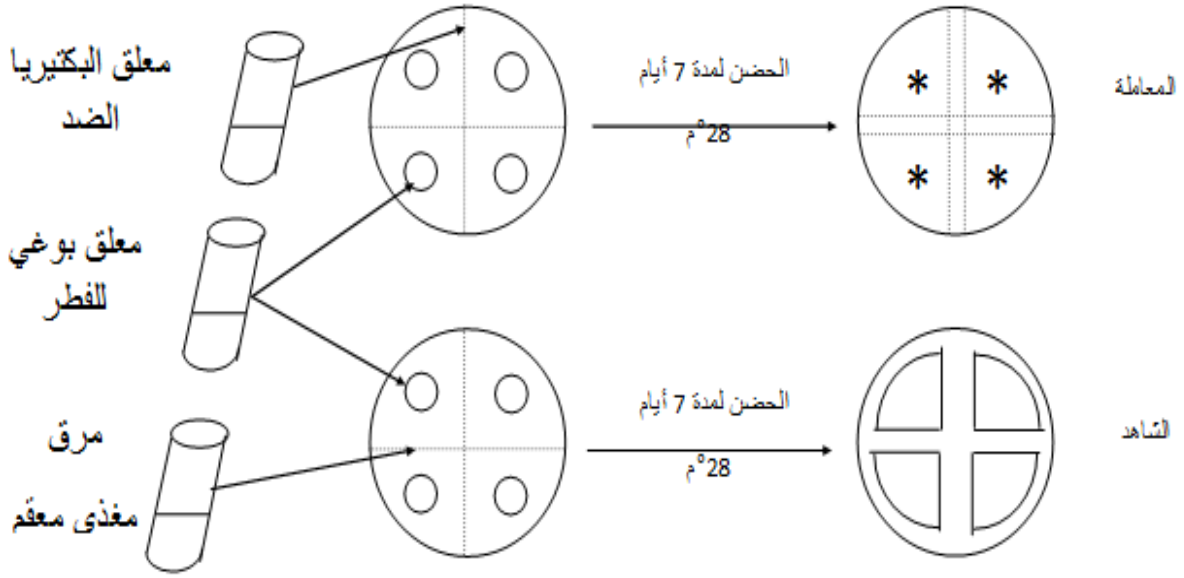
أ- طريقة Arras (1993)

زرع 20 µl من البكتيريا الضد على شكل خطين متقاطعين في أطباق بتري بعد ذلك حقنت الأطباق بـ20 µl من معلق بوغي لفطر *A.flavus* ذو تركيز 10^4 بوغ/ملل في أربع نقاط تبعد مسافة 3 سم عن كل ذراع من أذرع التقاطع البكتيرية و بمعدل 6 مكررات، و أعيدت التجربة 3 مرات. (شكل 2).

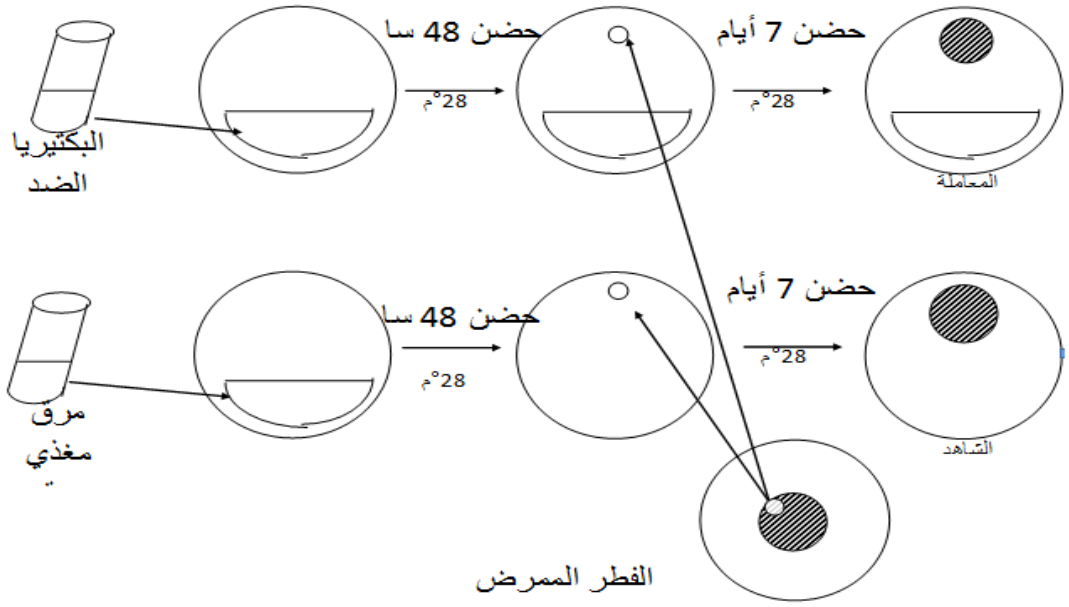
ب- طريقة Vincent و آخرون (1991)

تم في هذه الطريقة تخطيط نصف طبق بتري بـ20 µl من المعلق البكتيري (10^9 خلية/ ملل)، ثم تحضن لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 28°م، بعدها يتم زرع قرص فطري قطره 5 ملم مأخوذ من حافة مستعمرة الفطر *A.flavus*

عمرها 7 أيام في النصف الآخر من الطبق و على بعد 3 سم من المنطقة البكتيرية، تحضن الأطباق لمدة 7 أيام تحت درجة حرارة 28°م، وبمعدل 6 مكررات، أعيدت التجربة 3 مرات (شكل 3).



شكل 02 : تثبيط الفطر وفق طريقة Arras (1993).



شكل 03 : تثبيط الفطر وفق طريقة Vincent و آخرون (1991)

- **قياس درجة التثبيط**

قيست نسبة التثبيط في طريقتي Arras (1993) و Vincent و آخرون (1991) بعد 7 أيام، بقياس أبعاد المستعمرات الفطرية حسب العلاقة:

نسبة التثبيط = (ش – ت) X 100 /ش.

ش: معدل قطر الشاهد للمستعمرات غير الخاضعة للتثبيط.

ت: معدل قطر المستعمرات الفطرية الخاضعة للتثبيط .

5-1-2- إختبار تأثير الرشاحة البكتيرية على نمو الفطر بطريقة الوزن الجاف

اتبع في هذا الإختبار طريقة Krebs و آخرون (1998)، حيث نميت بكتيريا *B. megaterium* في المرق المغذي لمدة 5 أيام على درجة 28°م، ثم عرض المعلق البكتيري للطرد المركزي قصد التخلص من الخلايا البكتيرية، أخذ الجزء الطافي ورشح عبر ورق الترشيح (Thomaper Menbanfilter) قطر مساماته 0,2 ميكرون لنتحصل على مستخلص بكتيري خالي من الخلايا Cell Free Extracts (CFE)، يوز ع عبر 12 حوجلة زجاجية معمقة سعتها 100 ملل بمعدل 25 ملل لكل حوجلة، ثم تلقح كل حوجلة بقرص فطري قطره 5 ملم من حافة مستعمرة فطر *A.flavus* عمرها 7 أيام، واستعمل كشاهد الوسط السائل PDB (Potato Dextrose Broth)، حضنت جميع الحوجلات على درجة 28°م لمدة 9 أيام، ليتم قياس الوزن الجاف للميسليوم كل 72 سا لكل 3 مكررات.

5-1-3- تقدير آليات المكافحة البيولوجية لبكتيريا *B.megaterium*

بهدف الكشف عن آليات المكافحة الممكنة التي تستعملها *B. megaterium* ضد فطر *A. flavus*، أخضعت البكتيريا لبعض الاختبارات و المتمثلة في :

أ- إختبار إنتاج حمض سيانيد الهيدروجين (Hydrogen Cyanide)

تم زرع بكتيريا *B. megaterium* عمرها 24 سا على وسط TSA (Trypticase Soy Agar) مضاف إليه 4.4 غ/ل من glycine من جهة، ومن جهة أخرى يرش قرص من ورق ترشيح بمحلول 5% Acide picrique ثم يوضع على غطاء طبق بتري المحتوي على وسط TSA من الداخل، يغلق الطبق بعدها جيدا بغلاف البرافين ثم يحضن على درجة 28°م لمدة 5 أيام. تغير لون ورق الترشيح من الأصفر إلى البني الداكن دليل على إنتاج حمض HCN (Prashar وآخرون، 2013).

ب- إختبار إنتاج الأمونيا (NH_3)

يلقح 10 ملل من الوسط السائل للماء البيبتوني (Peptone Water) ب: 0.1 ملل من *B.megaterium* ثم يحضن على درجة 30°م لمدة 48- 72 سا، بعد مرور فترة الحضن، يضاف 0.5 ملل من كاشف Nessler. تغير لون الوسط إلى اللون الأصفرأو البني دليل على إنتاج NH_3 (Cappuccino، 2010).

جـ- اختبار إنتاج الإنزيمات المحللة

***إنتاج إنزيم Protease**

تم إجراء الإختبار على وسط Gelose Nutritive (GN) مضاف إليه 5 غ/ل من حليب منزوع الدسم، يلقح الوسط ب 5 ميكرولتر من *B.megaterium* عمرها 24 سا على شكل بقع متباعدة (spot)، ثم تحضن على 30°م لمدة 48 سا، ليسجل إنتاج إنزيم Protease بظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية (Prashar، 2013).

***إنتاج إنزيم Chitinase**

تم اختبار إنتاج إنزيم Chitinase من طرف *B. megaterium* بإتباع طريقة Renwich وآخرون (1991) حيث زرع 10µl من بكتيريا عمرها 24 سا على وسط إنتاج إنزيم Chitinase على شكل بقع متباعدة عن بعضها البعض ليتم حضنها على درجة 30°م لمدة 5 أيام. بعد مرور فترة الحضن يغمر الوسط بمحلول الليغول (Lugol) ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية دليل على إنتاج الإنزيم.

***إنتاج إنزيم Amylase**

اتبعت طريقة Amoozagar وآخرون (2003) لإجراء هذا الإختبار والذي تم على وسط GN مضاف إليه 1% من النشاء (وزن/حجم). زرع 10µl من البكتيريا على شكل بقع متباعدة، ثم حضنت على 30°م لمدة 5 أيام، بعد مرور فترة الحضن،تغمر الأطباق بمحلول Lugol ، ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية دليل على إنتاج إنزيم Amylase .

***إنتاج إنزيم Cellulase**

تم إجراء الإختبار على وسط إنتاج Cellulase بتلقيح الوسط ب 10µl من البكتيريا على شكل بقع متباعدة، ثم تحضن الأطباق على 30°م لمدة 5 أيام. بعد الحضن تغمر الأطباق بمحلول Lugol، ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات دليل على إنتاج البكتيريا للإنزيم المختبر.

5-2- المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *Pichia anomala*

5-2-1- عزل و تشخيص خميرة *P. anomala*

عزلت خميرة *P. anomala* من عينات غذاء الدواجن و تمت تنقيتها و تشخيصها بالاعتماد على الخصائص المظهرية والمجهرية و البيوكيميائية حيث أجريت دراسة صفات الخميرة على مرحلتين ، من الناحية المظهرية والمجهرية حسب كل من Pitt وHocking (1983). ومن الناحية البيوكيميائية باستخدام شريحة API bio.

شملت الدراسة المظهرية و المجهرية كلا من الصفات التالية :

- دراسة قدرة الخميرة على تشكيل الميسيليوم الحقيقي أو الكاذب، بتنميتها على وسط PDA، حيث زرعت الخميرة على شكل خطين متوازيين، ووضع في نهاية كل خط ساترة معقمة و حضنت لمدة 7 أيام على 25°م. بعدها تفحص العينات مجهريا تحت الساترة من حيث التبرعم و شكل الخلية و شكل الميسيليوم إذا كان حقيقي أو كاذب.

- دراسة الصفات المظهرية لمستعمرات الخميرة من حيث الشكل و اللون.

- دراسة قدرة الخميرة على تشكيل الأبواغ الجنسية، حيث زرعت الخميرة على وسط PDA في أنابيب مائلة و حضنت على 25°م و درست قدرة الخميرة على تشكل الأبواغ مجهريا بعد 3-7-14 و21 يوم من حيث العدد و الشكل ووجودها داخل الكيس الأسكي أو خارجه.

أما الصفات البيوكيميائية فأجريت حسب طريقة API bio التي تعتمد على قدرة الخميرة على استعمال مصادر مختلفة من الكاربون والنتروجين موزعة على شريحة API في حفر خاصة يضاف إليها 100 ميكرو لتر من معلق الخميرة ثم تغلق الشريحة و تحضن لمدة 48-72 ساعة.

5-2-2- التشخيص الجزيئي لخميرة *P. anomala*

تمت عملية التشخيص الجزيئي على مستوى مخبر Microbiologie et Molécules Bioactive بجامعة المنار بتونس، وفق العمليات التالية:

أ- استخلاص الحمض النووي ADN

اتبعت في هذه العملية الخطوات التالية:

1- تحضير المحاليل المستعملة في الاستخلاص و هما محلولي التحليل و المعايرة.

2- يوضع 500 ميكرو لتر من محلول التحليل ذو اللون الشفاف داخل أنابيب Eppendorf ذات حجم 1.5 ملل و يضاف إليها خميرة *P. anomala* المأخوذة من مزرعة فتية للخميرة، ثم يتم سحقها جيدا مع المحلول باستعمال عود خشبي وتترك لترتاح مدة 10 دقائق في درجة حرارة المخبر.

3- يضاف 150ملل من محلول المعايرة أستات البوتاسيوم ويمزج جيدا مع في جهاز الرج ثم يعرض للطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/ دقيقة.

4- يأخذ بواسطة ماصة حوالي 600 ميكرو لتر من الجزء الطافي ويوضع داخل Eppendorf ويرج عكسيا حوالي 10 مرات.

5- يعرض للطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/ دقيقة.لمدة 5 دقائق.

6- يتم التخلص من الجزء الطافي ويجفف الجزء الراسب الذي يحوى ADN على ورق الترشيح.

7- يضاف إليه بعد ذلك حوالي 300 ميكرو لتر من الإيثانول (70 %) ويعرض للطرد المركزي على 12000 دورة/ دقيقة.لمدة 5 دقائق.يتم التخلص من الجزء الطافي ويجفف الجزء الراسب داخل المدخنة(haute)، ثم يضاف إليه 40-50 ميكرو لتر من Tris-EDTA (TE) ذو درجة حموضة تعادل 8.

8- يوضع في حمام مائي لمدة ساعة على درجة حرارة 37°م.

9- يحفظ على درجة حرارة -20°م لحين الإستعمال.

ب- تضخيم ADN بتقنية Polymerase Chain Reaction (PCR)

استخدمت تقنية PCR لتضخيم ADN المستخلص، بالاعتماد على طريقة Tao و آخرون (2011) حيث استخدمت زوجين من البادئات هما: ITS1 و ITS4 (Internal Transcribed Spacer) لتتبع بعدها بعملية الترحيل الكهربائي (Electrophorèse) لفحص نواتج تضخيم ADN.

ج- تحديد التسلسل الجزيئي Séquençage

حدد التسلسل الجزيئي لنواتج PCR لخميرة *P. anomala* وقورن مع الحمض النووي للعزلات المرجعية لتحديد نسبة التشابه بالاعتماد على برنامج BLAST. (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)

5-2-3- تثبيط فطر *A. flavus* باستعمال خميرة *P. anomala* على الوسط الصلب

تم إجراء إختبار تثبيط الخميرة لفطر *A. flavus* بمسح 100 ميكرو لتر من معلق خميرة *P. anomala* (عزلة L_1 و L_2) بتركيز 10^8 خ/ملل على سطح وسط PDA، وتترك لتجف ثم يوضع في مركز الطبق 10 ميكرو لتر من معلق بوغي لفطر *A. flavus* بتركيز 10^6 بوغ/ملل،بمعدل 3 مكررات لكل عزلة. تحضن الأطباق على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام، مع الشاهد دون خميرة،ليتم قياس قطر نمو الفطر وتقدر نسبة التثبيط وفق العلاقة:

نسبة التثبيط = (ش – ت) X 100 /ش.

ش: معدل قطر الشاهد للمستعمرات غير الخاضعة للتثبيط.

ت: معدل قطر المستعمرات الفطرية الخاضعة للتثبيط.

5-2-4- اختبار تأثير المركبات الطيـــارة المضادة للفطريـــات المفرزة من طرف *P. anomala* على نمو *A. flavus*

استعمل في هذه التجربة طبقي بتري يحتويان على وسط PDA، متقابلين، بحيث يلقح الطبق العلوي بقرص فطري قطره 5 ملم لفطر *A. flavus* ، في حين يتم نشر 100 ميكرو لتر من معلق الخميرة (عزلة L_1 و L_2) بتركيز 10^8 خ/ملل على الطبق السفلي، بعدما يجف يتم إلصاق الطبقين فوق بعضهما البعض ويحكم إغلاقهما بشريط من البرافين، ثم تحضن الأطباق على 28°م لمدة 7 أيام مع الشاهد دون خميرة، وتقدر نسبة التثبيط حسب العلاقة السابقة.

5-2-5- اختبار إنتاج خميرة *P. anomala* للإنزيمات المحللة

اجري اختبار قدرة إنتاج خميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 للإنزيمات المحللة Protéase, Chitinase, Cellulase, Amylase بنفس الطريقة التي استعملت مع بكتيريا *B.megaterium* سابقا.

5-2-6- التأثير التثبيطي للسموم القاتلة لخميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 على فطر *A. flavus*

أجريت تجربة إنتاج السموم القاتلة من طرف *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 على وسط Méthylène Blue Agar (MBA) ذو درجة حموضة 4.5.

بعد تعقيم الوسط، يبرد إلى درجة حرارة 45°م ليلقح الوسط بفطر *A. flavus* بتركيز 10^4 بوغ/ملل، يمزج المحتوى بلطف ثم يوزع داخل أطباق بتري معقمة، بعدها يلقح كل طبق بمستعمرة من خميرة *P. anomala* على شكل ثلاث بقع متباعدة عن بعضها البعض، لتحضن الأطباق على 25°م لمدة 72 ساعة.(Lillbro وآخرون، 2005).

يتم تسجيل إنتاج السموم القاتلة من طرف الخميرة بظهور منطقة تثبيط شفافة حول الخميرة.

5-2-7- تقدير نشاطية السموم القاتلة لخميرة *Pichia anomala* عزلة L_1 و L_2 على فطر *A. flavus*

تزرع خميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 بتركيز 10^7 خ/ملل على وسط Yeast Peptone Dextrose (YPD) السائل ذو pH =4 ثم تحضن على درجة حرارة 20°م لمدة 96 ساعة.بعد الحضن تفصل خلايا الخميرة بالطرد المركزي 10.000 دورة لمدة 10 دقائق. يأخذ الجزء الطافي ويقسم إلى قسمين، القسم الأول يعقم على درجة حرارة 100°م لمدة ساعة لغرض تخريب السموم القاتلة المنتجة من طرف الخميرة ويستعمل كشاهد بعد أن يلقح بمعلق بوغي للفطر 10^6 بوغ/ملل. أما القسم الثاني فيلقح هو الآخر بالمعلق البوغي للفطر،ثم تحضن الأوساط على درجة 20°م لمد ة 48 ساعة، لتقاس الامتصاصية الضوئية عند 600 نانو متر بعد الحضن لكلا العز لتـــين (Ullivarri و آخرون، 2014).

تقدر نشاطية السموم القاتلة وفق المعادلة:

النشاطية القاتلة = $100 - (100 * A_c / A_x)$

A_x : امتصاصية الجزء الطافي المعامل.

A_c : امتصاصية الشاهد.

5-2-8- مكافحة فطر *A. flavus* داخل المخازن المصغرة (mini silo) باستعمال خميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2.

بهدف إظهار مدى تأثير خميرة *P. anomala* و تثبيطها لفطر *A. flavus* في أماكن تخزين غذاء الدواجن، تم تحضير معلق بوغي لكل من الخميرة والفطر بتركيز 10^5 خ/ملل و10^4 بوغ/ملل على التوالي. تمت التجربة داخل أنابيب اختبار طولها 15 سم وقطرها 1.2 سم (شكل4)، يوضع 10 غ من غذاء الدواجن المعقم في كل أنبوب ثم يلقح بـ10^4 بوغ/غ من *A. flavus* و10^5 خلية/غ من خميرة *P. anomala* في آن واحد، حيث يضاف كل منهما

على شكل قطرات، مع التحريك بغرض التوزيع الجيد للأبواغ الفطرية وخلايا الخميرة. تغلق الأنابيب بسدادة مطاطية معقمة ملائمة لفوهة الأنابيب وتمرر خلالها إبرة معقمة لتسريب الهواء داخل الأنابيب.

من جهة أخرى تلقح عينات من الأنابيب بالمعلق البوغي للفطر فقط لتستعمل كشاهد.تحضن جميع الأنابيب (3 مكررات لكل معاملة) لمدة 12 يوم على درجة حرارة 28°م ،ليتم تقدير عدد المستعمرات النامية بالنسبة للخميرة والفطر(UFC/غ) كل 48 سا، وذلك بأخذ 1 غ من العينات ووضعها في 9 ملل من الماء المقطر المعقم، لتجرى سلسلة من التخافيف العشارية إلى غاية 10^{-4} .(Druofors و آخرون، 2005).

شكل (4): تجربة نظام المخازن المصغرة (Mini-silo) لمكافحة فطر *A. flavus*

الفصل الثالث
النتائج

النتائج

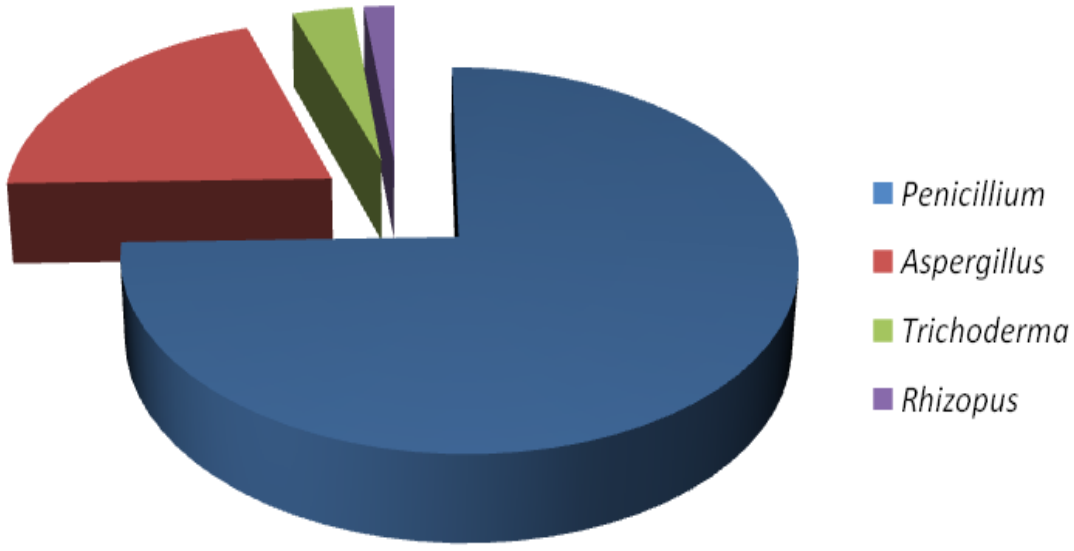
1- نتائج العزل و التشخيص

لوحظ من خلال النتائج المبينة في الجدول (6) والشكل (5)، أنه من بين 59 عزلة فطرية عزلت انطلاقا من ستة عينات من غذاء الدواجن، التي جلبت من المجمع الشرقي لغذاء الأنعام بالعلمة، ولاية سطيف، مثل فطر *Penicillium* أكبر نسبة تثبيط ب 74.58 % (44 عزلة) ليليه فطر *Aspergillus* ب 20.34 %(12 عزلة)، ثم فطر *Trichoderma* ب 3.39 %(2 عزلة) و أخيرا فطر *Rhizopus* ب 1.70 %(عزلة واحدة).

توزعت نسب الفطريات التابعة للأجناس الفطرية المعزولة حسب كل عينة من العينات المدروسة كما يلي: **العينة (1)** سيطر فيها فطر *Penicillium* من حيث نسب التلوث ب 75 %موزعة على الأنواع الفطرية التالية: *P. purpurogenum* بـ25 %، *P. citrinum* بـ 12.5 % و *Penicillium sp.* بـ 37.50 %، ليليه فطري *A. glocus* و *Trichoderma* بنسبة متعادلة قدرت بـ: 12.50 %، أما **العينة (2)** فكانت فيها سيطرة فطر *Penicillium* بـ 60 % ، موزعة على الأنواع الفطرية التالية : *P. citrinum* (30 %) و *P. variable, P. citreonigrum,* *Penicillium sp* بـ 10%، مقارنة مع باقي الأنواع الفطرية الأخرى الممثلة في فطري *A. flavus* و *A. niger* بنسبة 20 % لكل منهما. نفس النتيجة أيضا سجلت مع **العينة (3)**، حيث كانت سيادة فطر *Penicillium* واضحة بنسبة تلوث قدرت بـ 80 % ، موزعة على الأنواع : *P. citrinum* و *P. citreonigrum* بـ 20 % لكل منهما و. *Penicillium sp* بـ 40 % و هذا مقارنة مع فطر *A. flavus* الذي كانت نسبة تلوثه في هذه العينة مقدرة ب 20 %، والملاحظ أيضا في هذه العينة تسجيل اقل عدد من العزلات الفطرية المعزولة و المقدرة ب5 عزلات فقط مقارنة مع باقي العينات الأخرى.

جدول (6): النسب المئوية للعزلات الفطرية المعزولة من عينات غذاء الدواجن .

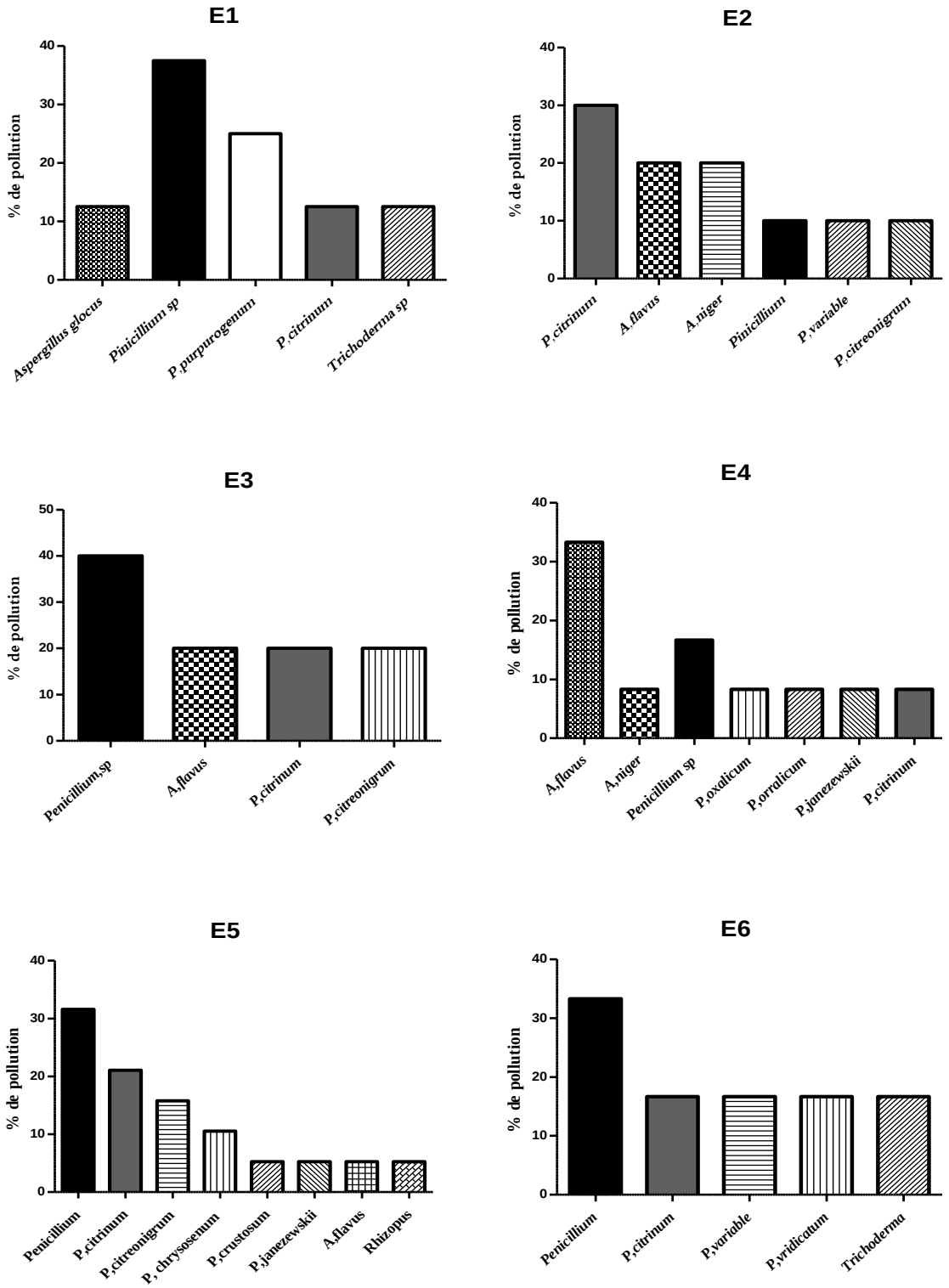
العزلات الفطرية	Rolative Density (RD) n= 59	النسبة المئوية
Penicillium	44	74.58%
Aspergillus	12	20.34%
Trichoderma	2	3.39%
Rhizopus	1	1.70%



الشكل (5): توزع النسب المئوية للأجناس الفطرية الملوثة لعينات غذاء الدواجن.

وعلى العكس من العينة (1) و (2) و (3)، كانت سيطرة فطر *Aspergillus* واضحة في **العينة (4)** بنسبة تلوث فاقت 45 % ممثلة في فطري *A. flavus* بـــ 4 عزلات و نسبة تلوث وصلت إلى 36.36 % و *A. niger* (عزلة واحدة) بنسبة تلوث 9.09 %، وهذا دائما مقارنة مع باقي العزلات الفطرية الأخرى الممثلة في الأنواع التابعة لجنس *Penicillium* و هي : *P. oxalicum, P. orralicum, P. janezewskii* و *P. citrinum* بنسبة تلوث 9 % و*Penicillium sp.* بـ 18.18 % .

أما نتائج العزل و التشخيص **للعينة (5)** فبينت أكبر عددمن العزلات الفطرية المعزولة ب 19 عزلة، مقارنة مع باقي العينات الأخرى، سيطر فيها فطر *Penicillium* بنسبة تلوث فاقت 89 % موزعة على 6 أنواع فطرية مختلفة ممثلة في: *P. chrysosenum* (10.52%)، *P. crustosum* (5.26%)، *P. janezewskii* (5.26%) *P. citreonigrum* (15.78%)، *P. citrinum* (21.05%) و *Penicillium sp.* (31.57%) ، يلي بعد ذلك فطري *A.flavus* و *Rhizopus sp.*، بنسبة تلوث قدرت ب 5.26 % لكل منهما. و في الأخير أظهرت نتائج العزل **للعينة السادسة**، ظهور *Trichoderma* بعزلة واحدة فقط و بنسبة تلوث وصلت إلى 16.66% أما السيطرة فكانت لفطر *Penicillium* بمجموع 5 عزلات (3.33%) موزعة على الأنواع : *P. citrinum* ، *P. variable* و *P. vridicatum* بنسبة 16.66 % لكل عزلة و 33.33 % لفطر *Penicillium sp.* (شكل6).



شكل (6):نسبة التلوث لعينات غذاء الدواجن ($E_1, E_2, E_3, E_4, E_5, E_6$) بدلالة الفطريات المعزولة.

1-1- تشخيص فطر *Aspergillus flavus*

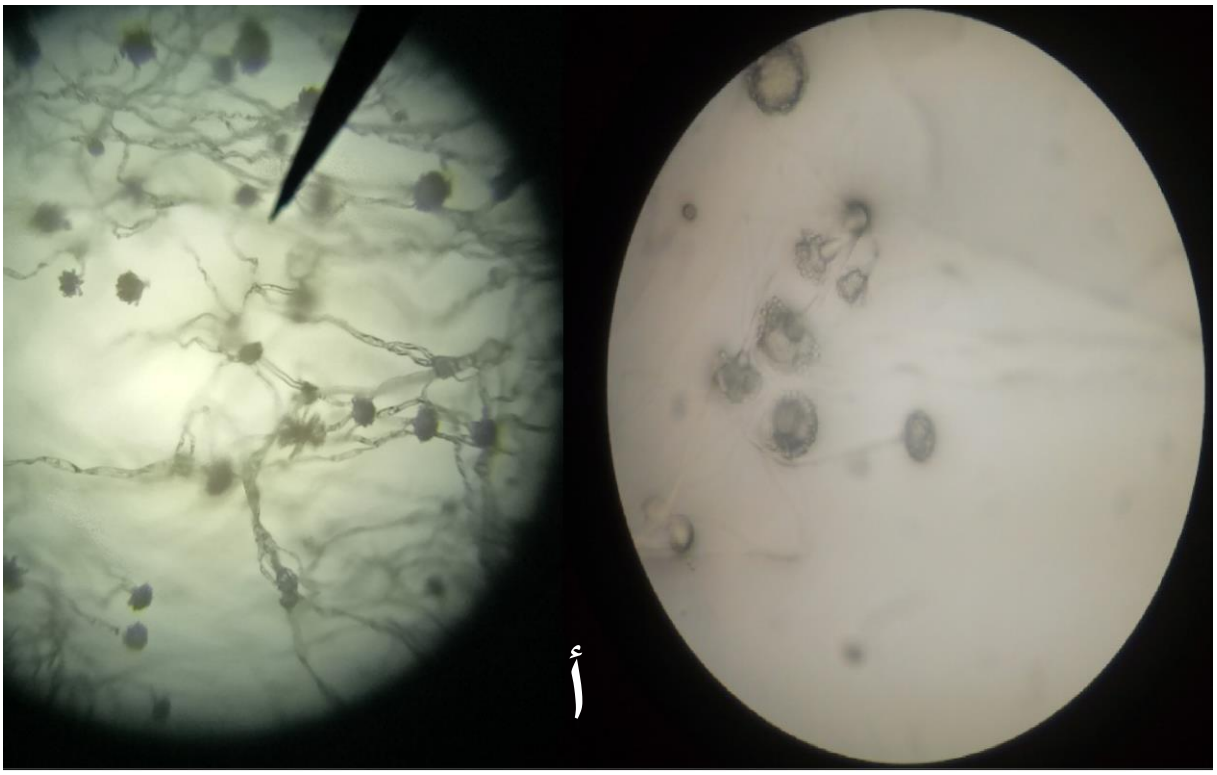
شخص فطر *Aspergillus flavus* بالاعتماد على الصفات المظهرية على أوساط التشخيص (PDA– CYA-MEA-G25N) و في درجات حرارة مختلفة (5°م, 25°م و 37°م) المعتمدة من طرف Pitt ،Hocking (1985).(شكل7 (ب)– 8وجدول 7). بالإضافة إلى الصفات المجهرية عن طريق تحديد شكل و لون الأبواغ الكوندية ،الذنيبات والحوامل الكونيدية،حيث تصطف الأبواغ في أعمدة خضراء داكنة فوق صفين من الذنيبات ذات نفس الأبعاد(Phialides)، والتي تتوضع على الرأس البوغي ذو الشكل الكروي (شكل6 (أ)). أما الأبواغ فتكون كروية الشكل ملساء ذات لون اخضر.

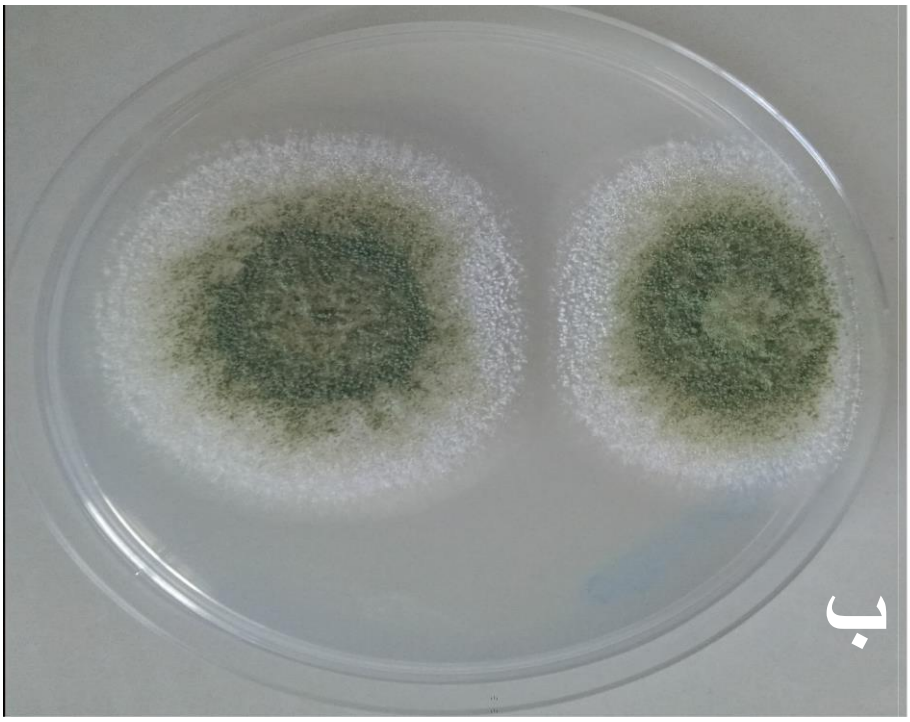
1-2- الإختبار البيولوجي

تبين من خلال الاختبار البيولوجي عدم تأثير عزلات فطر *Penicillium citrinum* على نمو البكتيريا المختبرة حيث أعطت تثبيطا متوسطا، فمعظم العزلات كان التثبيط فيها أقل من 20 ملم، في حين كان تأثير عزلات فطر *Aspergillus flavus* متباينا على نمو البكتيريا المختبرة، إذ لوحظ تثبيطا متوسطا للعزلات (7،8،10،11،12،14،16) و الذي تراوح بين (14-19 ملم)، أما العزلة الوحيدة التي كان تثبيطها واضحا و قويا فكانت العزلة A13 حيث تراوح ما بين (22-29 ملم).(جدول 8).

1-3- الكشف عن السموم الفطرية

اختيرت العزلة A13 من فطر *A. flavus* و التي كان قطر تثبيطها على البكتيريا المختبرة في الاختبار البيولوجي أكبر من 20 ملم لاختبار الكشف عن السموم الفطرية، وهذا على وسطي YES السائل و الصلب، ثم فحص مستخلص الوسط السائل وقرص من الوسط الصلب بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة.

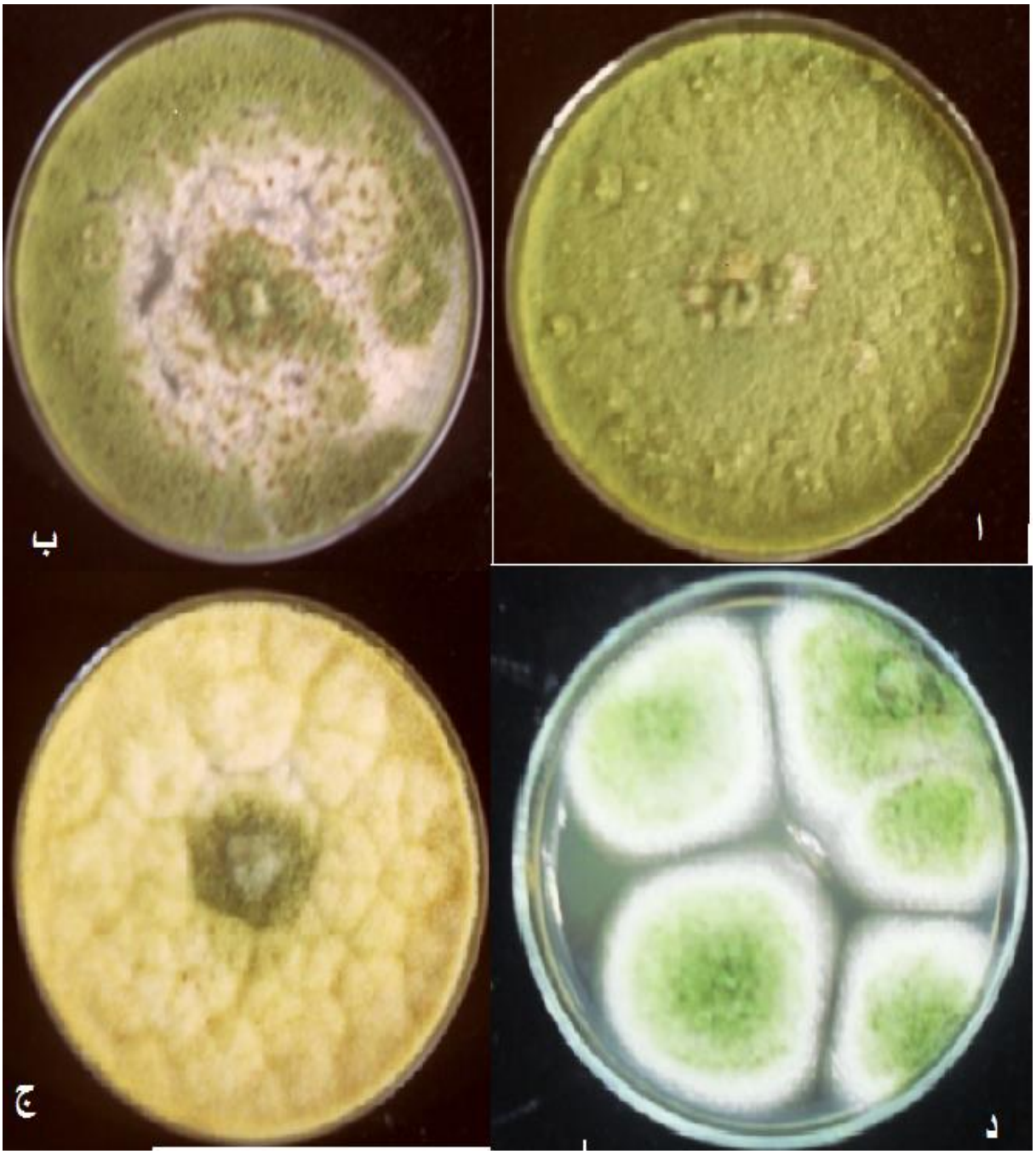




شكل (7): الشكل المجهري (أ) بتكبير X40 و المظهري (ب) لفطر *A. flavus*.

جدول (7): الخصائص المزرعية لعزلة *A. flavus* النامية على أوساط التشخيص وعلى درجات حرارة مختلفة بعد أسبوع من الحضن.

الوسط	درجة الحضن	قطر المستعمرة	الخصائص المزرعية
PDA	5°م	–	- لا يوجد نمو
	25°م	50 ملم	- مستعمرة حبيبية ذات لون أخضر داكن في المركز ثم أخضر زيتوني فأبيض على الحواف.
CYA	5°م	–	- لا يوجد نمو
	25°م	70-50 ملم	- مستعمرة حبيبية ذات لون أخضر في المركز ثم أبيض صوفي ، مغطاة بحبيبات صفراء و الخلفية صفراء.
	37°م	90 ملم	- نمو سريع، مستعمرة ذات مركز مرتفع ذو لون أخضر داكن، مع وجود أجسام حجرية سوداء و خلفية رمادية مجعدة.
MEA	5°م	–	– لا يوجد نمو.
	25°م	50 ملم	- مستعمرة مسطحة صوفية حبيبية، ذات لون أخضر زيتوني و حواف بيضاء، خلفية بيضاء مصفرة.
	37°م	35 ملم	- مستعمرة حبيبية خضراء داكنة، ذات سطح مرتفع مع وجود أجسام حجرية بنية اللون.
G25N	5°م	–	- لا يوجد نمو.
	25°م	30ملم	- مستعمرة قليلة النمو، ذات سطح صوفي حبيبي أصفر و مركز مخضر داكن مرتفع و الخلفية صفراء.
	37°م	25 ملم	- مستعمرة خضراء مصفرة صوفية محببة،مرتفعة المركز و الخلفية صفراء بنية مجعدة.



شكل(8): مستعمرات فطر *A. flavus* النامية على أوساط تشخيص مختلفة.

(أ): 37 °م MEA – (ب): 25 °م MEA – (ج): 25 °م CYA - (د): 25 °م PDA

جدول(8): قطر هالة التثبيط لعزلات *A.flavus* على البكتيريا المختبرة في الاختبار البيولوجي.

عزلات *A. flavus*	*B.subtilis*	*E. coli* ATCC25922	*Staphylococcus* ATCC25923	*Pseudomonas* ATCC27853
A7	-	14mm	-	-
A8	-	18mm	-	-
A10	-	14mm	-	-
A11	-	19mm	-	-
A12	17mm	-	-	-
A13	22mm	29mm	-	-
A14	18mm	17mm	-	-
A16	19mm	-	-	-

شوهدت الألواح في الضوء المرئي و تحت الأشعة الفوق بنفسجية (365 نانو متر) و قبل و بعد المعاملة الكيميائية بالكاشف H_2SO_4 50% ، و تمت مقارنة البقع مع السموم القياسية الأفلاتوكسين B_1 وB_2 و هذا في نظام الهجرة(T E F، 6 : 3 : 1) الذي يسمح بالفصل الجيد للسموم الفطرية.

يتبين من خلال النتائج أن عزلة *A.flavus* (A 13) منتجة لسموم الأفلاتوكسين من النوع B_1 و B_2 و يظهر ذلك في مستخلص وسط زرع العزلة ببقعتين ذات لون أزرق بنفسجي ومعامل انسياب 0.40 و0.32 على التوالي في نظام الهجرة (T E F) (الجدول رقم 9).

بالإضافة إلى سموم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 ، تم الكشف عن بعض السموم الفطرية الأخرى، وهذا بالاعتماد على المعطيات النظرية المتعلقة بمعامل الإنسياب ولون البقع قبل وبعد المعاملة الكيميائية، حيث لوحظت بقعة كبيرة ذات معامـــــل انسياب (0.83) والتي يحتمـــل أن تكـــون مشتق Sterigmatocystin. (Patterson و آخرون، 1986)، كما تم الكشف عن بقعة أخرى بمعامل انسياب أقل (0.74) والتي تم تشخيصها على أنها حمض beta-cyclopiazonique .

جدول (9): التغيرات اللونية و الإشعاعية لمكونات مستخلص وسط زرع مستخلص الخميرة لعزلة *A. flavus* بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في نظام الهجرة (T:E: F).

عدد البقع	معامل الإنسياب Rf	لون البقع في الضوء المرئي	لون البقع تحت أشعة UV 356 nm	لون البقع بعد المعاملة ب: H2SO4 50% تحت UV365 nm
1	0.41	-	أزرق بني	أصفر
2	0.32	-	أزرق بني	أصفر
3	0.83	-	بني	أصفر بني
4	0.74	-	أصفر بني	أصفر بني

2- المكافحة البيولوجية لفطر *A. flavus* باستعمال *B.megaterium*

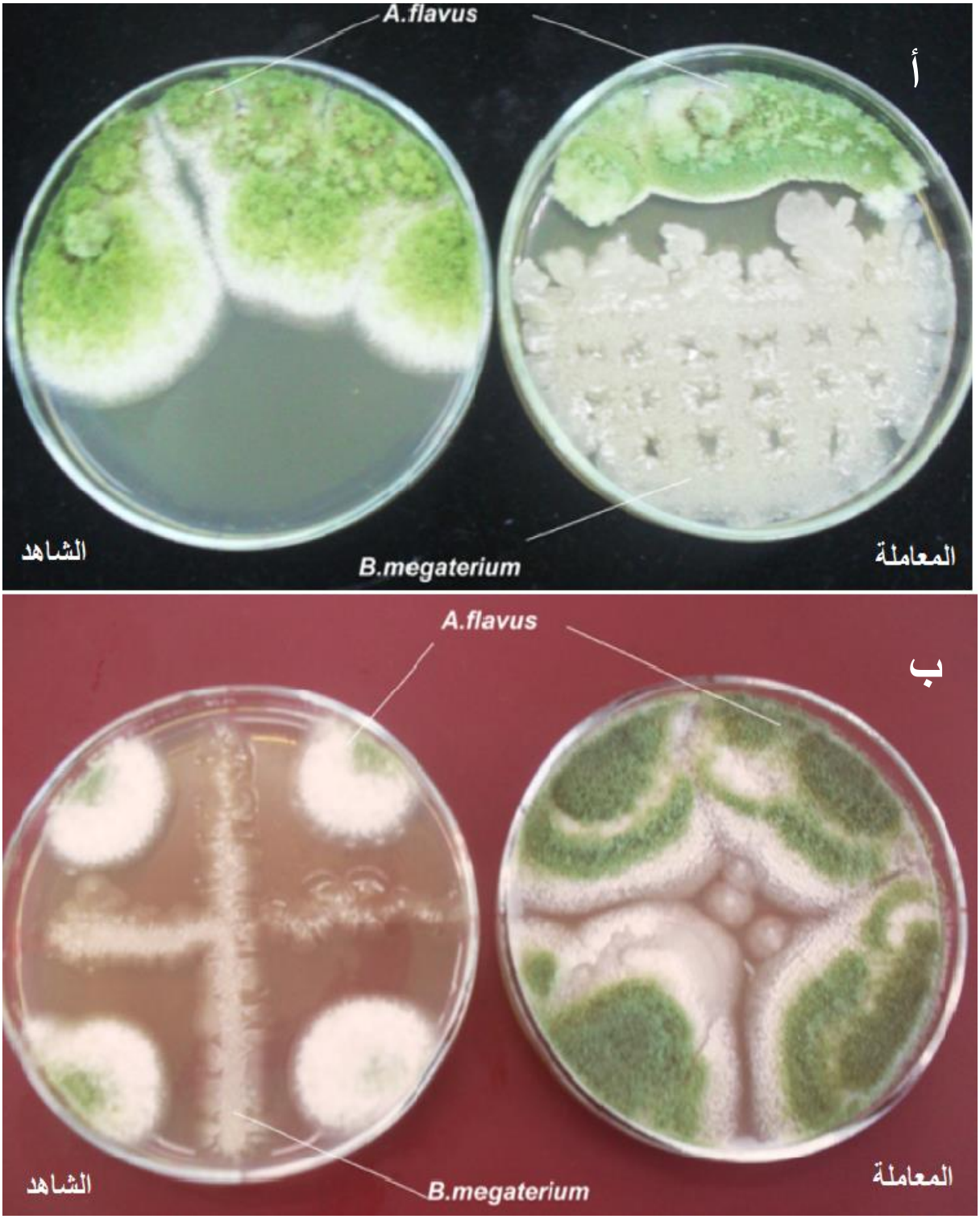
2-1- تأثير *B.megaterium* على نمو *A. flavus* على الوسط الصلب

تمت مكافحة فطر *A. flavus* مخبريا ببكتيريا *B.megaterium* بطريقتين مختلفتين، طريقة Arras (1993) وطريقة Vincent(1991) ،اعتمدت الطريقة الأولى على حقن وسط PDA ب 20µl من المعلق البوغي لفطر *A. flavus* (10^4 بوغ/ملل)، حيث لوحظ التأثير التثبيطي الواضح للعزلة البكتيرية على النمو القطري للفطر مقارنة مع الشاهد، ويتضح ذلك من خلال قياس متوسط قطر المستعمرات الفطرية المثبطة والذي قدر ب 26.66 ملم مقارنة مع الشاهد 45 ملم بعد 7 أيام من الحضن، بنسبة تثبيط بلغت 40.75% (الشكل 9- ب-).

أما الطريقة الثانية، فتم فيها وضع قرص من مزرعة فطر *A. flavus* عمرها 7 أيام في نصف مساحة الطبق، وتخطيط 20µl من البكتيريا المضادة *B.megaterium* في النصف الآخر من الطبق،ثم تحضن على درجة حرارة 28°م لمدة 7 أيام، سجل من خلال الشكل (9- أ-) التأثير التثبيطي الفعال للبكتيريا على النمو القطري للفطر،إذ انخفض قطر مستعمرة الفطر من 41 ملم إلى 22 ملم،حيث بلغت نسبة التثبيط 47.56 % .

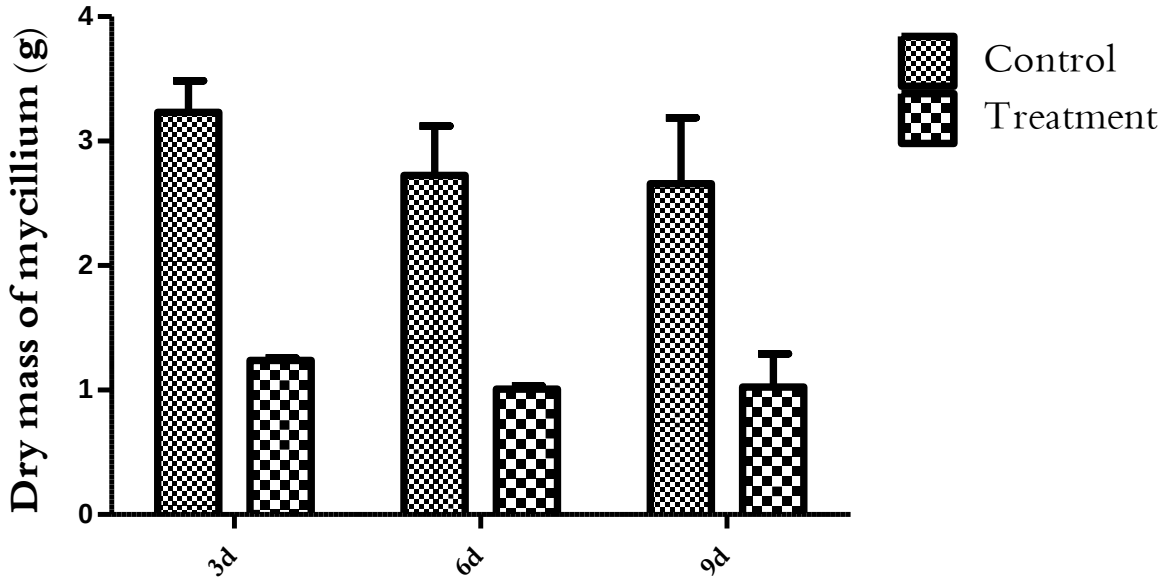
2-2- تأثير الرشاحة البكتيرية على الوزن الجاف للميسيليوم

يتبين من خلال نتائج دراسة تأثير الرشاحة البكتيرية على الوزن الجاف للغزل الفطري،أن تأثيرها كان واضحا على مدى فترة الحضن البالغة 9 أيام، فابتداء من 72 ساعة الأولى من الحضن لوحظ التأثير الفعال للرشاحة، أين بلغ الوزن الجاف أقصاه ب 1.25 غ مقارنة مع الشاهد (3.30 غ) ثم بدأ التأثير يزداد فعالية بعد 6 أيام من الحضن، لينخفض الوزن الجاف للغزل الفطري إلى 0.98 غ ليبلغ أدناه بعد 9 أيام من الحضن بمعدل 0.83 غ مقارنـــة مع الشاهد 2.37 غ. (الشكل10)



شكل (9) : التأثير التثبيطي لبكتيريا *B.megaterium* على فطر *A. flavus*

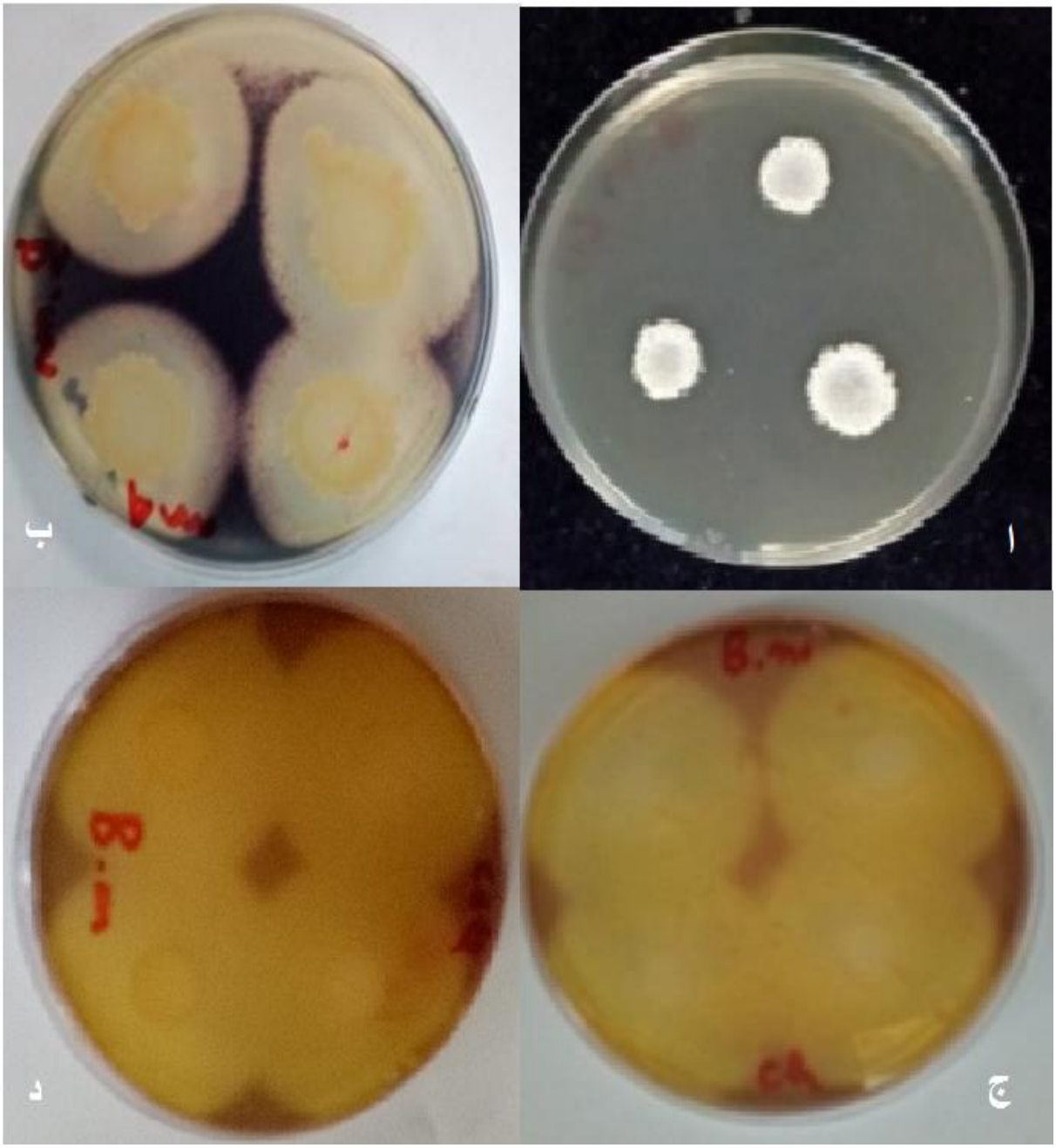
(أ): طريقة Arras (ب): طريقة Vincent



الشكل (10): التأثير التثبيطي للرشاحة البكتيرية على الوزن الجاف للميسيليوم .

2-3- تقدير آليات المكافحة البيولوجية لبكتيريا *B.megaterium*

أوضحت نتائج دراسة بعض آليات المكافحة البيولوجية لدى *B.megaterium* ، أن هذه الأخيرة غير قادرة على إنتاج حمض السيانيد، حيث لم يسجل تغير اللون الأصفر لورق الترشيح المرشوش بمحلول حمض picnique 5% إلى اللون البني الداكن.وكذلك الحال بالنسبة لاختبار إنتاج الأمونيا (NH_3) حيث كانت النتيجة سلبية ،إذ لم يتغير لون وسط الماء البيبتوني إلى اللون الأصفر بعد إضافة كاشف Nessler.بينما سجل قدرة البكتيريا على إنتاج الإنزيمات المحللة المتمثلة في :Protéase، Chitinase Amylase، Cellulase ، حيث لوحظ تشكل منطقة شفافة حول المستعمرات البكتيرية بعد غمر الأطباق بمحلول الليغول،هذا بالنسبة لإنزيمات : Cellulase، Chitinase، Amylase، أما بالنسبة لإنزيم Protéase فسجل تشكل منطقة شفافة حول البكتيريا النامية على وسط إختبار إنتاج إنزيم Protéase .(شكل11). وقد اختلف معدل قطر منطقة إنتاج الإنزيمات من إنزيم لآخر، حيث سجل أكبر معدل لدى إنزيم Chitinase بـ 41.75 ملم، ثم إنزيم Cellulase بـــ 37.75 ملم ليليه إنزيم Amylase بـــ11 ملم و أخيرا إنزيم Protéase بـــ 10ملم.



شكل(11): إنتاج الإنزيمات المحللة لبكتيريا *B.megaterium*

(أ): Protease (ب): Amylase (ج): Chitinase (د): Cellulase

3- المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *Pichia anomala* عزلة L_1 و L_2

3-1- تشخيص خميرة *P. anomala*

بينت اختبارات تشخيص الخميرة المعزولة من عينات غذاء الدواجن أن الخميرة المعزولة هي خميرة : *Pichia anomala*.فاستنادا إلى الصفات المظهرية والمجهرية، ،ظهرت المستعمرات دائرية الشكل كريمية اللون لكلا العزلتين (شكل12) أما شكل الخلايا فكان اسطواني مع تشكل ميسيليوم كاذب وأبواغ أسكية دائرية الشكل تراوح عددها ما بين 1-4 بوغ في كل كيس لدى كلتا العزلتين. أما نتائج الإختبارات البيوكيميائية باستعمال شريحة API bio الموضحة في الجدول (10) فأوضحت أن خميرة : *P. anomala* قادرة على استعمال مصادر مختلفة من الكاربون كسكريات:D-Glucose، D-Saccharose، L-Arabinose ومصادر مختلفة من النتروجين كالأحماض الامينية : Arginine و Omithine ،إضافة إلى بعض الكحولات.و تأكد تشخيص الخميرة من خلال التشخيص الجزيئي بعد تحديد التسلسل الجزيئي لنواتج PCR. (شكل13).

شكل (12) : مستعمرات عزلتي خميرة *P. anomala*(L_1 ,L_2) على وسط YPD (28° م)

جدول (10): نتائج الإختبار البيوكيميائي لخميرة *P. anomala* (L_1 ,L_2) حسب شريحة API bio

	L1	L2
Urease	+	+
Tryptophane desamiranase	–	–
Indole	–	–
Acetoine	–	–
D–Glucose	–	–
D–Saccharose	+	+
L–Arabinose	–	+
Gelatinase	+	+
Manitol	–	–
Inositol	–	–
Sorbitol	–	–
L–rhamnose	–	–
D–Melibiose	–	–
Anygdaline	+	+
B–Galactosidase	–	–
Arginine dihydrolase	+	+
Lysine decarboxylase	–	–
Omithine decarboxylase	+	+
Citrate	+	+
H_2S	–	–

Pichia anomala E7A Numéro d'accession FJ713067.1

Similarité 99%

```
Query  1    TTGCGCNNCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGttttttGAACTTTGCTTTGGGTGGT  60
            ||||||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  15   TTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGTGGT  74

Query  61   GAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACAtttttttAATGTTAAAACCTTTAACC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  75   GAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTTAATGTTAAAACCTTTAACC  134

Query  121  AATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGATCTC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  135  AATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGATCTC  194

Query  181  TTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  195  TTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATT  254

Query  241  TTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  255  TTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGC  314

Query  301  CTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  315  CTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCA  374

Query  361  AGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAATA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  375  AGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAAGCAGTCTTTCTGAAATA  434

Query  421  ATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  435  ATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCT  494

Query  481  CGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  495  CGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAAC  554

Query  541  TTAAGCATATCAATAAAGCGGAGG  564
            |||||||||||||||| |||||||
Sbjct  555  TTAAGCATATCAATAA-GCGGAGG  577
```

شكل(13): التسلسل الجزيئي للعزلة L2 مع العزلة المرجعية *Pichia anomala* E7A

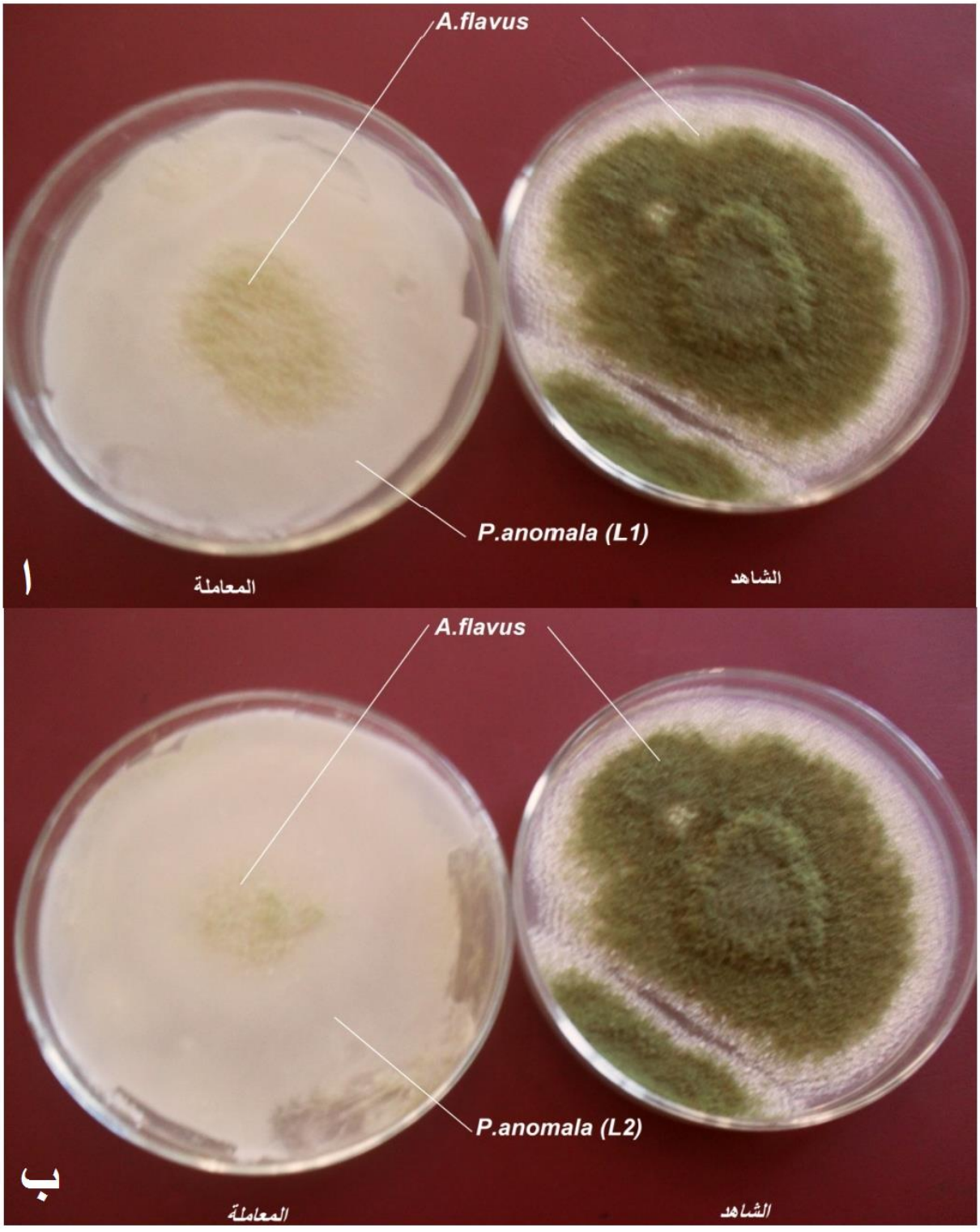
(رقم التسلسل FJ713067.1)

3-2- تثبيط فطر *A. flavus* باستعمال خميرة *P. anomala* على الوسط الصلب

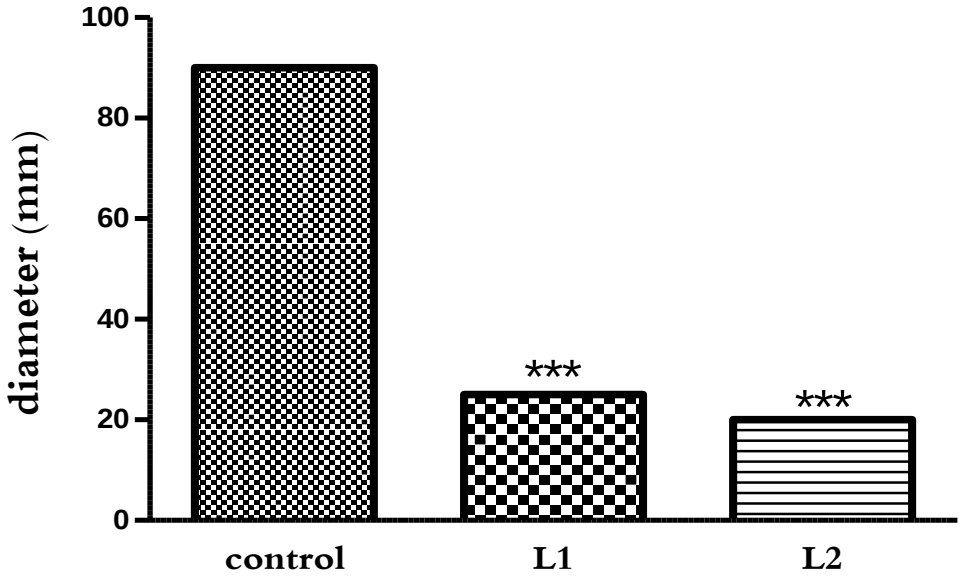
تمت تجربة تثبيط فطر *A. flavus* بخميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 على وسط PDA و ذلك بمسح 100 ميكرولتر من معلق الخميرة 10^8خ/ملل على سطح الوسط ثم يلقح 10 ميكرولتر من المعلق البوغي للفطر (10^6 بوغ/ملل) وبعد فترة الحضن البالغة 7 أيام على درجة حرارة 28°م، لوحظ التأثير التثبيطي الفعال لعزلتي الخميرة على النمو القطري للفطر مقارنة مع الشاهد، خاصة مع العزلة L_2 (شكل14)، التي وصلت نسبة التثبيط لديها إلى 77.78 % مقارنة مع العزلة L_1 المقدرة ب 72.22% إذ انخفض معدل النمو القطري لفطر *A. flavus* المعامل مقارنة مع الشاهد من 90 ملم إلى 20 ملم مع العزلة L_2 و إلى 25 ملم مع العزلة L_1 (شكل15).

3-3- تأثير المركبات الطيارة الضد فطرية المفرزة من طرف *P. anomala* على فطر *A. flavus*

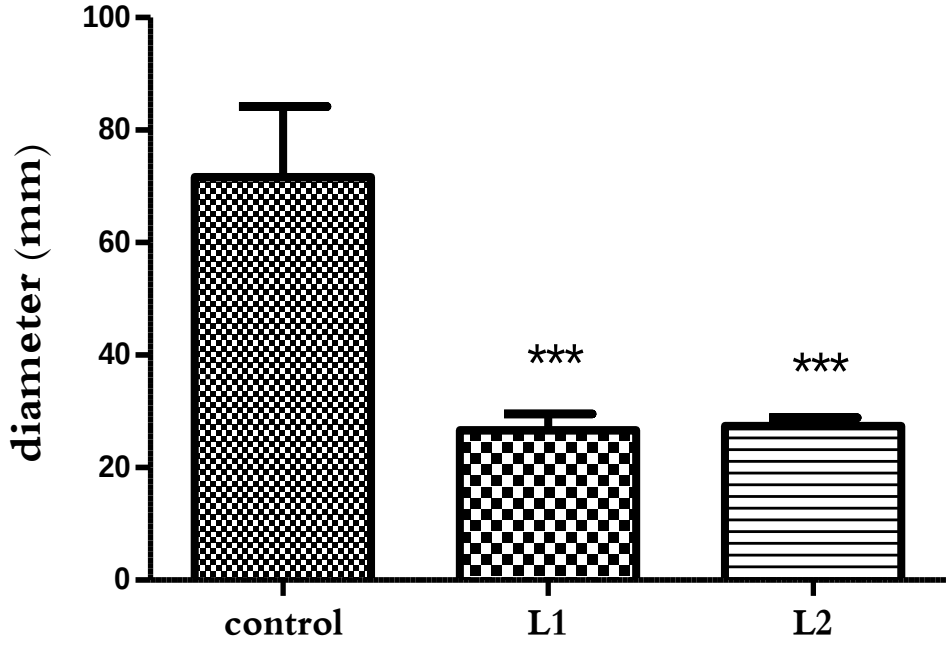
لوحظ من خلال الشكل (16) تثبيط النمو القطري لفطر*A. flavus* نتيجة فعالية المركبات الطيارة الضد فطرية المفرزة من طـــرف *P. anomala* سواء بالنسبة للعزلة L_1 أو L_2 حيث وصلـت نسبة التثبيـــط إلى 61.90% و 60.95% على الترتيب، وسجل فرق معنوي بين العزلتين ، إذ انخفض معدل النمو القطري *لفطر A. flavu* إلى 26.66 ملم بالنسبة للعزلةL_1 و إلى 27.33 ملم بالنسبة للعزلة L_2 وهذا مقارنة مع الشاهد (71.66 %) بعد 7 أيام من الحضن على 28°م.



شكل (14): التأثير التثبيطي لفطر *A. flavus* بعزلتي خميرة *P. anomala* (L_1 ,L_2)على الوسط الصلب.



شكل (15): تثبيط النمو القطري لفطر *A.flavus* بخميرة *P. anomala* على الوسط الصلب.



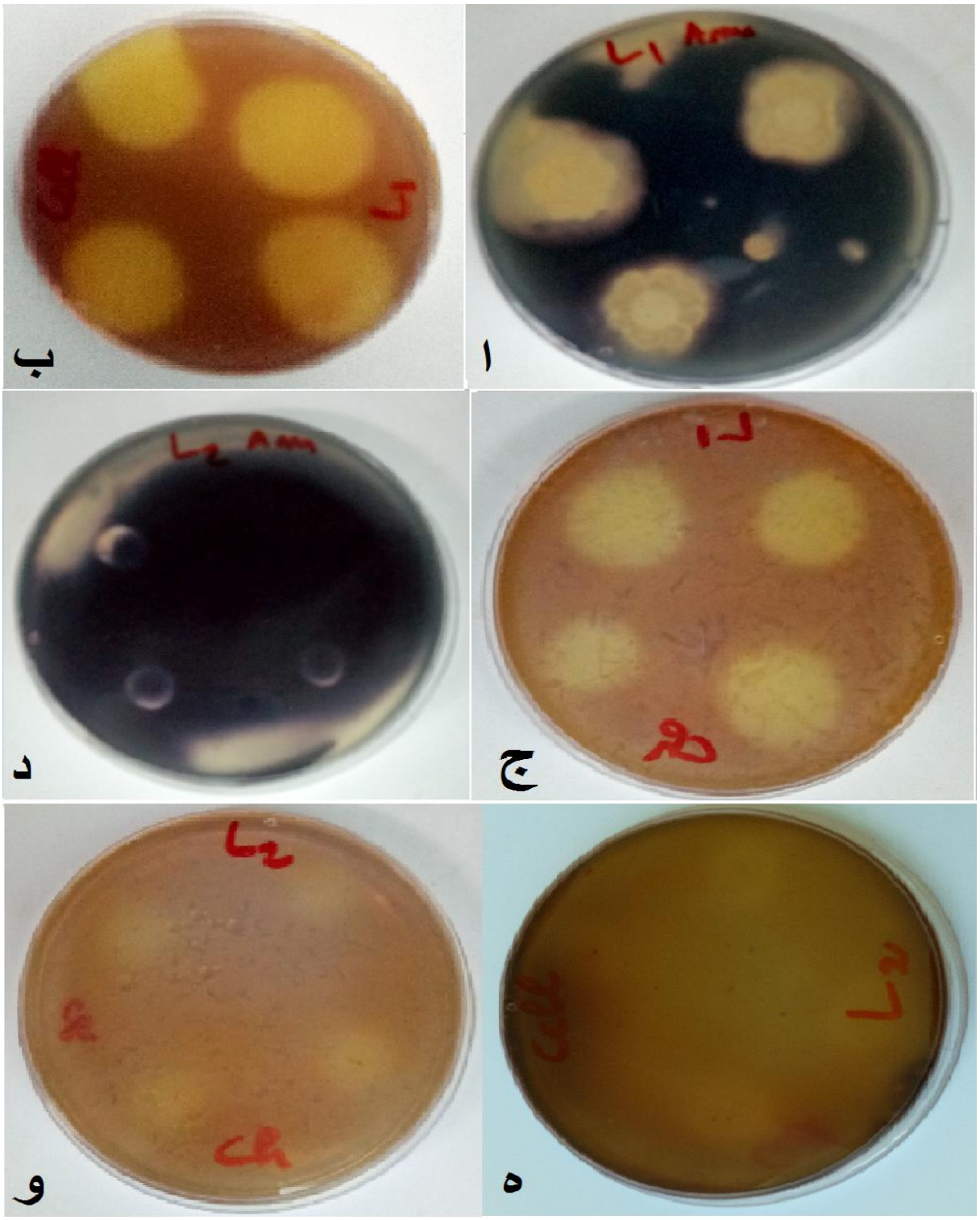
شكل (16): التأثير التثبيطي للمركبات الطيارة المفرزة من طرف *P. anomala* على النمو القطري لفطر *A.flavus*

3-4- إختبار إنتاج خميرة *P. anomala* للإنزيمات المحللة

أوضحت النتائج المتحصل عليها في هذا الإختبار، أن بخميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 قادرة على إنتاج بعض الإنزيمات المحللة التي تدخل ضمن آليات المكافحة البيولوجية لدى الخمائر والتي من بينها إنزيمات Chitinase Amylase، Cellulase، على عكس إنزيم Protéase الذي سجل غياب إنتاجه من طرف كلتا العزلتين. كما سجل أيضا تباين واضح في قطر إنتاج الإنزيمات المختبرة بين العزلتين، حيث كان هناك فرق معنوي كبير جدا بين العزلتين، إذ سجل أكبر قطر إنتاج لإنزيم Cellulase لدى العزلة L_2 ب 40.00 ملم مقارنة مع L_1 (30.75 ملم)، ليليه إنزيم Chitinase بقطر إنتاج فاق 22 ملم عند L_1 مقارنة مع L_2 (14.75ملم)، أما إنزيم Amylase فسجل إنتاجه أيضا لدى كلتا العزلتين لكن بقطر إنتاج منخفض مقارنة مع الإنزيمين السابقين ب 6.0 ملم لدى L_1 و 3.33 ملم لدى L_2. الشكل (17) و الشكل (18).

3-5- تقدير النشاطية القاتلة للسموم

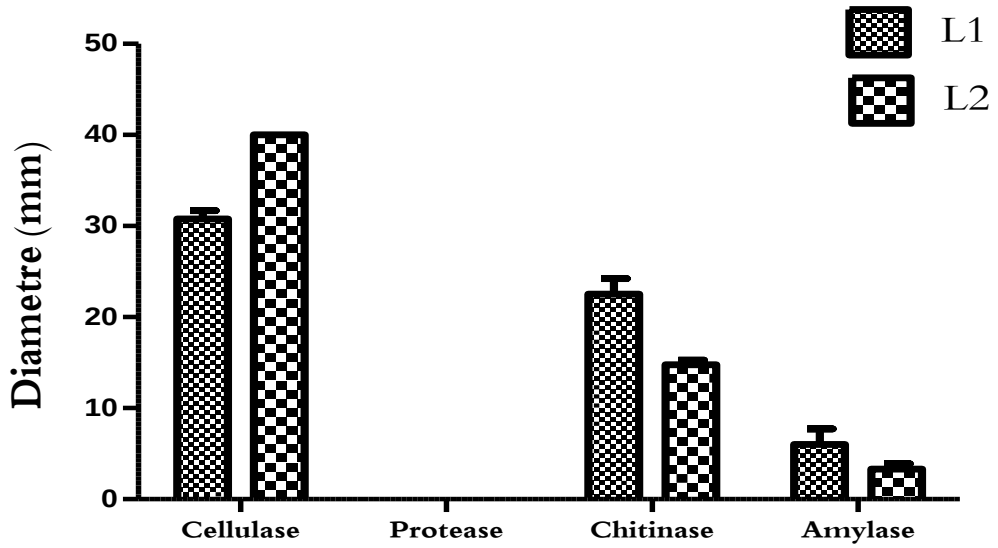
من خلال النتائج المتحصل عليها في الشكل (19) ،يتبين التأثير الواضح لخميرة *P. anomala* عزلة L_1 وL_2على نمو فطر*A. flavus* ، إذ سجل فرق معنوي كبير بين العز لتين حيث كانت نسبة النشاطية القاتلة للعزلة L_2 كبيرة جدا على الفطر، إذ انخفض نموه بنسبة فاقت 71 % مقارنة مع العزلة L_1 التي وصلت فيها نسبة النشاطية القاتلة إلى 14.18 .% ويتضح هذا أكثر من خلال تجربة التأثير التثبيطي للسموم القاتلة على نمو فطر *A. flavus* على وسط MBA عند درجة حرارة 20°م وأس هيدروجيني 4. فمن خلال الشكل (20) سجلت هالة تثبيط شفافة حول مستعمرة الخميرة عزلة L_2 مما يدل على إنتاجها للسموم القاتلة مقارنة مع العزلة L_1 التي لم يسجل فيها ظهور هالة التثبيط.



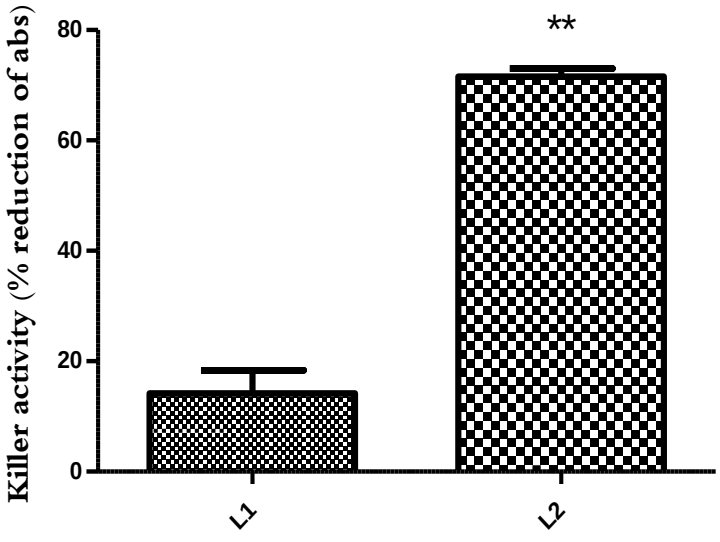
شكل (17) : إنتاج الإنزيمات المحللة لخميرة *P. anomala*.(عزلة L_1 و L_2)

(أ): Amylase L1 (ب): Cellulase L1 (ج): Chitinase L1

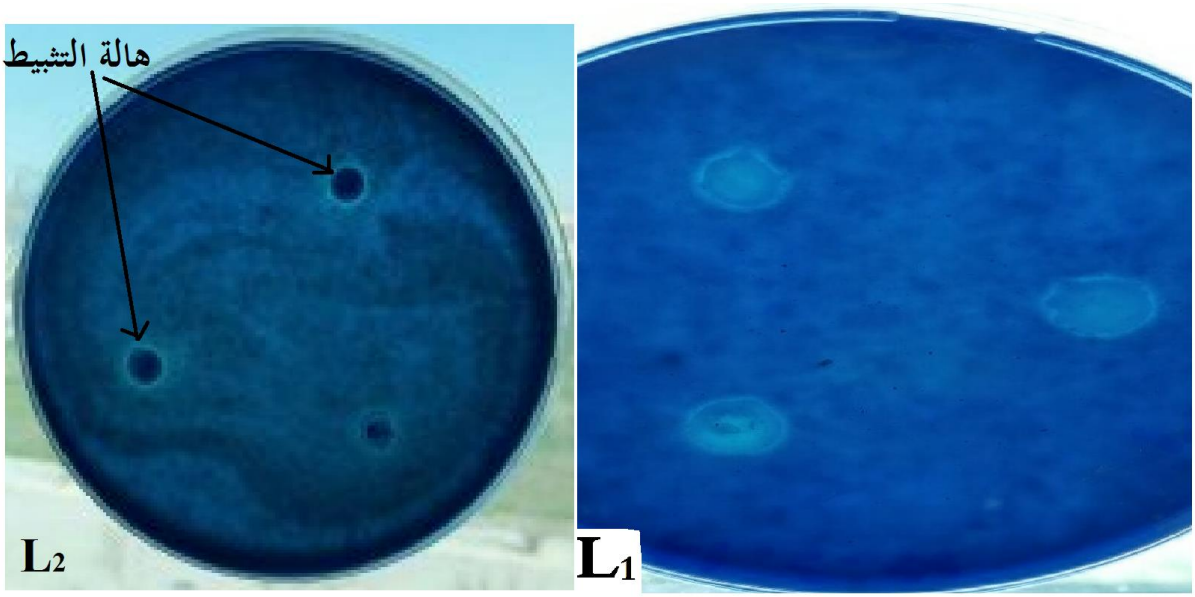
(د): Amylase L2 (هـ): Cellulase L2 (و): Chitinase L2



شكل (18): المعدل القطري لإنتاج الإنزيمات المحللة المنتجة من طرف عزلتي خميرة *P. anomala*.



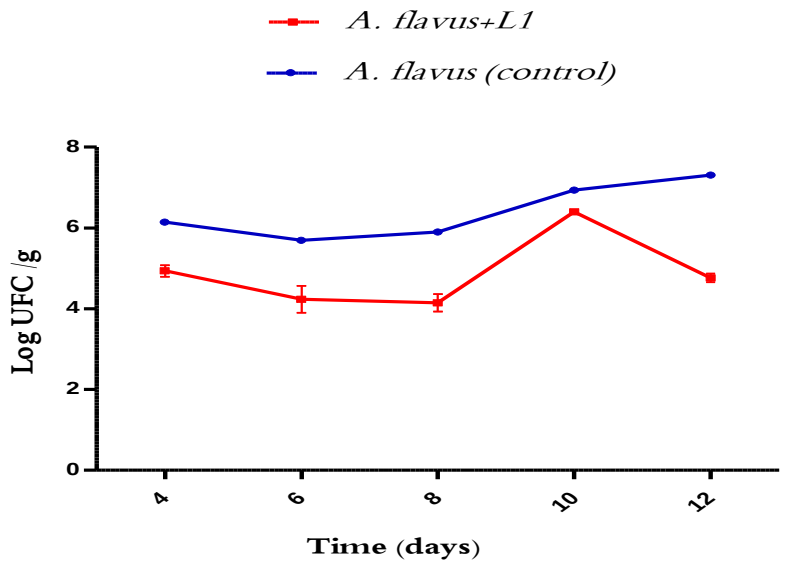
شكل (19): النشاطية القاتلة لخميرة *P. anomala* ضد فطر *A. flavus*.

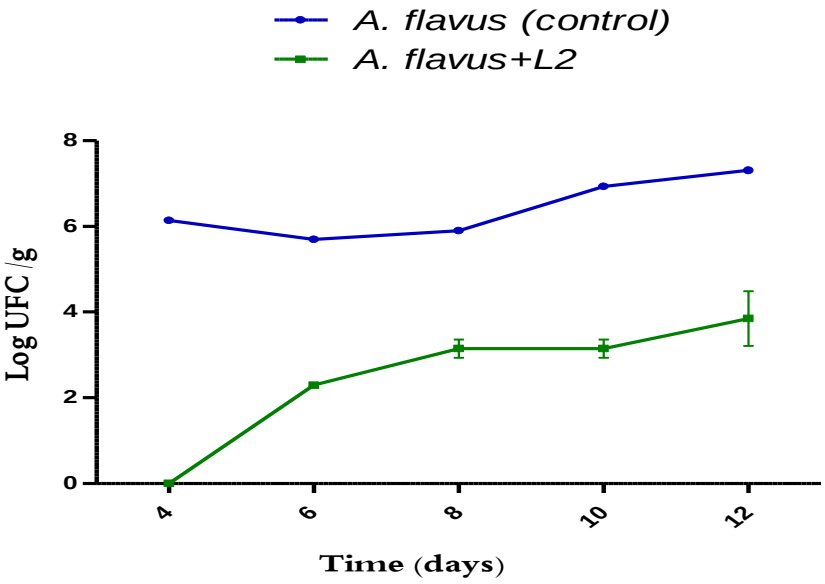


شكل (20) : التأثير التثبيطي للسموم القاتلة للعزلتين L_1 و L_2 غلى نمو فطر *A. flavus* على وسط MBA عند درجة حرارة 20°م و $p_{H=4}$

3-6- تثبيط فطر *A. flavus* داخل المخازن المصغرة باستعمال خميرة *Pichia anomala* L_1, L_2

بينت نتائج تجربة نظام المخازن المصغرة (الشكل 21) لمكافحة *A. flavus* فعالية العزلة L_2 في خفض نمو الفطر مقارنة مع L_1 ، حيث كان نمو الفطر منعدم عند بداية التجربة ليبدأ في الارتفاع تدريجيا بعد اليوم الرابع حتى نهاية الحضن (12 يوم) ، لكنه بقي منخفضا مقارنة مع الشاهد طول فترة الحضن البالغة 12 يوم. أما الشاهد فقد انخفض نموه قليلا في بداية التجربة حتى اليوم الثامن ليبدأ في الإرتفاع تدريجيا حتى نهاية الحضن. و بالنسبة للعزلةL_1 فكان تأثيرها منخفض قليلا مقارنة مع L_2 حيث استطاعت خفض نمو الفطر مع بداية التجربة حتى اليوم الثامن لتنخفض فعاليتها قليلا عند اليوم العاشر لكن سرعان ما يعود تأثيرها مرة أخرى على نمو الفطر الذي ينخفض عند اليوم 12 من الحضن.





شكل (21): نمو فطر *A.flavus* في غياب و وجود عزلتي خميرة *Pichia anomala* L_1, L_2

الفصل الرابع
المناقشة

المناقشة

يسبب تلوث غذاء الدواجن بالفطريات خسائر كبيرة على الغذاء، كما يؤثر على صحة و إنتاج الدواجن، فهناك أكثر من 100 ألف نوع فطري تعد كملوثات طبيعية للغذاء والمنتوجات الزراعية. فغذاء الدواجن يعد وسط ملائم لنقل أنواع عديدة من الكائنات الحية أبرزها الأنواع الفطرية الممرضة، خاصة وأن الكثير منها يمكنه التأقلم مع النسب المنخفضة للرطوبة داخل الحبوب أثناء التخزين، وهذا ما يمكنها من إنتاج سمومها الفطرية الضارة والتي تسبب في حدوث عدة أمراض للدواجن (Mycotoxicosis) ينتج عنها ضعف المناعة و مقاومة الأمراض المعدية، مما يتسبب في مشاكل صحية عويصة (التقيؤ، ألم في البطن، تشنجات، تأثيرات سرطانية، نقص الشهية و غيرها) إضافة إلى خسائر اقتصادية كبيرة وانخفاض في الإنتاجية.

1- العزل و التشخيص

أوضحت النتائج التي توصلنا إليها في هذه الدراسة من خلال عزل وتشخيص الفطريات الملوثة لغذاء الدواجن وإجراء الفحص المجهري لتراكيب الفطريات المعزولة، كالغزل الفطري والتراكيب التكاثرية (الأبواغ) إضافة إلى مواصفات المستعمرات الفطرية من حيث اللون والخلفية والتركيب السطحي، أن الفطريات المعزولة تضم إلى فطريات الحقل والتخزين الممثلة في الأجناس الفطرية: *Trichoderma, Rhizopus ,Aspergilus, Penicillium* ، والتي تتسبب في تلوث العديد من المواد الزراعية والحبوب التي تدخل في تركيب الأعلاف الموجهة لتغذية الدواجن مثل: الذرة، القمح، فول الصويا والشعير وغيرها من المواد الأخرى. وقد مثل فطر *Penicillium* أكبر نسبة تلوث فاقت 74 %، حيث كانت سيطرته واضحة في جميع العينات الستة، ثم فطر*Aspergilus* بنسبة 20.3 % الذي ظهر بقوة في العينة الخامسة ممثلا في النوع *A. flavus* بنسبة تجاوزت 45 % أما فطري *Rhizopus* و *Trichoderma* فكانت نسبة تلوثهما في عينات غذاء الدواجن 1.70 % و 3.39 % على التوالي.

وقد يرجع سبب هذا الاختلاف في نسب التلوث إلى مصدر المكونات الداخلة في تركيب العينات أي مصدر المادة الأولية كحبوب القمح والذرة، هذا من جهة ومن جهة أخرى إلى ظروف تخزين هذه المواد باعتبار أن صوامع تخزينها موجودة في الخلاء ومعرضة للظروف المناخية المتغيرة من درجة حرارة ورطوبة.

وبينت معظم الأبحاث أن أغلب الفطريات الملوثة لغذاء الدواجن تنتمي في معظمها إلى الأجناس الفطرية *Aspergilus, Penicillium,* و *Fusarium*، ففي محافظة الدراق بمصر عزل الباحث ABO-SHAMA (2015) ثمانية أجناس فطرية على وسط PDA وعلى درجة حرارة 25°م و37°م ، سيطـــر فيها فطـــــري *Penicillium* و*Aspergillus* من حيث نسبة التلوث، ونفس النتيجة توصل إليها SALEEMI وآخرون (2010) من خلال الدراسة التي قاموا بها على119 عينة من أعلاف الدواجـــن بباكســـتان وDalcero وآخرون (1997) بالأرجنتين وكلا من Chuwang وآخرون (2013) و Okoli وآخرون (2006) بنيجيريا، إضافة إلى Simas وآخرون (2007) ، Rosa وآخرون (2006) اللذين وجدا نسبة تلوث كبيرة لغذاء الدواجن بفطري *Penicillium* و*Aspergillus* بالبرازيل.

أما فطري *Rhizopus* و *Trichoderma* فقد سجل عزلهما من عينات أعلاف الدواجن بالعراق حسب الدراسة التي قام بها الباحث Shareef (2010) على 45 عينة، كما شكل أيضا فطر*Rhizopus* نسبة تلوث تراوحت بين 40-62.68 % في عينات الدواجن التي تمت دراستـــها بصربيا ما بين عامي 2007-2008 (Krnjaja و آخرون، 2011). و في نيجيريا وحسب النتائج التي توصل إليها O scho وآخرون (2007) فإن فطر *Rhizopus* سجل أكبر نسبة تلوث قدرت ب 44 % على 50 عينة من غذاء الدواجن مقارنة مع فطري *A.flavus* (40%) و *Fuzarium spp.* (42 %).

2- الدراسة السمية

تتعرض معظم أنواع الحيوانات لحالات التسمم الأفلاتوكسين، خاصة الدواجن مسببة تأثيرات مرضية شديدة الخطورة، مما يؤثر على القدرة الإنتاجية للحيوانات مسببة خسائر اقتصادية كبيرة. إذ تتواجد هذه السموم في أعلاف الدواجن كونها أوساطا ملائمة لنمو الأعفان المنتجة لهذه السموم، لاسيما عند توفر الظروف الملائمة لذلك، كالحرارة و الرطوبة.

من أهم أسباب ارتفاع نسبة الأفلاتوكسين هو انتشار فطر *A. flavus* المنتج لهذا السم و قدرته على النمو في ظروف بيئية مختلفة، خاصة وأنه من فطريات التخزين التي تستطيع النمو على المحاصيل الجافة في مدى رطوبي يتراوح بين 13-18%. تفرز عزلات *Aspergillus* من النوع *A. flavus* العديد من السمـــوم الفطرية الخطيرة وعلى رأسها الأفلاتوكسينات.

فمن خلال هذه الدراسة تم عزل فطر *A. flavus* من عينات غذاء الدواجن المدروسة، إذ تبينت قدرته على إنتاج سموم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 إضافة إلى مشتق Sterigmatocystin وحمض beta-cyclopiazonique، وقد توافقت هذه النتائج مع العديد من الأبحاث التي تمت على غذاء الدواجن، فمعظمها أكدت تلوث أعلاف الدواجن بسم الأفلاتوكسين، ففي دراسة قام بها محمد عبد العباس وآخرون (2011) على 42 عينة من غذاء الدواجن وباستخدام تقنية ELISA تبين حدوث التسمم الأفلاتوكسين على 39 عينة (92.85 %) أين تراوحت كمية السم مابين 0.5-140.3 ميكروغرام/ كلغ وتجاوزت الحدود المسموح بها والمحددة من قبل منظمة الأغـــذية والأدوية الأمريكية (FDA) في 7 عينات (19.9%).

أما Karki و Sinha (2005) فقد أكدا سيطرة فطر *A.flavus* على تلوث غذاء الدواجن ، ووصلت كمية سم الأفلاتوكسين B_1 المنتجة من طرفه إلى 6334 ppb، في حين كان المعدل الأقصى المسموح به في غذاء الدواجن

ppb 1100. وتراوحت كمية الأفلاتوكسين B_1 في عينات غذاء الدواجن في دراســـة قام بها Delcero وآخرون (1997) بالأرجنتين ما بين 17-197 نانو غرام/غ. وبالعراق أظهر Sharreef (2010) بأن تراكيز السموم التي تم الكشف عنها في 45 عينة من أعلاف الدواجن وجدت بنسبة 91.1 % و بتركيز 179 ميكرو غرام/كلغ من سم الأفلاتوكسين. أما الأبحاث التي قام بها Setamou وآخرون (1997) على 18 عينة من حبوب الذرة بعد حصادها و التي تدخل ضمن تركيب أعلاف الدواجن، فبينت وجود سم الأفلاتوكسين على 30 % من العينات المدروسة الملوثة بفطر *A. flavus*. ووجد Krnjaja و آخرون (2017) أنه من بين 45 عينة من أعلاف الدواجن هناك 26.67% منها ملوثة بالفطريات المنتجة للسمـوم مثل *Penicillium,* 53.33 % *Aspergillus,* 44.44 % و *Fusarium* 73.33 % . وتأكد أيضا إنتاج عزلات من *A. flavus* لسم الأفلاتوكسين بمتوسط 2.685 ppb ضمن 44 عينة من أعلاف الدواجن حسب Vanesa و آخرون (2014).

لذا فالكشف المبكر عن تلوث الأعلاف بسموم الأفلاتوكسين من الأمور المهمة ، عن طريق استخدام طرق الكشف الدقيقة ذات الحساسية العالية، لاتخاذ الإجراءات اللازمة لتقليل مستوى التلوث وتثبيط النمو الفطري بحيث لا يتجاوز محتوى الرطوبة للحبوب الداخلة في تكوين أعلاف الدواجن أثناء حصادها 20-25.5 % ثم العمل على تجفيفها لتقليل المحتوى الرطوبي إلى أقل من 15.5% خلال يومين قبل نقلها وتخزينها. (محمد عبد العباس و آخرون، 2011).

3- المكافحة البيولوجية لفطر *A.flavus*

3-1- المكافحة البيولوجية باستعمال بكتيريا *B.megaterium*

تعتبر البكتيريا عاملا مهما في مجال المكافحة البيولوجية، خاصة منها جنسي *Bacillus* و *Pseudomonas* (Leoon وآخرون،2009). تضم بكتيريا *Bacillus أنواعا* كثيرة يدخل بعضها في مكافحة الحشرات مثل *B. thuringinisis* الواسع الاستعمال في هذا المجال، من خلال إنتاجها لبعض البروتينات البلورية (d-endotoxine) التي لها نشاطية خاصة في تخريب الخلايا المعوية لبعض الأنواع من الحشرات، مثل: النيماتودا وProtozoaires. بينما يدخل بعض الأنواع الأخرى في تثبيط النمو الفطري، أهمها *B. cereus* ذات النشاطية العالية في تثبيط نمو الفطريات البيضية (Oomycetes) بصفة خاصة (Hu و Boyer، 1996 و Silo-suh وآخرون، 1998) وإنتاجها لبعض الإنزيمات المحللة كإنزيم chitinase ضد الفطر الممرض *Fusarium solani* (El-hamshary ،Khttab، 2008)، يضاف أيضا النوع *B. subtilis* المعزول من التربة والمستعمل في مكافحة بعض الأمراض التي تصيب الفواكه، المتسببة عن فطريات *Phytophtora Alternaria* و *Fusarium* ، وفي تثبيط نمو فطر Botrytis بنسبة 70% المسبب للعفن الرمادي للتفاح. (Toure و آخرون، 2004)، إضافة إلى فعاليتها في تثبيط فطريات *Sclerotium rolfsii* و *Uromyces appendiculatus* الممرضة بنسبة 74% على مستوى الحقل (Nalisha و آخرون، 2006)، بينما أثبتت بكتيريا *B.brevis* فعاليتها ضد العفن الرمادي للكرنب عن طريق إفرازها لمركب gramicidin S (Swadling و Jefferies، 1998). أما بكتيريا *B.megaterium* المتميزة بسرعة النمو و التبوغ خاصة على مستوى المنطقة الجذرية، فقد تبين من خلال هذه الدراسة فعاليتها في تثبيط نمو فطر *A.flavus* مخبريا على الوسط الصلب PDA، وأدت إلى تخفيض نموه بنسب تراوحت بين 40.75 % و 47.56 % وذلك عند اختبارها بطرق مختلفة. حيث لوحظ أن هذه البكتيريا تؤثر بصفة جيدة سواء على نمو الغزل الفطري

في حالة زرع الفطر على شكل قرص، كما في طريقة Vincent وآخرون (1991) أو على الأبواغ الفطرية عند زرع الفطر على هيئة معلق بوغي كما في طريقة Arras (1993). و قد يعزى تأثير البكتيريا على الفطر لعدة عوامل،كالمنافسة على الغذاء وهذا بالنظر إلى غنى وسط التضاد PDA بالمواد الغذائية المختلفة، إضافة إلى إنتاج البكتيريا لمواد أيضية مضادة و فعالة.

وبالرغم من عدم حدوث اتصال أو تماس بين البكتيريا والفطر في وسط التضاد إلا أن نمو الفطر قد ثبط، وهذا ما يدل على أن البكتيريا منتجة لمواد أيضية مضادة، انتشرت عبر آجار الوسط وثبطت نمو الفطر، وهذا ما أشار إليه Landa وآخرون (1997) من خلال دراستهم على بعض عزلات *Bacillus* ضد فطر *Fusarium oxysporum.f.sp.ciceris*، خاصة وأن عوامل المكافحة البيولوجية التابعة لجنس *Bacillus* تتميز بإفرازها لعدد من المضادات الحيوية النشطة تمس عددا من الفطريات، على غرار فطر *A.flavus* حيث بين Kong و آخرون (2010) قدرة بكتيريا *B. megaterium* المعزولة من البحر الأصفر شرق الصين على تثبيط الفطر على وسط PDA والذي أرجع سبب هذا التثبيط إلى إفراز البكتيريا لعدد من المواد السمية المتراكمة في الوسط، أو إلى إنتاجها للمضادات الحيوية كالمضاد الحيوي Bacimithrine، الذي ثبتت نجاعته أيضا ضد بكتيريا Salmonilla typhimurium وStaphylococcus aureus ، أين عزل من بكتيريا *B. megaterium* عزلة 19 المعزولة من مخلفات الخضر المتخمرة حسب Khalil و آخرون (2009).

تم التوصل أيضا في هذه الدراسة إلى مدى تأثير الرشاحة البكتيرية على نمو العزل الفطري لفطر *A. flavus* على مدى فترة الحضن البالغة 9 أيام. أين كانت فعاليتها كبيرة بعد 6 أيام من الحضن وهذا من خلال قياس الوزن الجاف للميسيليوم، مما يدل على إنتاجها لمستقلبات مثبطة خارج خلوية في الوسط المرشح، أثرت على كمية الغزل الفطري للفطر مقارنة مع الشاهد. وقد توافقت هذه النتيجة مع تلك المتحصل عليها من طرف

Swadling و Jefferies (1998) باستخدامهما للرشاحة البكتيرية لعزلة *B. pumilus* ضد فطر *Botrytis cenerea*. كما وصلت نسبة تثبيط فطر *R. solani* إلى 93.3 % بعد إضافة رشاحة بكتيريا *B. megaterium* عزلة B 153-2-2 إلى وسط النمو (Bertagnolli و آخرون، 1996). و اعطى استعمال رشاحة بكتيريا *B. subtilis* فعالية جيدة في كبح حدة مرض سقوط البادرات لنبات الطماطم المتسبب عن فطر *R. solani* (Fiddaman و Rossal، 1993).

3-2- المكافحة البيولوجية باستعمال خميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2

تعد الخمائر من أهم الكائنات المستعملة في المكافحة البيولوجية، لقدرتها على النمو السريع و التأقلم مع المحيط و البقاء نشطة لمدة طويلة تحت ظروف بيئية متغيرة وكمية محدودة من الغذاء وعدم إنتاجها للأبواغ إضافة إلى قدرتها على تثبيط نمو الطريات الممرضة باستعمال عدة آليات للمكافحة البيولوجية.

طبقت الخمائر بدرجة كبيرة ضد أمراض ما بعد الجني للعديد من الخضر والفواكه، مقارنة مع تطبيقها أثناء التخزين، واستعملت العديد منها كعوامل مكافحة فعالة ضد العديد من الأمراض الفطرية المتسببة عن فطريات *Botrytis cinerea* و *Penicillium sp.* التي تصيب التفاح، الخوخ، الإجاص، الفراولة والليمون.

وخلال السنوات الأخيرة تم تطوير العديد من هذه الخمائر لاستعمالها كمبيدات بيولوجية، كخميرتي *Candida oleophila* و *C.sake* المتداولة تجاريا تحت اسم BioNext و Candifruit على التوالي.

و من بين أهم الأجناس المستعملة في المكافحة البيولوجية نجد جنس *Pichia*، الذي يضم العديد من الأنواع التي اثبتت نجاعة و فعالة في تثبيط نمو أهم الفطريات الممرضة، و التي أبرزها خميرة *P. membranifâciens*

ضد فطر *B. cinerea* على جروح ثمار التفاح (Santos وآخرون،2004). وخميرة *P.albicans* ضد مرض البياض الدقيقي المتسبب عن *Cercospora bitcola* الممرض لنبات قصب السكر بمصر. (Zeidan و Farrag، 2011).

من خلال هذه الدراسة أثبتت خميرة *P. anomala* فعاليتها في مكافحة فطر *A. flavus* ، حيث تم عزل عزلتين من الخميرة L_1 و L_2 من عينات غذاء الدواجن وشخصت بالاعتماد على الخصائص المظهرية والمجهرية والبيوكيميائية على أنها *P. anomala* ، وتبينت قدرتها على تثبيط نمو *A. flavus* مخبريا على الوسط الصلب PDA حيث استطاعت تخفيض نموه بنسب تراوحت ما بين 72.22 % و77.78 % خاصة بالنسبة للعزلة L_2 وقد وجد نفس التأثير التثبيطي خلال مكافحة عدة فطريات ممرضة باستعمال *D. hansenii* التي استطاعت تخفيض معظم هذه الفطريات بنسب تثبيط وصلت إلى أكثر من 98.3 %، وقد يفسر تأثير الخميرة على كبح نمو الفطر لعدة عوامل أبرزها: المنافسة على الغذاء والمكان والتي تعد من أهم الآليات التي تستخدمها الخمائر في المكافحة البيولوجية، خاصة على مصادر الكربون العضوي الذي يعد عاملا مهما لنشاط الخمائر، وهذا ما أشار إليه الباحث Druvefors (2005) من خلال تجاربه على *P. anomala* J121 ضد فطر *P. roqueforti* على حبوب الذرة المخزنة، وكذا الباحثين Spadaro و Droby (2015) بالنسبة لخميرتي *P. guilliermondii* و *P aliophila*. ضد فطر *B. cinerea*.

كما تأكد أيضا في هذه الدراسة، قدرة خميرة *P. anomala* عزلة L_1 و L_2 على إنتاج مركبات طيارة مضادة للفطريات كانت اها فعالية مهمة جدا في كبح نمو فطر *A. flavus* بحست خفضت نموه القطري من 71.66 ملم (الشاهد) إلى 26.66 ملم، بنسبة تثبيط تراوحت بين 60.95 % و 61.90%. وتأكد العديد من الدراسات على إنتاج الخمائر لهذا النوع من المركبات الطيارة التي يتم إمتصاصها عبر الغشاء الخلوي للفطريات محدثة خللا في نفاذيته. كما ثبت تأثيرها على نمو الميسيليوم وإنتاش الأبواغ لدى العديد من الفطريات المعزولة من

أغذية متنوعة. (Medina و آخرون، 2016). ووجد Masoud و آخرون (2005) أن الخمائر التابعة لـ Sacharomycetales منتجة لمركبات طيارة متمثلة في: 2 phenyl acetate, acetate, ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate.، ثبت تثبيطها لنمو عزلات Aspergillus. ومن بين الآليات التي تعتمدها الخمائر أيضا في المكافحة البيولوجية، إنتاج الإنزيمات المحللة النشطة في تحليل الجدار الخلوي للفطريات بدرجة كبيرة.(Liu وآخرون، 2013).وأكدت هذه الدراسة قدرة خميرة*P. anomala* في إنتاج عدة إنزيمات محللة، أهمها: Amylase ,Chitinase،Cellulase حيث كان هناك فرق معنوي كبير جدا بين عزلتي الخميرة، إذ سجل أكبر قطر إنتاج لإنزيم Cellulase لدى العزلة L_2 (40.00 ملم) مقارنة مع العزلة L_1 (30.75 ملم)، وأقل إنتاج كان لإنزيم Amylase الذي لم يتجاوز 6 ملم. وأشار Jijakli و Lepoivre (1998) أن خميرة *P. anomala* عزلة K و المعزولة من سطح ثمار *التفاح* كافحت فطري فطر *B. cinerea* و *Penicillium spp.* بإنتاجها لإنزيم beta-1,3-glucanase، الذي يعمل على تحليل الجدار الخلوي للفطرين بعد توضع خلايا الخميرة على هيفا الفطر الممرض.

3-2-1- السموم القاتلة لدى خميرة *P. anomala*

تمتاز الخمائر التابعة لجنس *Pichia* بقدرتها على إنتاج السموم القاتلة، وهذا ما أثبت في هذه الدراسة مع *P. anomala* على وسط MBA عند درجة حرارة 20°م ودرجة حموضة 4.5، حيث سجل إنتاج السموم القاتلة لدى العزلة L_2 بظهور منطقة تثبيط شفافة حول مستعمرة الخميرة عكس العزلة L_1. وتأكد ذلك بعد تقدير النشاطية القاتلة للسموم، حيث سجل فرق معنوي كبير بين العزلتين، أين كانت نسبة النشاطية القاتلة للعزلة L_2 كبيرة جدا على الفطر إذ خفضت نموه بنسبة فاقت 71 % مقارنة مع العزلة L_1 التي وصلـــت إلى 14.18% . وللإشارة فإن هناك دراسات قليلة جدا تشير إلى استعمال الخمائر المنتجة للسموم في مكافحة الفطريات الممرضة والتي من بينها تلك التي قام بها Walker وآخرون (1995) باستعمال خمائر *P. anomala* عزلة NCYC Y35

و *P. membranifâciens* و 28 *S. cerevisiae* في تثبيط نمو بعض الفطـــريات الممرضـــة والمتمثلة في: *B. cinerea, R. solani, Ophiostoma ulmi*.

3-2-2- تثبيط فطر *A.flavus* داخل المخازن المصغرة

اختبر تأثير خميرة *P. anomala* (L_1 و L_2) على تثبيط نمو فطر *A. flavus* مباشرة في أماكن تخزين غذاء الدواجن والتي كانت عبارة عن مخازن مصغرة (أنابيب اختبار) .وبينت النتائج تأثير الخميرة في خفض نمو الفطر خاصة العزلة L_2 ، حيث انعدم نمو الفطر في بداية التجربة، ليبدأ في الارتفاع تدريجيا بعد اليوم الرابع وحتى نهاية الحضن (12 يوم)، والذي قد يفسر إلى حدوث صدمة على الأبواغ بعد استقرارها على سطح غذاء الدواجن، وهذا ما لوحظ مع الشاهد الذي انخفض نموه قليلا في بداية التجربة حتى اليوم الثامن ليبدأ في الارتفاع تدريجيا حتى نهاية الحضن. وقد يفسر انخفاض نمو *A. flavus* في وجود عزلتي خميرة *P. anomala* (L_1 و L_2) إلى آليات التثبيط المطبقة من طرف الخميرة أثناء تواجدها الفطر كالمنافسة على الغذاء والمكان من جهة و إنتاج الإنزيمات المحللة والمركبات الطيارة المضادة للفطريات من جهة أخرى، والتي أكدتها هذه الدراسة من خلال الإختبارات السابقة والنتائج الجيدة المتحصل عليها، والتي توافقت مع النتائج التي توصل إليها Druvefors (2005)، من خلال تجربته التي طبقها مع خميرة *P. anomala* عزلة 21 ضد فطر *P. roqueforti*، حيث لاحظ انخفاض في نمو الفطر في بداية التجربة خلال 48 سا الأولى، ليزداد النمو تدريجيا بعد ذلك، وأشارت الباحثة عبير هاشم مصطفى (2015)، أن إضافة الخمائر إلى غذاء الدواجن يحسن من التمثيل الغذائي للألياف التي تدخل ضمن تركيب الأعلاف ، و التي لا يمكن هضمها إلا من خلال الهضم الميكروبي، إضافة إلى قدرة الخمائر على تنظيم التوازن البيئي لأمعاء الحيوانات و تـــقوية المناعة و تعزيز الهضم و الإمتصـــاص و بالتالي تحسين الإنتـاج الحـــيواني

وجودته.كما أوضحت العديد من الدراسات الغذائية أن إضافة الخميرة إلى أعلاف الدواجن بمعدل 2-3 مم/كلغ يؤدي إلى:

- تحسين معدلات النمو وكفاءة التحول الغذائي.\شض
- تحسين تمثيل العناصر الغذائية.
- تأثير مثبط وسام ضد الكائنات الدقيقة الممرضة.

وأضافت أيضا أن احتواء الخمائر ومستخلصاتها على بعض المواد المضـــــــادة للأكسدة مثـــــل: dismutase superoxide يعمل على نزع الجذور الحرة من الدورة الدموية للجسم، كما أن مركب المنان(mannan) الموجود في الخميرة يحسن من الاستجابة المناعية عن طريق إفراز الأنترلوكين-6، و ينبهه إفراز specific binding protein من الكبد، والذي يقوم بالارتباط مع كبسولات البكتيريا المهاجمة.أما مركب الغلو كان الموجود في الجدار الخلـــــــوي للخميرة فله دور كبير في تنبيه المستقبلات المتخصصة الموجودة على كريات الدم البيضاء مما يؤدي إلى زيادة الدفاع عن طريق زيادة عدد البالعات.

الخاتمة

الخاتمة

تمكنا من خلال هذه الدراسة، عزل الفطريات الملوثة لعينات غذاء الدواجن التي جلبت من المجمع الشرقي للدواجن بالعلمة، ولاية سطيف، حيث تم تشخيصها و التعرف عليها و تحديد نسب تلوثها في كل عينة، كما تم أيضا الكشف على قدرة أهم الفطريات الملوثة في إنتاج السموم الفطرية التي تشكل خطرا كبيرا على صحة الإنسان والحيوان، والتي لم تقتصر على سم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 بل شملت أيضا حمض beta – cyclopiazonique. كما بينت هذه الدراسة أيضا فعالية آلية المكافحة البيولوجية في تثبيط فطر *Aspergillus flavus* (أهم الفطريات المعزولة من عينات غذاء الدواجن) على مستوى المخبر من خلال مكافحته ببكتيريا *Bacillus megaterium* و خميرة *Pichia anomala* عزلة L_1 و L_2 المعزولة من غذاء الدواجن، مما يوحي بأن تكون هناك دراسات أخرى وبحوثا أكثر تعمقا في هذا المجال من خلال بذل جهودا أكبر من أجل تجسيد التطبيق الفعلي لعوامل المكافحة البيولوجية، خاصة منها الخمائر كونها آمنة وغير مضرة وغير منتجة لسموم ومواد تأثر على صحة الإنسان والحيوان، لذا لا بد من:

- تعميق الدراسة المخبرية للكشف عن آليات تأثيرها.
- دراسة المواد الفعالة المثبطة التي تفرزها،خاصة السموم القاتلة وذلك بالتعرف عليها وتشخيصها باستعمال التقنيات الحديثة.
- التطبيق الفعلي على مستوى أماكن التخزين على هيئة مبيدات بيولوجية، والاستفادة منها تجاريا لتقليص الخسائر الاقتصادية وخفض التلوث والقضاء نهائيا على التلوث الفطري للأعلاف.

المراجع

المراجع باللغة العربية :

*رشا محمد الميهي.(2014). محاضرات في السموم الميكروبية في الأغذية والأعلاف. كلية الزراعة. جامعة بنها. فرع الميكروبيولوجيا الزراعية. 91 صفحة.

*الزميتي محمد السعيد صالح. (1997). تطبيقات المكافحة المتكاملة للآفات الزراعية. الطبعة الأولى. دار الفجر للنشر و التوزيع. مصر. 455 صفحة.

*سعدية ياسر الحبوري. (2006). عزل وتشخيص الفطريات الملوثة لعلف وفرشة الدواجن. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري. المجلد 5. العدد 1.

*عبير هاشم مصطفى. (2015). المجالات المختلفة لاستخدام الخميرة. مجلة أسيوط للدراسات البيئية. العدد 42.

*عمرو عبد الرحمان.(2001). الأحياء الدقيقة وفساد الأغذية. مكتبة المعارف الحديثة. صفحة: 44-53.

*محمد عبد العباس، ملاغي، كريم ناصر، طاهر، فلاح و حسين عبد اللطيف. (2011). تلوث أعلاف فروج اللحم بسموم الأفلاتوكسين في بعض حقول مدينة الديوانية. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري. المجلد 10. العدد 1.

*ناهد محمد وهبه، نيفين عبد الغني النسر. (2010) السموم الفطرية في الألبان ومنتجاتها (الخطر والوقاية).مجلة أسيوط للدراسات البيئية. العدد الرابع و الثلاثون.

*وصفي عمادالدين. (1993). أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية. صفحة: 345-350.

المراجع باللغة الأجنبية

Abo–Shama, **U**. **H**. (2015). The investigation of pathogenenic fungi in poultry feed in some selected poultry farms in Sohag Governorate, Egypt. **J**.**Microbiol**. **Biotech**.**Res**. 5(6):1–8.

Amoozegar, **M**. **A**.**; Malekzadeh**, **F**. **and Malik**, **K**.**A**. (2003).Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus sp*.strain M A–2.**J**.**Microbiol**. **Methods**,52:353–359.

Arras, **G**. (1993). Inhibition of postharvest fungal pathogens by *Bacillus subtilis* strains isolated from citrus fruit. **Adv**. **Hout**. **Sci**., 7:123–127.*

Asaka, **O**. **and Shoda**, **M**. (1996). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping– off of tomato with *Bacillus subtilis* RB 14. **Appl**. **Environ**. **Microbio**l., 5: 4081–4085.

Asselineau, **J**. **et Zalta**, **J**. (1973). Les antibiotiques structure et exemples de mode d'action. **Hermann**, **Paris**, 364 P

Banjara, **N**. (2014). *Debaryomyces hansenii*: A food borne yeast that produces anti–candida killer toxin. **Food Sci**. **and Tech**., 19–21.

Banjara, **N**.**; Nickerson**, **K**. **W**. .**; Suhr**, **M**. **J**. **and Hallen–Adams**, **H**. **E**. (2016). Killer toxin from several food–derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeast. **Inter**. **Journal of Food Microbio**. 222: 23–29.

Bartagnolli, **B**.**L**., **Dal Saglio**, **F**.**K**. **and Sinclair**, **J**.**B**. (1996). Extracellular enzyme profiles of the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* isolate 2B–12 and two antagonistic *Bacillus megaterium* strain B153–2–2 and *Trichoderma harzianum* insolate TR 008.I. possible correlation with inhibition of growth and biocontrol. **Physio**. **and Mol**. **Plant Patho**., 48:145–160.

Bertagnolli, **B**.**L**.**; Daly**, **S**. **and Sinclair**, **B**. (1998). Antimycotic compounds from the plant pathogen *Rhizoctonia solani* and its antagonist *Trichoderma harzianum*. **Phytopath**. 146: 131–135.

Boland, **G**.**J**. **and Kuykendall**, **L**.**D**. (1998). Plant– microbe interactions and biological control. **Marcel Dekker**, **INC**. pp: 171.

Botton, **B**.**; Breton**, **A**.**; Fere**, **M**.**; Gauthir**, **S**.**; Larpent**, **J**.**P**.**; Gay**, **P**.**; Reymond**, **P**.**; Sanglier**, **J**.**Y**.**; Vayssier**, **Y**.**and Veau**, **P**. (1990). Moisissures utiles et nuisible, importance industrielles, **2eme ed**. **Masson**, **Paris**, 512 P.

Buzzini, **P**. **and Martini**, **A**. (2001). Larrage–scale screening of selected *Candida maltose, Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. **Med**. **Myco**., 39: 479–482.

Cappuccino, **J**. **C**.**; Sherman**, **N**. (2010).Microbiology: A Laboratory Manual. **Ninth Edition**, **Benjamin**/**Cummings Publishing**. **Co; New York**, 125–179.

Chalutz, **E**. **and Wilson**, **C**. **L**. (1990). Posthaverest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruits by *Debaryomyces hansenii* **Plant Dis**., 74: 134-137.

Chang-Yen, **I**. **and Bidassee**, **K**. (1992). Mycoflora and mycotoxins- producing potential of fungi from poultry feeds and feed ingredients in

Chi, **F**. **and Broomhead**, **J**. (2008). Mycotoxins and poultry. **Amlan International**. **Chicago**, **USA**.pp:1-10.

Chuwang, **C**. **S**.**; Ojonugwa**, **A**. **G**. **; Adrew**, **T**. **D**. **; Unata**, **I**. **M**. **; Victoria**, **T**. **; Doris** , **I**. **C**. **and Okwori**, **A**. **J**.(2013). Potential public health hazard of the mycoflora poultry litter in some selected poultry farms in Jos, Nigeria. Asian. **J**. **Sci**. **and Tec**. 4(4):64-66.

Dalcero, **A**.**; Magnoli**, **C**.**; Chiachiera**, **S**.**; Palacios**, **G**. **and Reyonoso**, **M**. (1997).Mycoflora and incidence of aflatoxins B_1 , zearalenone and detoxynivalenol in poultry feeds in Argentina.**Mycopathologia**. 137:179-184.

Davis, **N**. **D**.**; Diener**, **U**. **L**. **and D**. **W**. **Eldriger**. (1966).Production of aflatoxin B_1 and G_1 by *Aspergillus flavus* in a semi synthetic medium.**Appl**.**microbiol**. , 14:378-380.

Davis, **N**. **D**.**; S**. **K**.**; Lyer**, **and U**. **L**. **Diener**.(1987).Improved method of screening for aflatoxin with coconut agar medium.**Appl**. **Environ**. **Microbiol**. , 53:1593-1595.

Dolej, **S**. **and Bochow**, **H** (1996). Studies of the mode of action of *Bacillus subtilis* culture filtrates in the model pathosystem tomato seedling- *Fusarium oxysporum* F.sp. *radicis lycopersis* **Med**. **Fac**. **Ladboww**. **Univ**.**Gent**., **61/2b** 483-490.

Druvefors,**U**. **A**.**; Passoth**, **V**. **and Schnurer**, **J**. (2005). Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Picha anomala* J 121 during airtight storage of wheat.**Appl**. **Environ**. **Microbiol**. , 71(4):1865-1869.

El-Ghaouth, **A**.**; Smilanick**, **J**. **L**.**; Wisnieroski**, **M**. **and Wilson**, **C**.**L**. (2000_a). Improved control of apple and citrus fruits decay with a combination of *Candida saitoana* and 2-deoxy-D-glucose. **Plant Dis**., 84:249-253.

Fiddaman, **P**.**J**. **and Rossal**, **S**. (1993). The production of antifungal volatives by: *Bacillus subtilis*. **J**. **Appl**. **Bacteriol**, 74 (2): 119-126.

Filtenborg, **O**. **and J**. **C**. **Frisvad**.(1983).Classification of *Terverticillate Penicillia* based on profiles mycotoxins and other secondary metabolites.**App**. **Microbiol**. **Environ**. , 46: 1301-1310.

Ghaemmaghami, **S**. **S**. **; Modirsaneii**, **M**. **; Khosravi**, **A**. **R**. **; Abyaneh**, **M**. **R**.(2016). Study on mycoflora of poultry feed ingredients and finished feed in Iran. **Iranian J**. **of Microbiol**. 8(1):47-54.

Gregory, **S**.**G**.**; Handelsman**, **J**. **and Parke**, **J**.**L**. (1994). Root camouflage and disease control. **Phytopath**. , 84: 222-224.

Hadidane,**R**. **C**. **R**.**; Regnault**, **H**. **Bouatour; F**. **Ellouzi; H**. **Bacha; E**. **E**. **Crepy**, **and G**. **Dirkeimer**. (1985). Correlation between alimentary Mycotoxins contamination and specific disease. **Hum**. **Tox**. 4:491-501.

Hermandez- Montiel, **L**. **G**.**; Holguim-Pena**, **R**. **J**.**; Larralde-Corna**, **C**.**P**.**; Zulueta-Rodriguez**, **R**.**; Rueda-Puente**, **E**. **and Moreno-Legoveta**, **M**. (2012). Effect of inoculums size of yeast *Debaryomyces hansenii* to control *Penicillium italicum* on Mexican lime (*Citrus aurantii folia*) during storage. **J**. **of Food**, 10(3): 235-242.

Hermandez-Montiel, **L**. **G**. **; Ochoa**, **J**.**L**. **; Troyo-Dieguez**, **E**. (*Penicillium italicum Wehmer)* on Mexican lime marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. **Posthar**. .**Bio**. **and Tech**., 56: 181-187.

Hu, **X**. **and Boyer**, **G**. **L**. (1996). Siderophore-Mediated Aluminium Uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. **App**. **And Enviro**. **Microbio**., (62): 4044-4048

Iheanacho, **H**. **E**.**; Njobeh**, **P**. **B**.**; Dutton**, **F**. **M**.**; Steenkamp**, **P**. **A**. **;Steekamp**, **L**.**; Mthombeni**, **J**. **Q**.**; Daru**, **B**. **H**.**; Makum**, **A**. **H**. (2014). Morphological and molecular identification of filamontohs *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolated from compounds feeds in South Africa .**Food Microbiol**. 44: 180-184.

Janisiewricz, **W**.**J**. **and Roitman**, **J**. (1988). Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with *Pseudomonas cepacia*. **Phytopath**., 78: 1697-1700.

Janisiewicz, **W**. **and Yourman**, **L**. (1991). Postharvest control of blue mold and gray mold of apples and pears by dip treatment with pyrrolnitrin, a metabolite of *Pseudomonas cepacia*. **Plant Dis**., 75: 490-494

Janisiewicz, **W**. **J**. **and Marchi**, **A**. (1992). Control of storage rots on various pear cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringie*. **Plant Dis**., 76:555-560.

Janisiewicz, **W**.**J**. (1994). Enhancement of biological control of blue mold with the nutrient analog 2- deoxy- D- glucosc on apples and pears. **American Society for Micro**., 60: 2671-2676.

Janisiewicz,**W**. (1996). Ecological diversity, niche everlopy, and coexistence of antognists used in developing mixtures for boicontrol of postharvest disease of apples. **Phytopath**., 86: 473-479.

Janisiewicz, **W**.**J**. (1998). Biocontrol of postharvest disease of temperate fruits challenges and apportumities. ***In***: G.J. Boland (ed), Plant-microbe interactions and biological control. **Marcel Dekker**, **INC**. **New York**, pp: 171-198.

Janisiewicz,**W**. (2001). *Pseudomonas syringae* (saprophytic strain) and fruit yeasts **Bio**. **Con**., pp: 1-4.

Karbi, **T**.**B**. **and Sinha**, **B**.**P**. (2005). Contamination of foods in Nipal.**Central Food Reseach Laboratery**.pp: 1-6.

Khalil, **R**. **; Elbahloul**, **Y**. **; Djadouni**, **F**. **and Omar**,**S**. (2009). Isolation and partial caractérisation of a bactériocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. **Pakistan J**. **of Nut**. 8: 242-250.

Kong, **Q**.**; Shan**, **S**. **; Liu**, **Q**. **; Wang**, **X**. **and Yu**, **F**. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium.* **Int**. **J**. **Food Microbial**. 139: 31-35.

Koomen, **I**. (1997). Biological control of posthaverest diseases on fruit. Posthaverest **News and Information**, 8: 33-37.

Koomen, **I**. **and Jeffries**, **P**. (1993). Effects of antagonistic micro-organisms on the posthavrest developmment of *Colletorichum gleosporioides* on mango. **Plant Patho**., 42: 230-137.

Krebs, **B**.**; Hoding**, **B**.**; Kubart**, **S**.**; Workie**, **M**. **A**.**; Schmirde**, **G**. **K**.**; Grosch**, **R**.**; Bochow**, **H**. **and Hevesi**, **M**. (1998). Used of *Ba*cillus *subtilis* as biocontrol agent-1. Activities and characterization of *Ba*cillus *subtilis* strains. **J**. **of Plant Dis**. **and Protec**., 105(2): 181-187.

Krnjaja, **V**.**; Stojanovic**, **L**. **Trenkwski**, **S**.**; Bijelic**, **Z**. **and Tomasevic**, **D**. (2011). The frequency of pathogenic fungi genera in poultry feed. Macedonia. **J**. **of Animal Sci**. 1(1):187-190.

Landa, **B**.**B**., **Hervas**, **A**., **Bettiol**, **W**. **and Jiménez-Diaz**, **R**.**M**. (1997). Antagonistic activity of Bacteria from the chinch pea Rhizospher against *Fusarium oxysporum* F.sp. *ciceris*. **Phytoparasitica**, 25 (4): 305-318.

Larpent, **J**. **P**. (1997). Mémento technique de microbiologie. **Tec et Doc Lavoisier**. **Paris**, 224-226.

Leclerc, **H**. **and Mossel**, **D**.**A**.**A**. (1989). Microbiologie de tube digestif, l'eau et les aliments. **Ed**, **Paris**, pp: 115-117.

Lillbro,**M**. (2005). Biocontrol of Penicillium *roqueforti* on grain-a comparison of mode of action of several yeast species.**Swedish Univer**. **of Agri**. **Sci**., **Uppsala**, **Sweden**: **7**-21.

Liu, **J**. **; Sui**, **Y**. **; Wisniewski**, **M**. **; Droby**, **S**. **and Liu**, **Y**. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruits.**Int**. **J**. **of Foo**.**Microbiol**. , 167: 53-160.

Marquina, **D**. **; Santos**, **A**. **and Peinado**, **J**.**M**.(2002). Biology of killer yeast.**Inter**. **Microbio**., 5: 65-71.

Masimango, **N**.; **J**. **T**. **Ramaunt**, **and J**. **Remacle**.(1977). Production de l aflatoxine B_1 *in vitro* en fonction de déverse condition de culture. **Ann**. **Nutr**. **Alim**., 31 : 583-605.

Mazza. (1983).Rapid assay for detection of microorganisms producing DNA- damping metabolites.**Appl**. **Environ**. **Microbial**. 45:1949-1952.

Media-Cordova, **N.; Ascencio**, **F**. **and Angulo**,**C**. (2016) Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against photogenic fungi and ability to inhib mycotoxins production in maize grain (*Zea mays L.)* **Bio**. **Con**., 97: 70-79.

Mekbib, **S**. **B**. **; Thierry**, **J**.**C**.**R**. **and Korsten**, **L**. (2011). Effecacy and mode of action of yeast antagonistic for control of *Pinicillium digitatum* in oranges **Trop**. **Plant Path**., 36(4): 233-240.

Mercier, **J**. **and Wilson**, **C**.**L**. (1994). Colonization of apple wounds by naturally occurring mycoflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infections by *Botrytis cinerea* during storage. **Bio Cont**., 4:138: 144.

Milus, **E**.**A**. **and Rothroch**, **C**.**S**. (1997). Efficacy of bacterial seed treatments of controlling *Phythium* root rot of winter wheat. **Plant Dis**. 81: 180-184.

Morrison, **D**. **M**. **; Ledoux**, **D**. **R**. **; Chester**, **L**. **B**. **F**. **and Samuels**, **C**. **A**. **N**.(2017). A Limited survey of aflatoxins in poultry feed and feed ingredients in Guyana. Veterinary Sciences. 4(60):1-7.

Nalisha, **I**. **; Muskhazli**, **M**. **and Nor Frizan**, **T**. (2006). Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. **Malaysian J**. **of Microbiol**., 2(2): 19-23.

Nunes, **C**.**A**.**; Manso**, **T**. **and Lima-Corta**, **M**. **E**. (2009). Postharvest biological control of citrus fruit Tree and Forestry **Sci**. **and Biotech**. 3: 116-126.

Okoli, **I**.**C**.**; Nweke**, **C**.**U**.**; Okoli**, **C**. **G**. **and Opara**, **M**.**N**.(2006). Assessment of the mycoflora of commercial poultry feeds sold in the humid tropical environment of Ino State, Nigeria.**Int**. **J**. **Environ**.**Sci**. **Tech**. 3(1):9-14.

Osho, **I**. **B**. **; Awoniyi**, **T**. **A**. **M**. **; Adebayo**, **A**. **I**. (2007). Mycological investigation of compounded poultry feeds used in poultry farms in South West. Negeria. **African J**. **of Biotech**.. 6(15):1833-1836.

Osho, **I**.**B**.**; Awoniyi**, **T**.**A**.**M**.**; Adebayo**, **A**.**L**. (2007). Mycological investigation of compounded poultry feeds used in poultry farms in South West Nigeria. **African**. **J**. **Biotech**. 6(15):1833-1836.

Parveen, **R**.**M**. **and Begum**, **J**. **A**. (2010). Production and effect of killer toxin by *Saccharomyces cerevisiae* on sensitive on sensitive yeast and fungal pathogens. **Inter**. **J**. **of Pharm**. **Sci**. **Rev**. **and Res**., 3(1): 127-129.

Parveen, **S**. **; Wani**, **A**.**H**. **; Bhat**, **M**.**Y**. **and Koka**, **J**.**A**. (2016). Biological control of postharvest fungal rots of rosaceous fruits using microbial antagonists and plants extracts. **Czech**. **Myc**. 68: 41-66.

Parviz, **M**. **; Saatloo**, **N**. **V**. **; Rezaei**, **M**. **; Reezapor**, **I**. **and Assadi**, **A**. (2014). Fungal contamination of feed material manufactured in Iran with emphasis on its importance in safety of animal origin foods. **J**. **Food Quality and Hazards Control**. 1:81-84.

Patterson, **D**. **S**. **P**. (1977). Metabolic activation and detoxification of Mycotoxins. **Ann**. **Nutr**. **Alim**. 31:901-910.

Pimenta, **R.; Silva**, **F**. **L.; Silva**, **J**. **F**. **M.; Morais**, **P**. **B.; Braga**, **D**. **T.; Rosa**, **C**. **and Correa**, **J**. **A**. (2008). Biological control of *Penicillium italicum, P. digitatum* and *P.expansum* by the predacious yeast *Saccharomyces schvenii* on oranges. **Brazilian J**. **Microbio**., 89: 85-90.

Pitt, **J**. **I.; A**. **D**. **Hocking**, **and D**. **R**. **Glenn**. (1983).An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **J**. **Appl**. **Bacteriol**., 54:109-114.

Pleadin, **J**. (2015). Mycotoxins in grains and feed – contamination and toxic effect in animals. **Biotec**. **In Animal Husbandry**. 31(4):441-456.

Prashar, **P.; Kapoor**, **N.; Sachdera**, **S**. (2013). Isolation and characterization of *Bacills sp.* With *In-vitro* antagonistic activity against *Fusarium oxysporium* from rhizosphere of tomato. **J**.**Agr**.**Sci**.**Tech**, 15: 1501-1512.

Renwick, **A.; Campbell**, **R**.**and Coe**, **S**. (1991). Assessment of *in vivo* screenings systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*.**Plant Pathol**. (40):523-532.

Rosa, **C**. **A**. **R.; Ribeiro**, **J**. **M**. **M**. **; Fraga**, **M**. **J**. **; Gatti**, **M**. **; Cavaglieri**, **L**. **R; Magnoli**, **C**. **E.; Delcero**, **A**. **M**. **and Lopes**, **C**. **W**. **G**. (2006). Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin- producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiol**. 113: 89-96.

Rosales, **A**.**M; Thomashow**, **L**., **Cook**, **R**.**J**. **and Mew**, **T**.**W**. (1995). Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice- associated antagonistic *Pseudomonas* spp. **Phythopat**., 85:1028-1032.

Saleemi,**M**. **K**. **;Zargham Khan**,**M**. **; Ahrar**,**K**. **and Javed**,**I**.(2010). Mycoflora of poultry feeds and Mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species.Park.**J**.**Bot**.42 (1):427-434.

Salwa, **A**. **A**. **and Anwer**, **W**. (2009). Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxinB_1, residues in table eggs. **Pakistan J**. **of Nut**.. 8(2): 181-186.

Santos, **A**. **; Sanchez**, **A**. **and Marquina**, **D**. (2004). Yeasts as biocontrol agents to control *Botrytis cinerea*. **Microbiol**. **Res**., 159: 331-338.

Schnider, **K**.**U**.**; Seematter**, **A**., **Maurhofer**, **M**. **and Blumer**, **C**. (2000). Antoiducton of 2, 4- diacetyl phloroglucinol (2.4-DAPG) biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescence* CHA and repression by the bacterial metabolites salicylate and pollution. **J**. **Bacteriol**., 182 (5): 1215 -1225.

Scott, **P**. **M**.**; W**. **V**. **Walbeek**, **B**. **Kennedy**, **and D**. **An yeti**. (1972). Mycotoxins (ochratoxin A, Citrinin and sterigmatocystin) and toxigenic fungi in grain and other agricultural products. **Agro and Food Chem**., 20: 1103-1109.

Setamo,**M**.**; Schulthess**, **F**. **; Cardwell**, **K**. **F**. **and Hell**, **K**. (**1997**). *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of postharvest Maize in Benin. **Plant Dis**. 18: 1323-1327.

Shareef, **A**. **M**. (2010). Molds and Mycotoxins in poultry feed from farms of potential Mycotoxins. **Iraq J**. **veterinary Sci**. 20(1):17-25.

Sharifazizi, **M**. **; Harighi**, **B**. **and Sadeghi**, **A**. (2017). Evaluation of biological control of *Erwinia amylovora,* causal agent of fire blight disease of pear by antagonistic bacteria. **Bio**. **Con**. 28-34.pp.

Sharma,**A**.**; Diwevidi**, **V**. **D**. **; Singh**, **S**. **Pawar**, **K**. **K**. **; Jerman**, **M**. **; Singh**, **L**. **B**. **; Singh**, **and Srivastawa**, **D**. (2013). Biological control and its important in Agriculture. **Int**. **J**. **of Biotech**. **and Bio**.**Res**. 4: 175-180.

Silo-suh, **A**.**; He**, **H**.**; Hendelsman**, **J**. **and Clardy**, **J**. (1994). Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *bacillus cereus*. **Tetraherdom Letters**, 35:2499-2502.

Silo-suh, **L**.**; Stabb**, **E**.**V**.**; Raffel**, **S**.**J**. **and Handelsman**, **J**. (1998). Target range of zwittermicin A, an amino polyol antibiotic from *Bacillus cereus*. **Current Microbiol**. 37: 6-11.

Simas,**M**. **M**.**; Botura**,**S**. **; Corre**,**B**. **; Sabino** ,**M**. **; Mallmann**,**C**.**A**. **; Betencourt**, **T**.**C**.**B**.**S**.**C**.**and Batatinha**, **M**.**J**.**M**.(2007). Determination of fungal micro biota and Mycotoxins Recherch in brewers grain used in cattle feeding in the state of Bahia, **Brazil**. **Food**. **Control**, 18:404-408.

Spadaro, **D**. **and Droby**, **S**. (2015).Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Sci**. **and Tech**. 47: 39-49.

Stuper, **K**. **; Renata**, **C**.**R**. **; Szablewski**, **T**.**; Ostrowska**, **A**. **; Busko**, **M**. **and Perkowski**, **J**. (2015). Contamination with microscopic fungi and their metabolites in chicken feeds produced in western Poland in the years 2009-2010. **Act**. **Sci**.**Pol**. **Zootechnica** 4(3): 107-122.

Swaddling, **I**. **and Jeffries**, **P**. (1998). Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of gray mould disease. **Bio**. **Scie**. **and Tech**.,8:439-448.

Tao, **N**.**; Geo**,**Y**. **and Liu**, **Y**. (2011). Isolation and characterization of *Pichia anomala* strain: Apromising candidate for bioethanol production.**Brazilian J**.**of Microbio**.**42**:**668-675**.

Toure, **T**.**; Ongena**, **M**. **; Jacques**, **P**. **; Guiro**, **A**. **and Thonart**, **P**. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GAT in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. **J**. **App**. **Microbio**. 96:1150-1160.

Ullivarri, **M**. **F**.**; Mendoza**. **L**. **and Raya**, **R**. **R**. (2014). Killer yeasts as biocontrol agents of spoilage yeasts and bacteria isolated from wine.**Bio**.**web of conferences**, (3):1-4.

Vanesa, **G**. **M**.**; Franchi**, **M**. **L**. **; Ricogolba**,**S**. **L**. **; Pardo**, **A**. **G**. **and Pose**, **G**. **N**. (2014) Mycotoxins and Mycotoxigenic fungi in poultry feed for food- producing animals. **Sci**. **world**. **Journal**, pp: 9.

Vincent, **M**. **A**.**; Harrisson**, **L**. **A**.**; Brackin**, **J**. **M**.**; Kovocevich**, **P**. **A**.**; Mukeiji**, **P**.**; Weller**, **D**. **A**. **and Pieson**, **L**. **S**. (1991).Genetic analysis of **Environ**. **Microbiol**., 57: 2928-2934.

Whipps, **J**.**M**. **and Lumsdem**, **R**.**D**. (1989). Biotechnology of fungi for improving plant growth. **Cambridge University Press**, pp: 173- 289.

Whitlow, **L**. **W**. **and Hagler**, **W**. **M**. (1998). Mycotoxin contamination of feeds tuffs- An additional stress factor for dairy cattle. **University**. 1:32.

Wilson, **C**.**L**.**; Wismiewski**, **M**.**E**.**; Laughlin**, **R**.**; Chalutz E**.**and Droby**, **S**. (1991). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables alternatives to synthetic fungicides. **Crop**. **Prot**., 10: 171-177.

Wilson, **C**. **L**. **and El-Ghaouth**, **A**. (1993). Multifacted biological control of posthaverest diseases of fruits and vegetables. **American Chem**. **Socie**., pp:181-185.

Wisniewski, **M**. **; Bile**, **C**. **; Droby**, **S**. **; Mclaughlin**, **R**. **; Wilson**, **C**. *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. **Physio**. **and Mol**. **Plant Path**., 39: 245-258.

Wisniewski, **M**.**; Droby**, **S**.**; Chalutz**, **E**. **and Eliam**, **Y**. (1995). Effect of Ca^{+2} and Mg^{+2} on *Botrytis cinerea* and *Penicillum expansum in vitro* on the biocontrol activity of *candida oleophila*. **Plant Pathol**. 44:1016-1024.

Wojcik, **M**. **and Kordowska**, **W**. **M**. (2015). The occurrence of killer activity in yeast isolated from natural habitats. **Biochimica Polonica**. 62(4): 82-824.

Xiao-Dong Zheng, **D**.**H**. **; Yin**, **Y**.**M**. **; Sun**, **P**. **and Yin Zhang**, **H**. (2003). Yeasts application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*. **Bot**. **Bull**. **Acad**. **Sin**. , 44: 211-216.

Zamir, **K**.**P**. (1997). Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeast as biological control agents for diseases of vegetable crops Canadian **J**. **Plant Path**., 19: 315-323.

Zheng, **X**.**Y**. **and Sinclair**, **J**. **B**. (1996 a). Screening and isolation of mutants of *B. megaterium* B 153-2-2 for mobility, chemmotaxis, antagonism and sporulation. Physiological and Molecular **Plant Pathol**., 48: 233-244.

Ziedan, **E**.**H**.**E**. **and Farrag**, **E**.**S**.**H**. (2011). Application of yeast as biocontrol agents for controlling foliar diseases on sugar beet plants. **J**. **of Agri**. **Tech**., 7(6): 1789-1799.

الملاحق

الملاحق

الملحق 1: تركيب عينات غذاء الدواجن المدروسة

العينة (1): دجاج الاستهلاك في أوائل مراحل التربية (غذاء كامل و مفتمن)

* **التركيب:**

- الذرى
- كسب بذور الصوجا.
- مخلفات الطحين.
- كالكير
- فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- فيتامينات، مضادات التأكسد.
- مضادات الكوكسيديا
- عوامل النمو

● **التكميلات:**

- مضادات الكوكسيديا
- مضاد للأكسدة B.H.T
- فيتامينات: D_3-E-A

العينة (2): دجاج بياض منتج (غذاء كامل مزود)

● **التركيب:**

- الذرى

- كسب بذور الصوجا
- مخلفات الطحين
- كالكير
- فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- فيتامينات، مضادات التأكسد.
- مضادات الكوكسيديا
- عوامل النمو

التكميلات:

- مضاد للأكسدة B.H.T
- فيتامينات: D_3-E-A

العينة (3): دجاج الاستهلاك في نهاية مرحلة التربية (غذاء كامل و مفتمن)

- **التركيب:**

- الذرى
- كسب بذور الصوجا
- مخلفات الطحين
- كالكير
- فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- فيتامينات، مضادات التأكسد.
- مضادات الكوكسيديا
- عوامل النمو
- **التكميلات:**

- – مضادات الكوكسيديا
- – مضاد للأكسدة B.H.T
- – فيتامينات: D_3-E-A
- – مضادات الكوكسيديا

العينة (4): دجاج بيوض الاستهلاك(نسبة ادنى من مخلفات الطحين).غذاء كامل و مفتمن

* التركيب

– الذرى

- – كسب بذور الصوجا
- – مخلفات الطحين
- – كالكير
- – فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- – فيتامينات، مضادات التأكسد.
- – مضادات الكوكسيديا

التكميلات:

- مضادات الكوكسيديا
- مضاد للأكسدة B.H.T
- فيتامينات: D_3-E-A
- مضادات الكوكسيديا

العينة (5): دجاج الاستهلاك في مرحلة النمو(غذاء كامل و مفتمن)

*** التركيب:**

- الذرى
- كسب بذور الصوجا
- مخلفات الطحين
- كالكير
- فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- فيتامينات، مضادات التأكسد.
- مضادات الكوكسيديا

التكميلات

- مضادات الكوكسيديا
- مضاد للأكسدة B.H.T
- فيتامينات: D_3-E-A
- مضادات الكوكسيديا

العينة (6): فرخة بياضة من 8 إلى 18 أسبوع (غذاء كامل و مفتمن)

*** التركيب:**

- الذرى
- كسب بذور الصوجا
- مخلفات الطحين

- كالكير
- فوسفات، ملح، أحماض أمينية، العناصر الناذرة.
- فيتامينات، مضادات التأكسد.

- مضادات الكوكسيديا

- عامل النمو (مضادات حيوية)

التكميلات

- مضادات الكوكسيديا
- مضاد للأكسدة B.H.T
- فيتامينات: D_3-E-A
- مضادات حيوية (فلافوميسين)

الملحق (2): تركيب الأوساط الزراعية المستعملة:

Potato Dextrose Agar (**PDA**).

Pomme de terre	200 g	-
Dextrose	20 g	-
Agar	15 g	-
Eau distille	1L	-

Malt Extract Agar (**MEA**). -

Extrait de malt	20 g	-
Peptone	1 g	-
Glucose	20 g	-

Agar 15 g -

Eau distille 1 L -

Methylene Blue Agar (MBA)

Saboraud 2 %

Glugose broth 2 %

- Tryptone 1 %

Agar 2 %

Methylene blue 0.003 %

Glycerol

Glycerol Nitrate Agar (G25N).

K_2HPO_4 0.75 g -

Gzapeck concentrate 7.5 ml -

Yeast extrat 3.7 g -

Glycerol, analytical grade 250 g -

Agar 12 g

Eau distille 750 ml -

– Gzapeck concentrate -

$N_a NO_3$ 30g -

Kcl 5g -

$M_gSO_4.7H_2O$ 5g -

$F_eSO_4.7H_2O$ 0.1 g -

Eau distille 100 ml -

Yeast Peptone Dextrose (**YPD**) -

Yeast extrat 10 g -

Peptone 20 g -

Dextrose 20 g -

Agar 15 g -

Eau distillee 1L -

Czapek Yeast Agar (**CYA**)

$N_a NO_3$ 3g -

KH_2PO_4 $3H_2O$ 1 g -

$MgSO_4 7H_2$ 0.5 g -

Kcl 0.5 g -

$FeSO_4 7H_2O$ 0.01 g -

Yeast extrat 5 g -

Sucrose 30 g -

Agar 11 g -

Eau distillée 1L -

- **Trypticase Soy Agar** (**TSA**).

Peptone de caseine 17g

Peptone de farine de soja 3 g

Glucose 2.5g

Chlorure de sodium	5 g
Phosphate de potassique	2.5 g
Eau distillee	1L
Agar	15 g

Gelose Nutritive(GN)

Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g

وسط إنتاج Chitinase

Chitine colloidale	4 g
K_2HPO_4	0.7 g
KH_2PO_4	0.3 g
$MgSO_45H_2O$	0.5 g
$FeSO_4$	0.01 g
$ZnSO_47H_2O$	0.001 g
$MnCl_2$	0.001 g
NaCl	0.3 g
Extrait de levure	0.2 g
Agar	20 g
Eau distillée	1L

Gelose a la Cellulose

Cellulose	2 g
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_45H_2O$	0.25 g
Gelatine	2 g
Agar	15 g
Eau distillée	1L

Yeast Extract Sucrose Agar (**YESA**)

Extrait de levure	4 g -
Sucrose	20 g -
KH2PO4	1 g -
$MgSO_4$	0.5 g -
Agar	15 g -
Eau distillée	1L