وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية / كلية العلوم

تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات القسط الهندي *Costus speciosus* على بعض انواع الفطر ***Aspergillus*** **spp.** في الجرذان المخمجة تجريبياً بداء الرشاشيات الرئوي

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة / أحياء مجهرية

من قبل

زهراء فلاح عزيز الراضي

بكالوريوس علوم / علوم الحياة / ٢٠١٠

بإشراف

أ.م. د. نيران عبيد جاسم العامري

صفر- 1435هـ **كانون الاول - 2013 م**

﴿سَنُرِيهِمْ آيَاتِنَا فِي الْآفَاقِ وَفِي أَنفُسِهِمْ حَتَّىٰ يَتَبَيَّنَ لَهُمْ أَنَّهُ الْحَقُّ
أَوَلَمْ يَكْفِ بِرَبِّكَ أَنَّهُ عَلَىٰ كُلِّ شَيْءٍ شَهِيدٌ﴾

سورة فصلت – الآية (٥٣)

شكر وامتنان

أحمد الله حمداً غير متناه , وأشكره شكر العاجز عن احصاء فضله وكرمه , ونصلي ونسلم على من لا نبي بعده, محمد عليه افضل الصلاة وازكى السلام ...

أشكر الله العلي القدير الذي وفقني في تحصيل مصادر المادة العلمية لأحدى أهم النباتات الطبية وصفاتها المورفولوجية وتأثيراتها البيولوجية بغية الوصول إلى استنباط المنافع الكثيرة وابراز فوائدها ذات الاهمية الكبرى لفعاليتها الدوائية ومنافعها العلاجية في شفاء الكثير من الامراض البشرية .

وأنا أُكمل رسالتي يطيب لي أن أتقدم بأسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذتي الفاضلة ، **الأستاذ المساعد الدكتورة نيران عبيد جاسم** على إشرافها وتوجيهاتها ونصائحها وصبرها وتعاملها وحضورها ومساعداتها وتشجيعاتها المعنوية خلال مراحل إنجاز هذا البحث , فجزاها الله عني الجزاء الأوفى .

كما يدعوني الواجب أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم/جامعة القادسية ممثلة **بالأستاذ الدكتور عبد الامير سمير سعدون** وإلى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة **بالدكتور جاسم حنون** لما قدمته لي من رعاية ومساعدات جمة في المستوى الإداري والعلمي . كما لا أنسى ان أتقدم بجزيل الشكر والتقدير إلى أساتذتي الفضلاء في قسم علوم الحياة ممن كانوا لي مثلاً في عطاهم العلمي .

ومن الواجب أن أتقدم بأصدق كلمات الشكر لمنتسبي العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية لما قدموه لي من مساعدات خلال مدة البحث عرفاناً بجميلهم وأخص بالذكر **الدكتور حسن شريف** مدير العيادة **والسيد رحمن عيدان** مسؤول المختبر, وأقدم خالص شكري وتقديري لمنتسبي شعبة الأمراض الانتقالية وأخص بالذكر **السيد قصي كاظم والسيدة ابتسام عبد الكريم** على التسهيلات التي قدموها .

ومن باب الوفاء أن اتقدم بشكري وتقديري إلى **الدكتور خليل گزار جلاب** / كلية الطب البيطري على المساعدة الكبيرة والجهد العظيم في مجال الدراسة النسيجية المرضية جزاه الله عني خير الجزاء ...

وأتقدم بخالص شكري وتقديري إلى **الدكتور أحمد جاسم حسن**/كلية التربية **والدكتور علي محمد غازي**/كلية الطب البيطري لما أبدياه لي من تسهيلات في التحليل الإحصائي ...

كما لا يفوتني أن أتقدم بشكري واحترامي إلى طلبة الدكتوراه في كلية التربية / قسم علوم الحياة كلا من السيد وسام جاسم عبد علي ومدرستي القديرة سولاف حامد تيمور لما قدموه لي من توجيهات سديدة ومادة علمية غنية , فجزاهم الله عني خير الجزاء . ولا يسعني وأنا انهي كتابة هذه الكلمات الآ أن أتقدم بأحلى تحية عرفان

وتقدير إلى زملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا في كليتي العلوم والتربية / جامعة القادسية.. من كانت صحبتهم الأخوية المُهون لتعب الدراسة وآلامها .

وليستسمحني عذراً كلٌ من فاتني شكره وأسال الله أن يمن على الجميع بالموفقية والنجاح انه سميع مجيب.

زهراء...

الإهداء

الا وقد أنهيت رحلة البحث الطويلة . . . فيسرني ويثلج صدري أن اهدي ثمرة جهدي المتواضع إلى من طوقت عنقي أفضالهم . . .

إلى . . . من يسر للخير قصدي . . فأعان فاهتديت إلى . . . من نور للحق دربي . . وأرشد فمشيت

إليك يا ربِ أهدي جهدي المتواضع هذا

إلى من علم الإنسانية الهدى والإصلاح . . ونشر نور الايضاح . . سيدي وحبيبي وشفيعي . . رسول الله ﷺ

صلوات ربي وسلامه عليه ما غرد الطير فوق غصن ولاح . . .

إلى قبس أنار لي الحياة . . ورحل . . ليبقى خالداً في نفسي وقدوة في كياني إلى الأبد . . الى روح والدي . . رحمه الله

إلى معلمتي الأولى . . التي كانت لي مثلاً في الإصرار والصلابة , فصاغت لي من المستحيل أملا وأمدتني بالعزيمة والتصميم وشحذ همتي لانتهج العلم والمعرفة طريقاً في هذه الحياة وكان دعاءها نبراساً أنار لي الدرب الطويل .

أمي الحبيبة . . حفظها الله

ريحانة قلبي وبلسم عمري الباقي . . إليها أزف رسالتي هذه لتبقى بين يديها ضياءً .

إلى كافة أساتذتي الذين تلمذت على أيديهم . تقديراً واحتراماً

أهدي ثمرة جهدي المتواضع هذا .

شكر وامتنان

أحمد الله حمداً غير متناه , وأشكره شكر العاجز عن احصاء فضله وكرمه , ونصلي ونسلم على من لا نبي بعده, محمد عليه افضل الصلاة وازكى السلام ...

أشكر الله العلي القدير الذي وفقني في تحصيل مصادر المادة العلمية لأحدى أهم النباتات الطبية وصفاتها المورفولوجية وتأثيراتها البيولوجية بغية الوصول إلى استنباط المنافع الكثيرة وابراز فوائدها ذات الاهمية الكبرى لفعاليتها الدوائية ومنافعها العلاجية في شفاء الكثير من الامراض البشرية .

وأنا أُكمل رسالتي يطيب لي أن أتقدم بأسمى معاني الشكر والعرفان لأستاذتي الفاضلة ، **الأستاذ المساعد الدكتورة نيران عبيد جاسم** على إشرافها وتوجيهاتها ونصائحها وصبرها وتعاملها وحضورها ومساعداتها وتشجيعاتها المعنوية خلال مراحل إنجاز هذا البحث , فجزاها الله عني الجزاء الأوفى .

كما يدعوني الواجب أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى عمادة كلية العلوم/جامعة القادسية ممثلة **بالأستاذ الدكتور عبد الامير سمير سعدون** وإلى رئاسة قسم علوم الحياة المتمثلة **بالدكتور جاسم حنون** لما قدمته لي من رعاية ومساعدات جمة في المستوى الإداري والعلمي . كما لا أنسى ان أتقدم بجزيل الشكر والتقدير إلى أساتذتي الفضلاء في قسم علوم الحياة ممن كانوا لي مثلاً في عطاهم العلمي .

ومن الواجب أن أتقدم بأصدق كلمات الشكر لمنتسبي العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية لما قدموه لي من مساعدات خلال مدة البحث عرفاناً بجميلهم وأخص بالذكر **الدكتور حسن شريف** مدير العيادة **والسيد رحمن عيدان** مسؤول المختبر, وأقدم خالص شكري وتقديري لمنتسبي شعبة الأمراض الانتقالية وأخص بالذكر **السيد قصي كاظم والسيدة ابتسام عبد الكريم** على التسهيلات التي قدموها .

ومن باب الوفاء أن اتقدم بشكري وتقديري إلى **الدكتور خليل گزار جلاب** / كلية الطب البيطري على المساعدة الكبيرة والجهد العظيم في مجال الدراسة النسيجية المرضية جزاه الله عني خير الجزاء ...

وأتقدم بخالص شكري وتقديري إلى **الدكتور أحمد جاسم حسن**/كلية التربية **والدكتور علي محمد غازي**/كلية الطب البيطري لما أبدياه لي من تسهيلات في التحليل الإحصائي ...

كما لا يفوتني أن أتقدم بشكري واحترامي إلى طلبة الدكتوراه في كلية التربية / قسم علوم الحياة كلا من السيد وسام جاسم عبد علي ومدرستي القديرة سولاف حامد تيمور لما قدموه لي من توجيهات سديدة ومادة علمية

غنية , فجزاهم الله عني خير الجزاء . ولا يسعني وأنا انهي كتابة هذه الكلمات الآ أن أتقدم بأحلى تحية عرفان وتقدير إلى زملائي وزميلاتي طلبة الدراسات العليا في كليتي العلوم والتربية / جامعة القادسية.. من كانت صحبتهم الأخوية المُهون لتعب الدراسة وآلامها .

وليستسمحني عذراً كلٌ من فاتني شكره وأسال الله أن يمن على الجميع بالموفقية والنجاح انه سميع مجيب.

زهراء...

إقرار المشرف

أشهد إن رسالة الماجستير الموسومة بـ (**تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات القسط الهندي*Costus speciosus* على بعض انواع الفطر *Aspergillus* spp. في الجرذان المخمجة تجريبياً بداء الرشاشيات الرئوي**) . قد أعدتها الطالبة **زهراء فلاح عزيز الراضي** بإشرافي، وهي جزء من متطلبات درجة الماجستير في علوم الحياة / أحياء مجهرية .

التوقيع:

الاسم :أ. م. د. نيران عبيد جاسم العامري

اللقب العلمي : أستاذ مساعد

العنوان : كلية الصيدلة– جامعة

التاريخ : / /2013

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية المقدمة من الأستاذة المشرفة أحيل هذه الدراسة إلى المقومين اللغوي والعلمي لدراستها وبيان الرأي فيها.

التوقيع:

الاسم : د. جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس

العنوان : كلية العلوم – جامعة القادسية

التاريخ : / /2013

إقرار المقوم اللغوي

أشهد إنه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة زهراء فلاح عزيز الراضي الموسومة بـ **(تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات القسط الهندي *Costus speciosus* على بعض انواع الفطر *Aspergillus* spp. في الجرذان المخمجة تجريبياً بداء الرشاشيات الرئوي)** .

التوقيع:

الاسم: د. عبد الله حبيب كاظم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان: كلية التربية / جامعة القادسية

التاريخ: 5/ 1/2014

إقرار لجنة المناقشة

نشهد إننا أعضاء لجنة التقويم والمناقشة قد اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة بـ (**تأثير المستخلص الكحولي والمائي لجذور نبات القسط الهندي *Costus speciosus* على بعض انواع الفطر *Aspergillus* spp. في الجرذان المخمجة تجريبيا بداء الرشاشيات الرئوي**) وناقشنا الطالبة **زهراء فلاح عزيز** في محتوياتها وفيما له علاقة بها بتاريخ ٢٠١٤/٤/١٤ وإنها جديرة لنيل درجة الماجستير علوم في علوم الحياة /أحياء مجهرية / فطريات طبية وبتقدير (امتياز) .

التوقيع :

رئيس اللجنة: د. عدنان حمد عبيد الحمداني

المرتبة العلمية:استاذ

العنوان: كلية الطب / جامعة القادسية

التاريخ: / /٢٠١٤

التوقيع :

عضو اللجنة: د. نداء شهاب حمد الحسون

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم للبنات/ جامعة بابل

التاريخ: / /٢٠١٤

التوقيع :

عضو اللجنة: د. الاء عبد علي الخفاف

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان: كلية التربية للبنات/جامعة الكوفة

التاريخ: / /٢٠١٤

التوقيع :

عضو اللجنة (المشرف): د. نيران عبيد جاسم

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان: كلية الصيدلة/جامعة القادسية

التاريخ: / /٢٠١٤

مصادقة عميد كلية العلوم

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه .

التوقيع

الاسم : د. عبد الامير سمير سعدون

المرتبة العلمية:استاذ مساعد

العنوان: كلية العلوم /جامعة القادسية

التاريخ : / / ٢٠١٤

الرقم	اسم الشكل	الصفحة
2 - 1	رسم تخطيطي يوضح حدوث الإصابة الرئوية بمرض Aspergillosis	٧
2 - 2	صورة فوتوغرافية لنبات *C. speciosus* .	١٤
4 - ١	انواع جنس *Aspergillus* المعزولة على وسط (CZA)	٤٩
4 - ٢	الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) لل DNA على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات فطر.*Aspergillus* spp باستعمال عدة Genomic DNA Mini Kit	٥٠
4 - ٣	نواتج تضخيم الجينات (*PEP* , *PEX* , *ATE*) لعزلات الفطر .*Aspergillus* spp باستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز (1.5 %) وفولتية (100) ولمدة ساعة	٥١
4 - 4	نواتج تضخيم الجين (*PEPO*) لعزلات الفطر *Asp. flavus* باستعمال تقنية Single PCR والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز (1.5 %) وفولتية (100) ولمدة ساعة	٥٢
4 - 5	تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A. niger*	5٧
4 - 6	تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.fumigatus* .	59
4 - 7	تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.flavus*	61
4 - 8	تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.terreus*	63
4 - 9	بعض التغيرات المورفولوجية التي تطرأ على ميسليوم الفطر .*Aspergillus* spp بعد المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات الاختبار	79
4 - 10	(A) رئة جرذ طبيعي , (B) رئة جرذ مخمج بفطر *A. fumigatus* عن طريق الاستنشاق توضح ذات الرئة متمثلة بالاحتقان والتكبد الاحمر بعد (14) يوم من الحقن , (C) رئة جرذ تم معالجته بمحلول مستخلص نبات *C. speciosus* بعد (21) يوم من المعالجة بالمستخلص	84
4 - 11	مقطع عرضي من نسيج الرئة مجموعة السيطرة(C)	86
4 - 12	مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T_1)	86
4 - 13	مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T 1)	87

14 - 4	مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T_1)	87
15 - 4	مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر و المعاملة فموياً بمستخلص *C. speciosus* بجرعة (75ملغم/مل)	88
16 - 4	مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر و المعاملة فموياً بمستخلص *C. speciosus* بجرعة (75ملغم/مل)	88

الرقم	اسم الجدول	الصفحة
3 - 1	الاجهزة المستخدمة بالتحارب ومنشأها	18
3 - 2	المواد الكيميائية والحياتية	19
3 - 3	مكونات مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR وحجومه	٢٨
3 - 4	البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة	٢٩
3 - 5	برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرةPCR	٢٩
3 - 6	حساسية اختبارات تشخيص عزلات جنس Aspergillus وخصوصيتها	٣٠
4 - 1	حساسية وخصوصية الفحص المجهري وطريقة الزرع	46
4 - 2	يوضح نتائج الفحص المجهري وطريقة الزرع لعينات القشع	46
4 - 3	النسبة المئوية لظهور وتردد أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة من قشع مرضى الأخماج الرئوية	53
4 - ٤	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus niger*	56
4 - ٥	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر*Aspergillus fumigatus*	58
4 - 6	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر*Aspergillus flavus*	60
4 - 7	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر*Aspergillus terreus*	62
4 - 8	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر*Aspergillus niger*.	65
4 - 9	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus fumigatus*	66
4 - 10	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus flavus*	67
4 - 11	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus terreus*	68
4 - 12	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ	70

	للفطر *Aspergillus niger*	
13 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ للفطر *Aspergillus fumigatus*	71
14 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ للفطر *Aspergillus flavus*	72
15 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ للفطر *Aspergillus terreus*	73
16 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus niger*	75
17 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus fumigatus*	76
18 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus flavus* .	٧7
19 - 4	تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus terreus*	78
20 - 4	الدالة الحامضية والنسبة المئوية للمستخلصات نبات *Costus speciosus*	80
21 - 4	يوضح نتائج الكشف الكيميائي عن المركبات الفعالة في مستخلصات نبات *Costus speciosus* مع بعض صفاتها الكيميائية	81
22 - 4	الفحوصات النهائية للكشف عن المواد الفعالة في مستخلصات نبات *Costus speciosus*	82
23 - 4	نتائج حساب السمية الخلوية	82
24 - 4	التغير في معدل وزن الجسم (بالغرام) قبل الاصابة وبعد ١٤ و ٢٨ يوماً من الاصابة المستحدثة	84

الرقم	الموضوع	الصفحة
الخلاصة		I-II
قائمة المحتويات		III-VI
قائمة الجداول		VII-VIII
قائمة الاشكال		IX
قائمة المختصرات		X-XI
الفصل الأول المقدمة Introduction		1-3
المقدمة Introduction		1
الفصل الثاني استعراض المراجع Literatures Review		4-17
.1.2	جنس *Aspergillus*	4
.1.1.2	أمراضية الفطر *Aspergillus* spp.	6

.٢.1.2	الانماط السريرية للإصابة بالرشاشيات Aspergillosis	8
♦	داء الرشاشيات الرئوي ـ القصبي التحسسي	8
♦	الورم الاسبرجلوسي او الكرة الفطرية	8
♦	داء الرشاشيات الغازية	٩
♦	ذات الرئة الرشاشي التنخري المزمن	٩
.٣.1.2	العوامل المهيئة للإصابة الرشاشية	٩
.1	داء السكري Diabetes Mellitus	10
.2	التثبيط المناعي Immune Suppression	10
.3	الاستعمال العشوائي والمتكرر للأدوية Randomized and repeated uses of drugs	10
.٤,١,٢	التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis	11
.2.2	النباتات الطبية Medicinal plants	12
.1.3.2	نبات القسط الهندي *Costus speciosus* Koen. (Keu, Crape ginger)	13
.2.3.2	فوائد القسط واستعمالاته الطبية في السنة	15
.3.3.2	الخصائص البيولوجية لنبات القسط *C.speciosus*	16
.4.3.2	الفعالية المضادة للميكروبات لنبات القسط *C. speciosus*	17
الفصل الثالث المواد وطرائق العمل Materials and Methods		18-45
1.1.3	الاجهزة والمستلزمات المختبرية	18
2.1.3	المواد الكيميائية والحياتية	19
1.2.3	تحضير الاوساط والمحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة بالدراسة	٢١
2.2.3	جمع العينات Specimen collection	٢٤
.3.3	الفحوصات المختبرية للعينات Laboratory examination of samples	24
.1.3.3	الفحص المجهري المباشر Direct Microscopic examination	24
.2.3.3	زرع العينات Culturing of Specimens	24
.3.3.3	أدامة العزلات Maintenance of Isolation	25
.4.3	طرائق التشخيص	25
.1.4.3	تشخيص الأنواع الفطرية Diagnostic of fungi	25
.2.4.3	التشخيص التأكيدي لبعض أنواع جنس *Aspergillus* بطريقة تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة (PCR).	٢٦
1.2.4.3	الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)	26
1	استخلاص ال DNA Genomic DNA extraction	26
2	تحضير هلام الأكاروز Preparation of Agarose gel	27
2.2.4.3	تحضير محلول التفاعل لسلسلة تفاعلات البلمرة PCR	28
3.2.4.3	الترحيل الكهربائي لناتج تفاعلات البلمرة	30

.5.3	حساب حساسية وخصوصية الاختبارات التشخيصية	30
.6.3	النسبة المئوية لظهور العزلات Percentage of observation the isolates	30
.7.3	المستخلصات النباتية Plant Extracts	31
.1.7.3	النبات المستخدم في الدراسة	31
.2.7.3	الاستخلاص Extractions	31
.1	الاستخلاص الكحولي Alcoholic extractions	31
.2	الاستخلاص المائي Water extractions	32
. 2.7.3	النسبة المئوية للمستخلصات النباتية	32
.3.7.3	تعقيم المستخلصات وتحضير المحلول الخزين	32
.8.3	دراسة تأثير المستخلصات النباتية *C. speciosus* في نمو بعض انواع جنس *Aspergillus*	33
.1.8.3	تأثير تراكيز مختلفة من مستخلصات نبات *C. speciosus* في النمو الشعاعي للفطريات الاختبارية	33
.2.8.3	تأثير مستخلصات النباتية في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية	34
.3.8.3	تأثير مستخلصات النبات في إنبات ابواغ الفطريات وطول الأنبوب الجرثومي للفطريات الاختبارية	34
.4.8.3	دراسة تأثير مستخلصات النبات على الخلايا الفطرية	35
.9.3	اختبار حساسية الفطريات للمضاد الفطري Ketoconazole	35
•	تحضير محلول المضاد الفطري Preparation antifungal solution	35
•	اختبار التأثير المثبط للمضاد KCZعلى نمو الفطريات المختبرة	35
•	اختبار تأثير المضاد KCZ على الوزن الجاف للفطريات	36
•	اختبار تأثير المضادKCZ على أنبات ابواغ الفطريات	36
.1.10.3	الكشف الكيمياوي التمهيدي الاستدلالي للمكونات الفعالة في النبات المتناول بالدراسة	36
.2.10.3	الاختبارات النهائية للكشف عن المجاميع الفعالة في مستخلصات نبات الاختبار	39
.11.3	تقييم السمية الخلوية للمستخلص الميثانولي والمائي لنبات *C. speciosus*	40
1.12.3	الحيوانات المختبرية	40
٢.12.3	الامراضية Pathogenicity	40
١.٢.12.3	تحضير العالق البوغي Preparation of Fungal Suspension	40
2.2.12.3	حساب تركيز العالق البوغي	41
3.12.3	تحضير الجرع العلاجية لنبات *C.speciosus*	41
٤٢	تصميم التجربة Experimental Design	4. 12.3
43	الدراسة المرضية Pathological study	.5. 12.3
43	التضحية بالحيوانات Animal Sacrificing	.6.12.3
43	الفحوصات المرضية Pathological Examination	.7.12.3

1.7.12.3	الفحص المرضي العياني	43
2.7.12.3	الدراسة النسيجية Histological study	44
13.3	التحليل الإحصائي	45
الفصل الرابع	**النتائج Results**	46-88
.1.4	العزل والتشخيص للعينات المرضية	46
.1.1.4	العزل	46
.2.1.4	تشخيص أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة	47
.3.1.4	التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Molecular Diagnosis by PCR	50
.1.3.1.4	استخلاص ال DNA	50
.2.3.1.4	التشخيص ألتوكيدي لعزلات .*Aspergillus* spp باستخدام تقنية تفاعل سلسلة إنزيم البلمرة (PCR)	51
.2.4	النسبة المئوية لظهور وتردد أنواع الجنس *Aspergillus* spp.	52
.3.4	نتائج فاعلية مستخلصات نبات *Costus speciosus* الخام والمضاد الفطري Ketoconazole على بعض الجوانب الفسلجية للفطريات مختبرياً	54
.1.3.4	تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في النمو الشعاعي للفطريات المنتخبة	54
.2.3.4	تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في الوزن الجاف للفطريات المختبرة	64
.3.3.4	تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في إنبات ابواغ الفطريات	69
.4.3.4	تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في طول الأنبوب الجرثومي للفطريات	74
.5.3.4	تأثير مستخلص النبات الكحولي على مورفولوجيا الميسليوم الفطري	78
.1.4.4	النسب المئوية لمستخلصات نبات *C. speciosus*	80
.2.4.4	الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المواد الفعالة طبياً في نبات *C. speciosus*	80
.3.4.4	الفحوصات النهائية للكشف عن المواد الفعالة طبياً في مستخلصات نبات *C. speciosus*	82
.5.4	السمية الخلوية	82
.6.4	نتائج الامراضية	83
.1 .1.6.4	العلامات السريرية Clinical signs	83
.2 .1.6.4	تأثير المعلق الجرثومي في وزن الجسم لذكور الجرذان المختبرية	83
.1 .2.6.4	التغيرات المرضية العيانية	84
٢,٦,٤ .٢	التغيرات النسيجية ـ المرضية	85
الفصل الخامس	**المناقشة Discussion**	89-101

.1.5	نسبة عزل الفطريات Aspergillus	89
.2.5	نسبة العزل بجنس *Aspergillus* وأنواعه المعزولة	٩٠
.3.5	التشخيص الجزيئي التأكيدي لعزلات جنس *Aspergillus*	٩٣
.4.5	تأثير المستخلص الكحولي والمائي في نمو الفطريات المختبرة	٩٣
.5.5	الاستخلاص والكشف الكيميائي التمهيدي للمركبات الفعالة للمستخلصات نبات *C.speciosus*	95
.1.6.5	العلامات السريرية Clinical signs	97
.2.6.5	اعراض المرض Symptoms	98
الاستنتاجات و التوصيات Conclusions & Recommendation		102-103
الاستنتاجات		102
التوصيات		103
المصادر		104-126
المصادر العربية		104
المصادر الاجنبية		108
الملاحق Appendices		I-X
1	العدة المستخدمة في استخلاص الحامض النووي DNA	I
2	العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد (Single PCR)	I
3	أعداد الفطريات المعزولة من قشع مرضى الاخماج الرئوية ونسبة ظهورها	II
4	الصفات الزرعية والمجهرية لأنواع جنس *Aspergillus* المعزولة	II
5	قياس تركيز ونقاوته الحامض النووي DNA بجهاز Nanodrop	IV
ملخص الرسالة باللغة الإنكليزية		V-VII

Abbreviation	**Key**
ABPA	Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis
AFB	Acid Fact Bacilli
AFS	Allergic fungal Sinusits
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
ALKP	Alkaline phosphate
b.p	Break point
CCl_4	Carbon tetrachloride
CYA	Czapek yeast extract agar
CZA	Zapek's dox agar

D.P.X	Distrene plasticizers Xylene
D.W	Distal water
DMSO	Dimethyl Sulphoxide
DNA	Deoxyribo Nucleic Acide
EDTA	Ethylene diaminetetra acetic acid
H & E	Hematoxylin & Eosine stain
HIV	Human Immunodeficiency Virus
I.N	Intranasal injection
I.P	Intraperitoneal injection
I.V	Intravenous injection
IA	Invasive Aspergillosis
ICMSF	International Commission on Microbiological Specification for Foods
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
ITS	Internal transcribed spacer
KCZ	Ketoconazole
KOH	Potassium hydroxide
LCB	Lactophenol cotton blue
LMIF	Leukocyte migration inhibitory factor
LRTIs	Lower Respiratory tract infection
LSD	List significant deference
µm	Micrometer
MEA	Meat extract agar
mg	Milligram
MMIF	Macrophage migration inhibitory factor
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polynuclease Chain Reaction
pH	Power of hydrogen($H^{+)}$
PIRG	Percent Inhibition of Radial Growth
PMI	Pulmonary Mycotic Infections
pp.	pages
S.C	Subcutaneous
SCP	Single cell protein

SDA	Sabouraud's Dextrose Agar
SDB	Sabouraud's Dextrose Broth
SGOT	Serum Glutamate Oxaloacetate Transaminase
SGPT	Serum Glutamate pyruvate Transferase
spp.	Species
SPSS	Social Package Statistical System
TB	Tuberculosis
TE-B	Tris-Borate-EDTA buffer
TNF-α	Tumor necrosis factor-α
U.V.	Ultra Violate
v/w	volume per weight
WHO	World Health Organization
α	Alpha
β	Beta
<	Less Than
≥	Greater Than or Equate to
µl	Microliter

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص بعض أنواع الفطر *Aspergillus* spp. من قشع مرضى اخماج المسالك التنفسية المراجعين للعيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية ومن المحالين والراقدين في شعبة الامراض الانتقالية في مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من 2012/١٠/١ ولغاية 2013/٤/١ , وقد كان عدد العينات التي استحصل عليها من المرضى 406 عينة سريرية تضمنت 380 عينة قشع و26 عينة من الغسيل القصبي, فحصت وشخصت جميع العينات بالطرائق التقليدية ودعم تشخيص بعض عزلات جنس *Aspergillus* spp. بالتشخيص الجزيئي باستخدام تقنية PCR . واختبرت القدرة التثبيطية لمستخلص جذور نبات القسط الهندي (Koen.) *Costus speciosus* الكحولية والمائية ضد بعض عزلات جنس *Aspergillus* spp. بالمقارنة مع المضاد الفطري القياسي Ketoconazole في النمو الشعاعي والوزن الجاف وفي إنبات ابواغها وقياس طول الإنبوب الجرثومي وتم الكشف عن تأثير المستخلص الكحولي على مظهر غزول الفطريات المدروسة , وبذات الوقت تم

التحري عن المواد الفعالة في المستخلصات عن طريق التفاعلات اللونية للكواشف الكيميائية والكشف عن المجاميع الفعالة . وتم دراسة التأثيرات النسجية - المرضية بعد إجراء إصابة تجريبية لذكور الجرذان البيض المختبرية ببعض عزلات فطر *Aspergillus* واختبار كفاءة المستخلص الكحولي علاجاً تجريبياً نسجياً ضد الإصابة المستحدثة في ذكور الجرذان البيض .

حيث بينت نتائج الفحوصات المظهرية , الزرعية منها والمجهرية عائدية 107عزلة (28.08%) إلى جنس .*Aspergillus* spp عزلت 96 عينة قشع و4 عينات من الغسيل القصبي توزعت على تسعة انواع . كان النوع *A.fumigatus* اكثرها شيوعاً (29.9%) والنوع *A.niger* (28.9%) و النوع *A.flavus* (18.69%) و*A.terreus* (12.14%) و*A.ochraceus* (3.73%)و *A.nidulans* (2.08%) و *A.parasiticus* (1.86%) وبعدد عزلات بلغ 32 ,31 , 20 , 13, 4 , 3 , 2 على التوالي , ويعد النوعان الأخيران أول عزل محلي لهما من قشع مرضى أصابات الجهاز التنفسي بالإضافة إلى تسجيل أول لاثنين من انواع جنس *Aspergillus* في قشع المرضى على مستوى العراق وهي *A. ustus* و *A. penicillioides* (0.93%) بواقع عزلة واحدة لكل نوع .

ووجد أن جميع معاملات المستخلصات الكحولية والمائية لها تأثيرات مثبطة عالية المعنوية لنمو الفطريات المختبرة وعند جميع الاختبارات بخمس تراكيز (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم / مل قياساً بمعاملات المقارنة عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) , حيث بلغ متوسط التأثير على النمو الشعاعي للفطريات المختبرة *A.niger* و *A.fumigatus* و *A.flavus* و *A.terreus* في معاملات مستخلص كحول الكحولي (٧٨،٠١% , 76.94% , 77.38 % , 80.42%)على التوالي في حين بلغ متوسط التأثير لمعاملات المستخلص المائي (67.98 % ,63.94 % , 73.75 % , 72.09 %)على التوالي , أما معاملات المضاد فبلغ متوسط التأثير (51.61 % ,59.49 % , 73.43% , 69.06 %) على التوالي عند التراكيز ذاتها . واوضحت النتائج أنّ معاملات المستخلصات الكحولي والمائية خفضت من معدلات الوزن الجاف للفطريات المختبرة قياساً مع معاملات المقارنة وبالتراكيز ذاتها المختبرة بالنمو الشعاعي إذ بلغ متوسط التأثير في الوزن الجاف للفطريات المختبرة لمعاملات مستخلص كحولية (75.24% , 74.92% , % , 83.64% , 78.21%) على التوالي أما متوسط التأثير لمعاملات المستخلص المائي (68.38% , 72.70% , 80.02% , 74.67%) على التوالي أما بالنسبة لمعاملات المضاد عند التراكيز ذاتها فقد بلغ متوسط التأثير في الوزن الجاف (81.80% , 82.94% , 81.69% , 97.25%) على التوالي .

وأكدت نتائج التأثير نتائج تخفيض نسب إنبات الابواغ وطول الانبوب الجرثومي للفطريات المختبرة إذ بلغ متوسط تأثير معاملات مستخلص كحولي عند ذات التراكيز (21.33% , 26.48% , 20.4% , 22.74%)على التوالي فيما بلغ متوسط أطوال الانابيب الجرثومية للفطريات المختبرة (12.84 , 11.71 , 13.65, 13.63) مايكرون على التوالي , في حين بلغ متوسط تأثير معاملات المستخلص المائي على نسبة إنبات الابواغ(27.79 %, 31.34 % , 24.11 % , 25.38 %) على التوالي وبلغ متوسط أطوال الانابيب الجرثومية (18.54 , 17.44 , 16.49 , 15.88) ما يكرون على التوالي مقارنة بمعاملات المضاد الفطري التي بلغ متوسط تأثيرها في نسب إنبات الابواغ (19.37% , 19.55% , 21.08% , 17.80%) على التوالي فيما بلغ متوسط اطوال الانابيب الجرثومية (11.24 , 11.20 , 10.30 , 11.70) ما يكرون على التوالي , وتأثير المستخلص الكحولي على الهيئة المورفولوجية للميسليوم فطريات الدراسة في اختزال وتشوه الحوامل الكونيدية فضلاً عن زيادة عدد الحواجز .

تبين من خلال الكشف الكيميائي التمهيدي عن المواد والمجاميع الفعالة في المستخلص المائي والكحولي لنبات الاختبار احتواءه عليها , أما اختبار السمية الخلوية لكريات الدم الحمراء للمستخلصين فقد بينت عدم وجود أي سمية خلوية إذ لم يظهر أي تحلل لكريات الدم .

أظهرت ذكور الجرذان البيض المحقونة بعالق ابواغ فطر *A.fumigatus* عند قياس بعض معايير الصحة العامة أعراضاً سريرية تمثلت بحصول فقدان للشهية وضعفاً عضلياً والاضطجاع على الجانب فضلاً عن سرعة التنفس وصعوبة التنفس مع تغير الاصوات التنفسية , وانخفاض معنوي في وزن الجسم بالقياس بمجموعة السيطرة عند مستوى احتمال ($P<0.05$) , ولوحظ على حيوانات التجربة تغيرات عيانية مرضية واضحة على العضو المشمول بالدراسة (الرئات) تمثلت بوجود احتقان وتضخم شديدين وبقع نزيفيه . أما نتائج الفحص النسجي فقد أظهرت تغيرات نسجية - مرضية شديدة منها حصول تهتك وتنخر للأسناخ الرئوية مما ادى إلى ظهور الانتفاخ الرئوي وفرط تنسج شديد في الطبقة الطلائية المبطنة للقصيبات وارتشاح للخلايا الالتهابية مع نزيف واحتقان الاوعية الدموية ورافق ذلك ظهور العامل المسبب للإصابة داخل نسيج الرئة المخموج . في حين أظهرت النتائج ان إعطاء محلول المستخلص الكحولي لنبات الاختبار كعلاج تجريبي قد أسهم بشكل فعال وواضح في تحسين المعايير التي اشتملت عليها الدراسة تمثلت بظهور اعراض سريرية اقل حدة وكانت أكثر إقبالاً على استهلاك الماء والغذاء ولوحظت تغيرات عيانية مرضية ونسجية مرضية اقل شدة من المجموعة المعاملة بلقاح الفطر فقط أن لم يكن قد قارب التركيب الطبيعي للمقاطع المأخوذة من السيطرة .

المقدمة Introduction

تعد الإصابة بالأنواع العائدة لجنس.*Aspergillus* spp الظاهرة العرضية الاكثر تكراراً من بين الاخماج الفطرية المختلطة (Mixed fungal infection) على نطاق العالم واكثرها تدهوراً للوضع الصحي , شائعة لدى مرضى الوهن المناعي (Prescott *et al*., 2005) , وعدد الأنواع المحتملة غير محدود تنتشر على نطاق عالمي بشكل واسع فهي تتواجد في الماء والهواء وبشكل رمي بالتربة حيث يمكنها النمو على أي وسط حي وتتمكن أبواغها من البقاء والمقاومة لأشهر أو لسنوات عدة (شريف , 2012a) , تنتهز فرصة ضعف مناعة الجسم لتصبح ممرضة وتسبب حالة مرضية تسمى بداء الرشاشيات (Aspergillosis) كما في الأمراض المزمنة مثل التدرن الرئوي (Pulmonary tuberculosis) والأورام السرطانية المزمنة (Chronic Carcinoma) والعلاج المديد بالمضادات الحيوية واسعة الطيف (Broad-spectrum antibacterial) أو خلال برنامج العلاج بالكورتيكوستيرويد (Corticosteroid therapy) كما في حالات مرضى الربو (Asthma) ومرضى الإيدز (HIV) والذين يعانون من اعتلالات أيضية كمرضى داء السكري (Diabetes Mellitus) (Olempska *et al*., 2006) وهذا بسبب ضعف القدرة الإبتلاعية لخلايا الدم البيض , فضلاً عن عوامل تزيد من شدة الإصابة للمضيف مثل العمر والجنس والسمنة وطبيعة المهنة أو العمل والانشطة والعيش بالأبنية المكتظة بالفطريات (Erjavec *et al*., 2009) .

وعامة يعني مصطلح Aspergillosis الالتهاب الذي تسببه فطريات *A. fumigatus* في الجهاز التنفسي بشكل أساس ويمكن للأنواع الأخرى من الجنس مثل *A. flavus* , *A. niger* , *A. terreus* وبقية الانواع بدرجة أقل(Batra *et al*., 2006) أن تصيب الرئة عن طريق استنشاق الابواغ المحمولة بالهواء نتيجة لصغر حجمها إذ يبلغ حجم أبواغ فطر*A. fumigatus* (0.82) مايكرومتر ووزنها النوعي (0.240) (Kousha *et al*., 2011) مما يمكنها من الولوج إلى الأسناخ الرئوية بأضعف تيار هوائي محدثه داء الرشاشيات الرئوي (Pulmonary aspergillosis) (Tekaia and Latge 2005) الذي يشمل طيفاً واسعاً من الأمراض الرئوية غير المعدية التي يتراوح مداها من تفاعلات فرط الحساسية (Allergic Aspergillosis) إلى الإصابة الجهازية المباشرة التي قد تكون ورمية (Aspergilloma) أو غازية (Invasive Aspergillosis) (Cho *et al*.,2005) , وكثيراً ما تكون الأعراض والعلامات السريرية غير واضحة ولا تدل على نوع المسبب , ونصف المصابين يعانون من اعراض تتراوح من اعتلالات الرشح الخفيفة إلى إصابة رئوية أولية موازية للتدرن الرئوي (Salvo,2004), وتشخيصه صعب ومتأخر عادة . وبشكل عام فان شدة الاصابة تعتمد بشكل أساس على مناعة المضيف وكمية الأبواغ المستنشقة وضراوة الفطر(Virulence) المتمثلة بالأساليب الوراثية والفسلجية المتعددة التي

يتخذها الفطر لتجنب دفاعات المضيف محققاً بذلك الإصابة (Cooney and Klein , 2008) .

ونظراً للزيادة الملحوظة في حالات الإصابة بداء الرشاشيات في الآونة الأخيرة شكل عبئاً عالمياً ثقيلاً , مما دفع الكثير من الباحثين والمهتمين إلى بذل المزيد من الجهود البحثية بغية معرفة الآلية المرضية والمظاهر السريرية المتعلقة بها ومن ثم إيجاد العلاج للحد من انتشار هذه الإصابات , بعد أن أدت (90 %) من الحالات الغازية المسجلة إلى الوفاة (Diaz and Lopez , 2004; Baddley *et al.*, 2010) وأجريت العديد من الدراسات حول جنس *Aspergillus* , الا أن هذه الدراسات تبلورت حول محورين أما دراسات مسحية عامة تهتم بعزل وتشخيص مجموعة من المسببات المرضية لمرض ما أو تدرس جنس *Aspergillus* بوصفه أحد هذه المسببات كما هو الحال مع دراسة وادي (2000) ; الربيعي (2001) ; جلوب (2004) ; Curtis *et al.*, (2005) ; AL-Ameri (2005) ; الغالبي (2006) ; الحسيناوي (2006) ; Diba *et al.*,(2007) ; محمد (2007) ; متعب (2008); Kim *et al.*,(2009) ; الجناحي (2012) , فنشأت استنتاجات عديدة على نطاق واسع حول تأكيدات غير مثبته علميا مفادها عدم وجود آلية محددة حالياً لنشوء المرض , فضلاً انه لا يوجد وصف للحالة السريرية المفترضة ونقص في الوصف التشريحي للمرض فأكثر الدراسات السابقة مبنية على أسس وطرائق ومعلومات غير كافية .

ومع الارتفاع الحاصل في معدلات الإصابات بجنس *Aspergillus* وظهور مجموعة أمراض Aspergillosisومحدودية فعل المضادات المصنعة دفع بالكثير من الباحثين إلى رفع شعار العودة إلى الطبيعة ومراجعة الطب التقليدي واقتباس وصفاته الشعبية واخضاعه للدراسات العلمية فنجم عن هذا الصيدليات الطبيعية ذات المأمونية الأوسع على النظام الحيوي ، حيث أن النبات الواحد يمكن أن يعمل كوحدة دوائية عن طريق تأثير مكوناته الفعالة المعروفة وغير المعروفة والتي تتدخل بالفعل التآزري في التصدي للخلل الفسيولوجي الناجم عن آليات الإصابة المعقدة (شوفالية , 2005) , إذ أشارت دراسات مثبته علمياً مفادها أن المادة الفعالة المستخلصة من النباتات تعطي نتائج أفضل من المادة نفسها المصنعة كيميائياً والتي قد ترافقها تأثيرات جانبية سمية مما يشير إلى إمكانية إسهام المواد الثانوية الموجودة في شكل المادة الفعالة في تعزيز الدور الفعال للنبات (السامرائي , 2009) .

وهذا ما قد حدا بنا إلى السعي مع الجهود الحثيثة المبذولة والمحاولات المتواصلة من جانب الباحثين ذلك من خلال التحري عن التأثير التثبيطي لمستخلصات نبات *Costus speciosus* بغية معرفة مدى أمكانية استنباط مادة علاجية ذات منشأ طبيعي من هذه المستخلصات بدل المضادات الحيوية

البشرية بوصفها مواداً مضادة للفطريات لعلاج حالات مرضية منتشرة تسببها مثل هذه العزلات وإثبات الإعجاز العلمي في الطب النبوي على لسان نبينا محمد ﷺ , ونظراً لقلة الدراسات حول هذا النبات في تأثيره على الأحياء المجهرية بناءً على المعلومات المتوفرة لدينا ارتأينا أجراء هذا البحث الذي يهدف إلى عزل جنس *Aspergillus* spp. والوقوف على التأثيرات الفسيولوجية والمرضية - النسجية ومعرفة التأثير العلاجي لهذا النبات , وعليه فأن البحث تناول المحاور التالية :

1. عزل الانواع المختلفة العائدة لجنس*Aspergillus* spp. من المرضى الذين يعانون من الالتهابات الرئوية المزمنة وتشخيص الانواع المعزولة تبعا للمواصفات المورفولوجية والخصائص المجهرية وتأكيد التشخيص جزيئيا باستخدام تقنية PCR لبعض الانواع , وبالاعتماد على نسبة تكرارها .
٢. تقييم فاعلية المستخلص المائي والكحولي لنبات *C. speciosus* في نمو بعض انواع جنس *Aspergillus* spp. بدراسة التأثير في النمو الشعاعي والوزن الجاف وإنبات الابواغ وطول الانبوب الجرثومي بالمقارنة مع المضاد الفطري القياسي Ketoconazole كسيطرة . وإظهار هذا التأثير على المستوى المورفولوجي لفطريات الاختبار من خلال الفحص المجهر الضوئي .
٣. اجراء كشف تمهيدي للمحتوى الكيميائي لخلاصتي نبات *C. speciosus* بوساطة التفاعل اللوني للكواشف الكيميائية ذات الحساسية العالية .
٤. تقييم الأثر العلاجي لخلاصة نبات *C. speciosus* الكحولية تجريبياً (*in-vivo*) على التأثيرات الفسيولوجية والمرضية - النسجية للإصابة المستحدثة بفطر *Aspergillus* sp. في رئات ذكور الجرذان البيض المختبرية . واعتماد بعض المعايير مثل قياس وزن الجسم ومعدل الكسب الوزني weight gain rate ودراسة التغيرات النسجية - المرضية لرئات الحيوانات المختبرية . بالإضافة إلى تسجيل العلامات السريرية الظاهرة على حيوانات التجربة من خلال المراقبة المستمرة طيلة مدة الدراسة والعلامات أو التغيرات العيانية على رئات الحيوانات المصابة قبل وبعد المعالجة.

2- استعراض المراجع Literatures Review

1.2. جنس *Aspergillus*

اشتق اسم الفطر *Aspergillus* العالم Micheli عام (1729) وايده بذلك العالم Link عام (1809) مستنداً على شكل سبوراتها المنبثقة بهيئة سلاسل او اعمدة تنشا من تركيب حويصلي مركزي بترتيب شعاعي ليضفي عليها نموذجا يشبه مرشة الماء , وتدعى باللاتينية (Aspergillum) ومنه اشتق اسم الجنس(Bennett *Aspergillus* and Kown-chung ,1992) . ويضم هذا الفطر اكثر من 250 نوع (Messer *et al*.,2008) . ويتبع الطور الكامل لصنف الفطريات الكيسية (Ascomycetes) ورتبة (Eurotiales) بحسب المفتاح التصنيفي , وفي ادناه الموقع التصنيفي لجنس *Aspergillus* وبحسب (Bommakant and Waliyar ,2002 ; Alexopules *et al*., 1996) .

Kingdom :	Fungi
Phylum :	Ascomycota
Subphylum:	Pezizomycotina
Class :	Eurotiomycotes
Order :	Eurotiales
Family :	Trichocomaceae
Genus :	*Aspergillus*

ونظرا لكون الاطوار الكونيدية للفطر واضحة صارت لها الافضلية في الدراسة التصنيفية على الاطوار الكاملة حيث تتكاثر أكثر الانواع التابعة لجنس *Aspergillus* spp. تكاثرا لا جنسيا , الا ان هناك بعض الانواع تتكاثر جنسيا حيث تسلك سلوك الفطريات الكيسية بتكوين سبورات كيسيه (Ascospores) منتظمة داخل اكياس (Asci) وتكون الاخيرة مطمورة ضمن جسم ثمري نوع (Cleistothecium) (Pitt and Hocking , 1997) .

ينتج الفطر *Aspergillus* spp. الغزل الفطري الخضري (Vegetative mycelium) الذي هو عبارة عن خيوط فطرية متشابكة , ملونة او عديمة اللون واحيانا شاحبة او لماعة , مقسمة داخليا الى خلايا , تحتوي كل خلية على عدد من الانوية تنتشر في السايتوبلازم (Klich ,2002).

اما الحامل الكونيدي (Conidiophore) فينشا عمودياً من الخلية القدمية (Foot cell) في الخيط الخضري , وهي تعتبر من الصفات التشخيصية المميزة لجنس *Aspergillus* spp. عن الفطريات التابعة للأجناس القريبة منها مثل *Penicillium* spp. (Pitt and Hocking ,1997) . والحوامل الكونيدية تكون دائما غير متفرعة , غالبا غير مقسمة وعديمة اللون في جميع انواع *Aspergillus* spp. الممرضة . وقد يحتوي الحامل الكونيدي في انواع قليلة على حاجز او حاجزين في حالات نادرة . تتسع

قمة الحامل الكونيدي لتكون ما يعرف بالراس الكونيدي (Conidial Head) المتكونة من الحويصلة (Vesicle) والتراكيب القارورية (Phialides) وسلاسل الكونيدات (Condial Chaines) . يتحدد شكل الرؤوس الكونيدية بشكل الحوصلة وترتيب التراكيب القارورية عليها , اما لونها فيشتق من لون الكونيدات التي تحملها, ويعد كل من لون وشكل وحجم الرؤوس الكونيدية من بين المقاييس التي يعتمد عليها في تحديد الانواع التابعة لجنس *Aspergillus* (Samson and Pitt, 1990) .

تتخذ الحوصلة (Vesicle) اشكالا مختلفة كروية , شبه كروية , اهليجية , دورقية او صولجانيه . وتنشا التراكيب القارورية (Phialides) على السطح الخارجي لها , وتكون بصف واحد من الفياليد(Uniseriate phialides) او صفين (Biseriate phialides). في الانواع ثنائية الصف والصفوف الاولية من الخلايا (التراكيب القارورية الاولية) عادة تكون اثنان او ثلاثة من التراكيب القارورية الثانوية (De-Hoog *et al*., 2000) . وقد تغطي الفياليدات سطح الحوصلة الكروية بالكامل كما في *A. niger* , *A.ochraceus* , *A.candidus* , او قد تغطي النصف العلوي من سطح الحوصلة المخروطية الشكل كما في *A.terreus* , *A.fumigatus* (Samson,1994).

في حقلِ التقنيات الحيوية , يمثل جنس *Aspergillus* ثروة ثمينة إلى علم الأحياء الدقيقة لقدرتها على انتاج العديد من المواد المفيدة صناعياً , ولها تاريخ طويل في التطبيقات الصناعية كما يعد أكثر الأحياء المجهرية المستخدمة في التقنيات الحيوية والوراثية وفي الصناعات الغذائية والمواد الصيدلانية إذ أستخدم لعقود عدة في أنتاج كثير من الانزيمات الخارجية (Exoenzymes) والكحول والاحماض العضوية بصورة تجارية مثل (cellulase , amylases , lipases , xylanases , glucoamylase , citric acid) (Leipner and Saller, 2000) , على الرغم من أن البكتريا معروفة في إنتاجها للأنزيمات الصناعية إلا أن الفطريات تعد أفضل في إنتاجها لأنها تصنف ضمن قائمة المواد الأمينة بشكل عام Generally Regarded As Safe (GRAS) (Shuster *et al*.,2002) .

ويعد الفطر *A.niger* كائنا حياً مجهريا صناعيا مهما لإنتاج الاحماض العضوية والبروتينات أحادية الخلية بالتخمر (Majumder *et al*., 2010) , كما يعتبر من أهم أنواع جنس *Aspergillus* التي استخدمت في انتاج الكتلة الحيوية والبروتين أحادي الخلية SCP من المخلفات الزراعية (Ravinder *et al*.,2003) .

وذكر Olempska وآخرون (2006) أمكانية استخلاص وتنقية انزيم الاسبرجينيز (Asparginase) من بعض أنواع فطر *Aspergillus* spp. ويبين أهمية هذا الأنزيم الذي يعمل على التحلل المائي (Hydrolysis) للأسبارجين (L-asparagine) الموجود في الأغذية ويحوله إلى حامض

الاسبارتك (L-aspartic acid) وأمونيا (ammonia) وبذلك يمنع تحول الاسبارجين إلى اكريلاميد (Acrylamide) الذي يعتبر مادة مسرطنة للإنسان .

الفطر أثبت *A. nidulans* فاعليته في العديد من الدراسات الوراثية بوصفه نظاماً بيولوجياً للكشف عن القدرات التطفيرية للعديد من المواد المطفرة , حيث كشفت عن آفاق واسعة يمكن ان تسهم بها ليس من اجل تعميق المعرفة العلمية بالفطريات , على اهميتها البالغة ككل ولكن الاسهام من خلال كشف الاسرار الوراثية للأحياء ككل (شريف . 2012c) .

1.1.2.أمراضية الفطر *Aspergillus* spp.

أوضحت معظم البيانات ونتائج الدراسات التجريبية إلى أن الانواع العائدة إلى جنس *Aspergillus* spp. تتمكن من إحداث الإصابة بداء الرشاشيات Aspergillosis بواحدة من الصور الثلاث المتمثلة بالعدوى (Infection) والحساسية (Allergy) والسمية (Toxicity) وأن كل صورة من هذه الصور يكون المرض الحادث مرتبطاً بضراوة الفطر المتخصص (Seltzer and Fedoruk , 2007) .

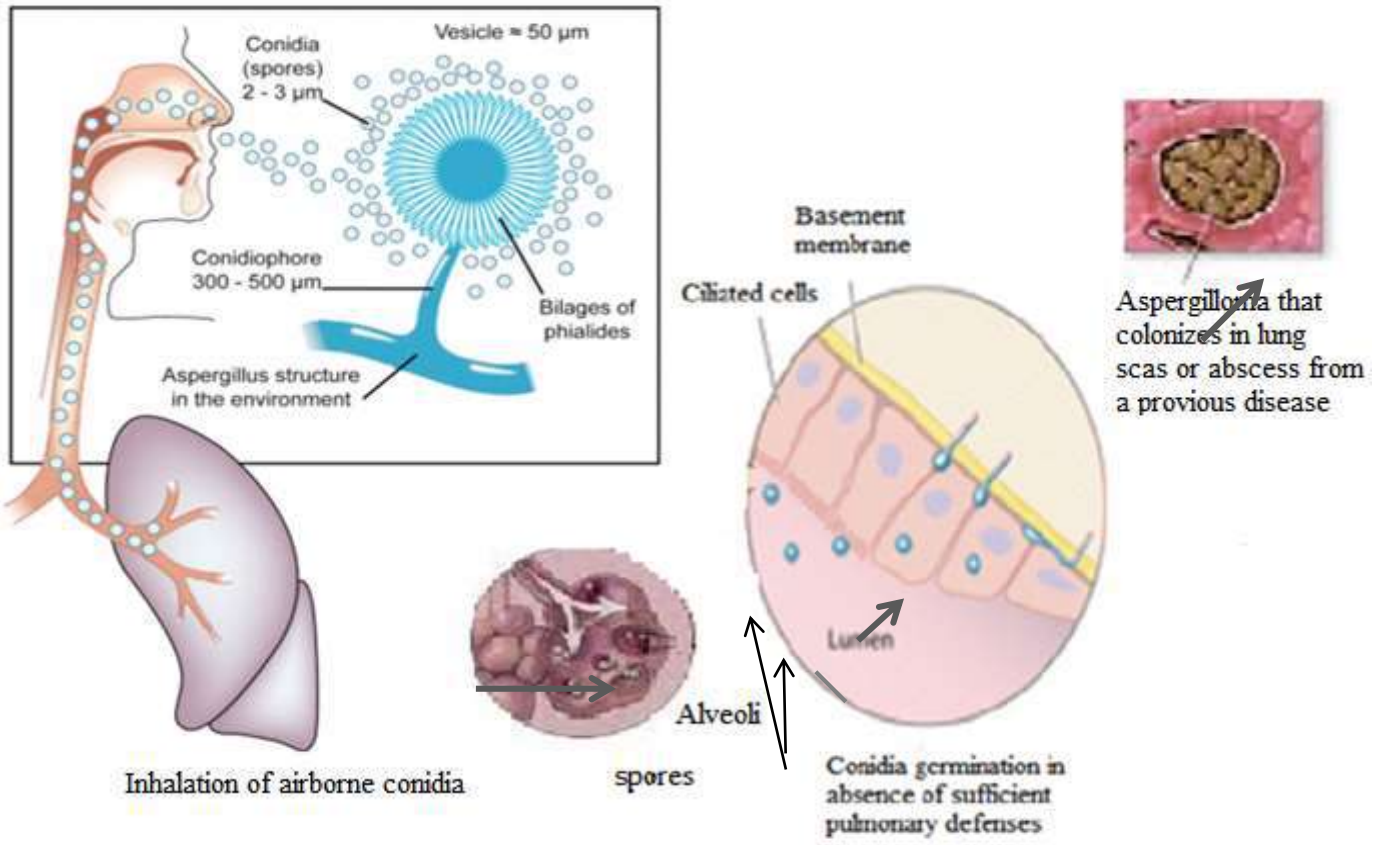
علاوة على ذلك فإن الانواع التابعة لجنس *Aspergillus* spp. , تعد من الفطريات التي كيفت ابواغها للانتشار بوساطة الهواء باعتباره وسيلة الانتشار الأكفأ لوحداته التكاثرية (Huang , 2007) . لذا فان الهواء يزخر بمئات من العوالق الجرثومية التي يستنشقها البشر من دون عواقب سلبية باستثناء اقلية من الناس الذين يعانون الوهن المناعي (Immune Suppressed) وبذلك فان الهواء قد يكون المحفز الأول لظهور امراض Aspergillosis عن طريق الآليات التحسسية (Allergic mechanisms) بأعراض سريرية مشابهة لأمراض الحساسية والربو لمن لديهم الاستعداد للإصابة (Panda *et al*,.2009) لكونها فطريات ضعيفة القدرة الإمراضية أو غير ممرضة إلا أذا انخفضت مناعة العائل لدرجة معينة تمكن الفطر من تحقيق الإصابة (Ellis , 2007) . يدخل اللقاح الفطري الى الجهاز التنفسي بشكل أساسي عن طريق الاستنشاق لذا تعد الرئتان من الاعضاء الاكثر تعرضا للإصابة وهي البوابة الرئيسة لدخول الممرضات إلى الجسم (Latge , 1999) .

إلى جانب التأثيرات المباشرة من جراء التعرض المباشر لكونيدات الفطريات كشفت دراسة مسحية للتلوث الفطري للهواء بأن الأهمية لا تكمن فقط بوجود أبواغ الفطريات بالهواء وإنما في الأيضيات السامة التي يمكن أن تكون محمولة عليها (Gorny *et al.*,2002) , ومن المعروف جيداً أن الفطر *Aspergillus* spp. منتجاً فعالاً للسموم الفطرية , حيث وجد Engelhart وآخرون (2002) أن الغبار على سجادة الغرفة الرطبة التي تحتوي ابواغ الفطر *Aspergillus vrsicolor* بتركيز

10^4X0.13بوغ / غم تحتوي أيضاً على آثار السم (Sterigmatocystin) بتركيز (2-4) نانو غرام / غم من الغبار .

في حين كشفت دراسة Latge (1999) أن *A. fumigatus* تحرر إلى الهواء أعداد هائلة من الكونيدات المتميزة بصغر حجمها وقلة كثافتها النوعية , بأعداد تصل إلى (200) وحدة مكونة للمستعمرة (و م م) في هواء البيئات النظيفة و(10^7) قرب المواد المتخمرة و(10^{11}) في هواء القش والمواد المتعفنة , وأن هذه الكونيدات تحتوي على نسبة عالية من السموم الفطرية الأركوتية مقدارها 1% من وزنها , إذ أشار Panaccione and Coyle (2005) إلى أن كونيدات هذا الفطر تحتوي على (4) أنواع على الاقل من السموم الأركوتية هي بحسب تركيزها C Fumigaclavine و Festuclavine و Fumigaclavine A و Fumigaclavine B . وعند اعتبار أن استنشاق الهواء في التنفس يكون بمعدل (0.630 $م^3$ /الساعة) فإن أخذ سموم الفطر على الكونيدات سيكون بمعدل (0.73 بيكوغرام/ ساعة) في ظروف 200 و م م /$م^3$ إلى (0.81 ملغم/ساعة) في ظروف 10^{11} و م م / $م^3$, علماً أن جرعة المثير السمي الأركوتي العالي الفعالية (LSD) هي 20 إلى 80 ميكروغرام (شريف , 2012a) , وبالتالي يؤدي إلى حصول حالة التليف الخلالي الرئوي (Pulmonary interstitial fibrosis) بالإضافة إلى أمكانية حصول سرطان الرئة (Dominguez and Gaytam , 2001) .

علاوة على ذلك , فإن لمركبات جدران خلايا فطر *Aspergillus* spp. مثل (β-,31-D-Glucans) فاعلية في خفض المناعة وتحفيزاً لانقسام الخلايا وتحولها Mutogenic وذات تأثيرات التهابية تؤثر سلباً على الخلايا اللمفية (American Academy of Pdiatrics , 1998) . فضلاً عن امتلاكها انزيمات محللة لكريات الدم الحمراء Hemolysins تسهم بشكل كبير في أمراضيتها اذ تسبب تحطم كريات الدم الحمراء (Tortora *et al*.,2002) وتأخر في الوقت اللازم لتجلط الدم (Delay Blood Clotting) وقد يرجع السبب في ذلك إلى الإعاقة الحاصلة في كل من مادة سابق الخثرين (Prothrombin) بالإضافة إلى عوامل أخرى , فقد وجد أن إعطاء جرعة واحدة من أحدى منتجات الايض الثانوية لفطر *Aspergillus* أدت إلى حصول زيادة في انزيمات البلازما Transferasesومادة البيلروبين (Bilirubin) والتي قد تكون مؤشراً لحصول التحطم الكبدي (AST , 2003) .



الشكل (2 - 1) : رسم تخطيطي يوضح حدوث الإصابة الرئوية بمرض Aspergillosis (Jombo *et al.*,2010) .

2.1.2. الانماط السريرية للإصابة بالرشاشيات Aspergillosis

توجد اربعة اشكال للإصابة الرئوية بالفطر *Aspergillus* spp. (Salvo , 2004) :

♦ داء الرشاشيات الرئوي ـ القصبي التحسسي

(Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis)

هذا النوع من الحساسية عبارة عن مضاعفات تحدث في بعض المرضى الذين يعانون من حالة الربو أو التليف الكيسي (Cystic Fibrosis) بنسبة تقدر (6-25 %) تبدء بشكل اعتلالات تنفسية بفعل تفاعلات فرط الحساسية التي تحدث نتيجة استنشاق كونيدات الفطر *Aspergillus* spp. التي يقل قطرها عن (5) ميكروميتر لقدرتها على اختراق المجاري الهوائية السفلى , وحيث أن أبواغ الفطريات مختلفة

الأحجام فإنها يمكن أن تحدث حساسيات الأجزاء العليا والسفلى في القناة التنفسية ويمكن أن يتطور إلى تليف المجاري التنفسية (Bronchiolitis Obliterans) (Steinbach and Stevens ,2003) , كذلك في المرضى الذين يتعاطون علاجات الكورتيكوستيرويد لمدة طويلة , بنسبة 1-2 % (Denning *et al*., 2006) . العلامات السريرية تمثل شكلاً متطرفاً من اشكال الربو ناتج عن الالتهابات والانسداد القصبي الرئوي مصحوباً بالحمى ونفث لدم ولعاب قيحي والام بالصدر مع أزيز(Wheeze) (Denning *et al*.,2006). غالبا يعتمد التشخيص مزيجاً من العلامات السريرية والشعاعية والمعلومات المختبرية حيث تظهر الادلة الشعاعية ارتشاحات رئوية وتوسع القصبات المركزية (Central Bronchiectasis) وتليف المجاري التنفسية الصغيرة (Knutsen *et al*., 2005) . أكثر الأنواع تسبباً للمرض هو *A. fumigatus* (Khurana , 2002) .

♦ الورم الرشاشي او الورمه الفطرية (Aspergilloma or Fungus Ball)

الاسبرجلوما هي عبارة عن تطور متسلسل في تجويف الرئة لنمو الفطر المسبب فيها مكونا ورمه فطرية (Fungus Ball) تتكون نتيجة لتجمع خيوط الفطر *Aspergillus* والفايبرين والمادة المخاطية وحطام الخلايا في مساحات مفتوحة من الرئة , لذا فهي تشاهد بشكل نموذجي في تجاويف رئات مرضى التدرن الرئوي والمصابين بأمراض اخرى مثل Histoplasmosis , Sarcoidosis , Bullous Emphysema , Fibrotic lung disease , وكذلك Pneumonia في مرضى الايدز , (Patterson 2003) . وتعد هذه الاصابة من اكثر الاصابات ترددا واكثرها تميزا عن باقي الاصابات الرئوية بفطر *Aspergillus* ولوحظ ان كل انواع *Aspergillus* spp. ممكن ان تصيب الرئة مكونة الاسبرجلوما (Denning ,2001). وعامة فهي اصابات غير منتشرة , ومع ذلك ممكن ان يحدث انتشار موضعي نتيجة لوجود المستعمرات حول النسيج الحشوي او الفجوات الدموية وبالتالي تتطور الحالة الى حدوث تنخر ومن ثم انتشار المسبب المرضي (Kawamura *et al*., 2000) .

♦ داء الرشاشيات الغازية (Invasive Aspergillosis)

وان كان المرض رئوي بالأساس لكن من خلال مرافقته للإنسان وعبر تدهوره المناعي تكيف الفطر *Aspergillus* وطور آليات تمكنه من الانتشار إلى انسجة الجسم المختلفة ومقاومة المتبقي من ردود الفعل المناعية وتحمل ظروف التغذية المنخفضة وقلة الاوكسجين وتغيرات الازموزية من خلال التنخر الحاصل في الجدار الحشوي الرئوي مما يسبب النزيف , وبالتالي التهاب الشغاف (Endocarditis)فالانتشار (Diaz and Lopez , 2004) . ويحتل المرتبة الثانية بعد الفطر

Candida في التهاب نخاع العظم (Osteomyelitis) والتهاب الاذن (Otomycosis) واصابات الجلد (Moreno *et al*., 2000) . والغزو الشديد للأنسجة يمكن ان يحدث وفيات مهمة بمعدل (30 - 95 %) (شريف , 2012b) ويعد داء الرشاشيات الغازي اكثر الامراض الخطرة انتشارا والذي يسببه *Aspergillus* spp. (Denning , 2003) . وقد لوحظ بان حدوث الاصابات الفطرية الغازية تزداد بشكل كبير في مرضى العوز المناعي (Soubain and Chandrasekar , 2002) .

♦ **ذات الرئة الرشاشي التنخري المزمن**

(Chronic Necrotizing *Aspergillus* Pneumonia)

وتسمى أيضاً الإصابة شبه الغازية , إذ تعرف بأنها إصابة رئوية موضعية ناتجة عن تنخر النسيج الحشوي الرئوي بفعل غزو المسبب الفطري لتلك الانسجة من دون أن يغزو الاسناخ الرئوية وبالتالي فإنه لا ينتشر إلى بقية أعضاء الجسم وهذا ما يميزه عن داء الرشاشيات الغازي (IA) (Baughman , 1999) . وأن أغلب الحالات المسجلة كانت في مرضى كبار السن الذين يخضعون إلى عمليات الاستئصال الرئوي أو غالباً مرضى التدرن الرئوي (Kato *et al*.,2002) أن أعراض المرض تشمل سعال وألم جنبي مصحوب بضيق التنفس ولعاب قيحي مع ارتفاع لدرجات الحرارة وغالباً ما تحدث الوفيات بنسبة (10-40 %) , كما أن الصور الشعاعية يمكن أن تظهر بقعاً راشحيه وخاصة في الجزء العلوي من الرئة (Franquet *et al*., 2000) .

3.1.2. العوامل المهيئة للإصابة الرشاشية

Predisposing factors for Aspergillus infection

على ضوء ما ورد سالف الذكر, يتبين أن قدرة الفطر *Aspergillus* spp. على أحداث الإصابة هي ظاهرة عرضية , لان الإمراضية لا تمثل حاجة أساسية من أجل بقاء وانتشار الفطر , وتعتمد بالدرجة الأولى على الحالة المناعية للأشخاص المرضى والتعرض البيئي للقاح الفطر ومن ثم ضراوة الممرض . وعليه فأن هناك مجموعة من العوامل التي تعتبر عوامل خطورة للإصابة بداء الرشاشيات وهي :

1. داء السكري Diabetes Mellitus

يُعرف داء السكري بأنه مجموعة من الاضطرابات الايضية المزمنة والتي قد تكون ناتجة عن امراض المناعة الذاتية , كما في داء السكري من النوع الاول (Type 1 diabetes) , تؤدي لارتفاع

مزمن في مستوى سكر الكلوكوز بالدم Hyperglycemia ، بسبب النقص بإفراز الأنسولين ، عمل الأنسولين ، او كلاهما (Guthrie and Guthrie ,2009) , لذا فان المصابين بداء السكري يحدث عندهم قصورا في اليات الدفاع المناعية الخلوية والخلطية , وذلك بسبب القصور في وظيفة الخلايا البيض العدلة (Neutrophils) والخلايا اللمفية البائية والتائية (Lymphocyte T&B) , وبالتالي فالقصور الحاصل في وظيفة هذه الخلايا يسهم في زيادة الاستعداد للإصابة بداء Aspergillosis وهي حالة شائعة لدى مرضى داء السكري غير المسيطر عليه (Uncontrolled) (Al-saif , 2009; Infer,2000) .

2. التثبيط المناعي Immune Suppression

تزداد نسبة الإصابة عند المرضى شديدي الاعتلال (Immune Suppressed Patients) مثل مرضى الإيدز (HIV) , ومرضى ابيضاض الدم (Leukaemia) ومستلمي زرع نخاع العظم (Bone Marrow Trancplant Recipients) والعلاج بالستيرويدات القشرية ومركبات الكورتيزون والإدمان على المخدرات والكحول والتدخين أو أي عامل يسبب قصوراً في الجهاز المناعي نحو المناعة الخلوية خاصة (Vazques and Sobel , 2004) . حيث وجَد Garbino (2005) أن نسبة حدوث داء الرشاشيات الغازي (IA) في الأشخاص مستلمي نخاع العظم ما بين (1-3 %) و (1.5-4%) في الأشخاص مستلمي زرع الكبد و(10%) لمستلمي زراعة الرئة و(14%) لمستلمي زرع القلب . ومن الدراسات التي أجريت على مرضى نقل الأعضاء (الكبد) وجد Torres *et al.*, (2000) أن الفطر *Aspergillus* spp. عزل من الجهاز التنفسي ل(19 %) من مرضى نقل الاعضاء المشمولين بالدراسة .

3. الاستعمال المتكرر والعشوائي للأدوية Randomized and repeated uses of drugs

إن لاستخدام المضادات الحيوية (Antibiotics) من قبل المريض بشكل عشوائي وغير مبرر من دون الاستشارة الطبية أو الحاجة الفعلية لها أو مراعاة مساوئها يؤدي إلى انخفاض مفعولها العلاجي في الأوقات التي يحتاج اليها المريض , نتيجة لتطور الاحياء لسلالات مقاومة تتحمل تأثير كمية المضادات من جراء الاعتياد عليها فتفقد بذلك الغرض والفائدة من استخدامها , فضلاً عن التأثيرات الجانبية الأخرى التي تسبب اعتلال دفاعات الجسم مما يشجع على نمو الفطريات وتكاثرها وانتشارها وزيادة ضراوتها لخلايا العائل (الموسوي , 2006) .

4.1.2. التشخيص المختبري Laboratory Diagnosis

أن التشخيص الحقيقي للإصابة بفطر *Aspergillus* spp. يعتمد على عزل وتشخيص المسبب وذلك بالاستناد على الفحص المجهري المباشر والزرع المختبري باعتبارها وسائل تشخيصية مؤكدة (Larone , 2002) , حيث يوفر التشخيص المجهري المباشر (Direct examination) المعلومات التشخيصية السريعة نظراً لطول المدة التي يستغرقها الزرع المختبري , فوجود الخيوط الفطرية لفطر *Aspergillus* تحت المجهر يعزز مسؤوليته عن المرض عند عزله على الوسط الزرعي (Howard *et al*., 1994) .

وقد بينت الدراسات الحديثة ضرورة الانتباه إلى عدم إهمال العزلات التابعة للفطريات غير المعروفة بإمراضيتها حيث تبين أحدى الدراسات ان حوالي (245) عزلة من اصل (1209) من عزلات الفطر *Aspergillus* من مرضى المستشفيات هي مسببات مرض Aspergillosis . علماً ان ظهور أي فطر في المستعمرة لا يعني أنه مسبب مرضي بالضرورة (شريف , 2012a) .

وقد ذكر Pabuccuoglu (2005) انه من الممكن تشخيص الإصابة بالفطر *Aspergillus* من خلال تكوين بلورات اوكزالات الكالسيوم حيث وُجد أن بعض أنواع الفطر *Aspergillus* تنتج حامض الاوكزالك Oxalic Acid الذي يتفاعل مع الكالسيوم Calcium الموجود في الدم أو الأنسجة مكونة اوكزالات الكالسيوم (Calcium oxalate)

وأن اختلاف سلالات الفطر وظهور الطفرات تعقد عملية ثبات التشخيص المورفولوجي الدقيق , فثمة تغيرات كيميوحيوية ضمن النوع الواحد من الفطريات خلال دورة نموه , لذا فأن توفير تقنيات تضخيم الحامض النووي بوساطة جهاز (Polymerase Chain Reaction) لتضخيم مناطق معينة من (DNA) المستخلصة ثم تكون هذه النماذج لعزل القطع المفردة ويدرس تتابع قواعدها وقد مكنت هذه الطرائق من كشف وجود وسيلة دقيقة وسريعة لتشخيص الفطريات عموماً بما فيها الفطريات الطبية (Binstock , 2007). وأن هذه الطرائق المعتمدة على جهاز PCR- المحدد البادئ هي عملية سريعة ولا تعتمد على الصفات المظهرية أو الكيميوحيوية والمعتمدة في التشخيص المختبري للفطريات (Brillowska-Dabrowska *et al*. , 2007) .

فقد تمكن الباحث Yuan *et al*., (1995) من التمييز بين الفطرين *A.parasiticus* و *A.sojae* اعتماداً على التقنيات الجزيئية باستخدام البوادئ العشوائية (Random Amplification of polymeric DNA) . فمقارنة جينوم الفطريات الكثيرة التقارب مظهرياً وحتى من ناحية النمو التطوري تبين وجود ميل للافتراق الوراثي من خلال الاختلافات الواضحة في تتابع القواعد النيتروجينية

لجينوماتها . فعند مقارنة جينومات (3) أنواع من فطريات *Aspergillus* وهي *A. fumigatus* , *A. nidulans* و*A. oryzae* يتبين وجود تماثل في التتابعات لا تتجاوز (68%) بين أي زوج منهم , بل توجد فروقات كثيرة في التتابعات بين عزلات النوع نفسه (Paoletti and Saupe, 2008) . وبتقدم التقنيات الجزيئية واستخدام التحليلات المتعددة الوراثية بين انواع الفطر ذات السبورات الصغيرة المتسلسلة للعائل الخاص ونوع *Alternaria alternate* يجعلنا نتوقع بان هذه الانواع يمكن تصنيفها بانها تتبع نوعاً احيائياً واحداً (Pryor and Michailides , 2002) .

وتطبيقاً لهذا الاتجاه فقد أشار السعيدي (2013) عند دراسته التشخيص الجزيئي لثلاث أنواع من الفطريات المعزولة من جذور الحنطة والترب المحيطة بها وهي *A.niger* , *A. alternate* , *P. digitatum* باستخدام تحليل التتابع لكل من البوادئ *ITS* و *AA* و *PDMT* واختبار تقنية التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR) إلى أمكانية التشخيص السريع لهذه الانواع .

2.2. النباتات الطبية Medicinal plants

يدعى النبات نباتا طبيا اذا امتلك عضو على الاقل من اعضائه خصائص علاجية (النوري وآخرون,2009) . وقد عرف العالم Dragendroff ان كل شيء من اصل نباتي يستعمل طبيا فهو نبات طبي (هيكل وعمر,1998) , وبشكل اكثر دقة , النبات الذي يحتوي في عضو او اكثر من اعضائه المختلفة على مادة كيميائية فعالة واحدة او اكثر بتراكيز منخفضة او مرتفعة , ولها القدرة الفيزيولوجية على معالجة مرض معين او على الاقل التقليل من اعراض الاصابة بهذا المرض اذا اعطيت للمريض في صورتها النقية او في صورة عشب نباتي طازج او مجفف او مستخلص جزئيا (العبيدي ,2000) . عامة ينتج النبات المركبات الكيميائية الثانوية من مركبات الايض الاولية اثناء العمليات الحياتية لها , والتي توجد داخل انسجة النبات بشكل ثلاث مجاميع رئيسة هي المركبات الفينولية ,القلوانية والتربينية كمواد دفاعية يحمي بها نفسه من الاحياء المجهرية والحشرات والنيماتودا(Parekh and Chanda ,2008). ومن الجدير بالذكران الاستعمال التقليدي كان ولايزال هو الاساس الذي تنطلق منه دراسة النشاطات الفيزيولوجية او الطبية لأي دواء نباتي الاصل , وذلك من خلال استخدامه في مجال الطب الشعبي بوصفة تقليدية محددة , فان اول عمل يقوم به الباحث هو استخلاص وتنقية جميع المكونات الفعالة المعروفة من اعضاء النبات المختلفة ثم دراسة خواص المادة وصفاتها الكيميائية وتعين التركيب البنائي , مع اجراء البحوث المعمقة لدراسة التأثيرات السمية والعلاجية والجرعات المسموح بها ودواعي استعمالاتها من عدمه (Allison ,2008) .

ولوحظ ان من الطرائق الحالية المستخدمة بنجاح في علاج الاصابات الجرثومية هي المستخلصات النباتية كبدائل واعدة عن طريق المقاومة الكيميائية التي لها اضرار على الصحة وخاصة عند الاستخدام المفرط وغير المبرر (Ncube *et al.*,2008) , فالمستخلصات النباتية فضلا عن كونها فاعلة في مقاومة المسببات الفطرية والبكتيرية على حد سواء, فهي رخيصة الثمن وامنة الاستخدام ومتوفرة بكثرة بالطبيعة لذا يسهل الحصول عليها , ويعد ذلك من مزايا العلاج بالعقاقير النباتية (Das Anudwipa *et al.*,2008).

وبالنظر لان المضادات الحيوية توفر الاساس الرئيس لعلاج الامراض البشرية , وبالتالي هناك زيادة في التحقيقات على النباتات كمصدر لإدارة علاج الامراض التي تصيب البشر(Woldmichael *et al.*, 2003) نظرا لكون العديد من مضادات الحياة الكيميائية للبكتريا والفطريات قد أخفقت في تأثيرها على بعض العزلات البكتيرية او الفطرية والسبب يعود الى ان هذه العزلات اصبحت مقاومة للكثير من مضادات الحياة المصنعة (Aledort *et al.*, 2000) , لذا اعطى الباحثون اهتماما متنامياً يتمثل بدراسة العلاقة فيما بين المكونات النباتية للنبات وفاعليته الصيدلانية من خلال استعمال هذه الاعشاب كمصادر طبية وتطويرها بالاعتماد على مواقع نموها الطبيعي Local Botanial Floral , فضلا عن الأسباب الاتية :(Vaidya and Antarkar ,1994)

- ان المواد المصنعة مختبريا لا تعطي في أكثر الاحيان التأثير الفسيولوجي نفسه الذي تعطيه المواد المستخلصة من النباتات .
- ان النبات الواحد يتضمن اكثر من مادة فعالة تعمل مع بعضها بشكل تأزري وتكاملي لعلاج الامراض وهي صفة لا تتضمنها العقاقير المصنعة .
- ان بعض المستخلصات النباتية لم يتمكن العلم الحديث من تصنيع تراكيب مشابهة لها مختبريا على الرغم من اهميتها مثل الهايوسيامين المستخرج من نبات الهايوسيامين *Hyocyamin muticus* والهايوسين من نبات الداتورا *Datura stramonium* وغيرها .
- تمتاز العقاقير المستخلصة من النباتات بقدرتها العالية في معالجة الكثير من الامراض خلافاً للأدوية الاعتيادية
- الاثر النفسي الجيد لاستخدام العقاقير المستخلصة من النباتات .

1.3.2. نبات القسط الهندي *Costus speciosus* Koen. (Keu, Crape ginger)

يعرف عربيا باسم القسْط' :بضم القاف وسكون السين (العلياني وآخرون , 2011) .وله اسماء اخرى بحسب المنطقة المتواجد فيها, . ينتمي الى العائلة Costaceae (Zingiberaceae) . (Srivastava *et al*., 2011)

النبات عشبي ,معمر, دائم الخضرة, منتصب بارتفاع يصل 2.7 متر طولا , معتدل النمو , حيث يزدهر النبات في المناطق الضليلة تحت الغابات النفضة ذات الترب الرطبة الغنية بالمواد العضوية . الاوراق من النوع البسيط ,ذات شكل بيضوي الى مستطيل Oblong-Lancoelant ابعادها 15-35cm X 6-10cm تقريبا ,حوافها متموجة وتعرق متوازي, تتبادل الترتيب على الساق بشكل حلزوني , لونها اخضر زاهي .اما الازهار عطرية, مخروطية الشكل , طرفية الموقع .بينما الثمار كبسوليه الشكل قطرها 2سم خضراء اللون ,البذور سوداء كروية الشكل .تتميز السيقان متعددة كثيرة الفروع ذات غمد سميك ولونها اخضر مائل الى الحمرة ,وتكون الجذور افقية النمو غير مشكلة (Warrier *et al*.,1994; Sivarajan and Balachandran,1994; Kirtikar and Basu ,1987) . يزهر النبات خلال شهر ايلول ليضفي على مكان وجوده زخرفة مميزة , ينتشر في عموم الهند ويفضل الاجواء الاستوائية وشبه الاستوائية لاسيما مرتفعات الهيمالايا (Anonymous ,2007) كذلك يكثر في باكستان وتايوان وماليزيا وسريلانكا والنيبال والصين (Gupta ,2010).

شكل (2- 2) صورة فوتوغرافية لنبات *C. speciosus* . (Bhogaonkar *et al*., 2012)

وتبعا لتصنيف (لورانس,1969) ,والوارد في (Srivastava *et al*.,2011) فان تصنيفه كالتالي:

Kingdom:	Plantae
SubKindom:	Tracheobinota
SuperDivision:	Spermatophta
Division:	Mangoliophyta
Class:	Liliopsida
SubClass:	Zingiberidae
Order:	Zingiberales
Family:	Costaceae
Genus:	*Costus*
Species :	*Speciosus*

2.3.2. فوائد القسط واستعمالاته الطبية في السنة :

يعد الطب النبوي الذي اورثه لنا رسولنا الكريم سيدنا محمد ﷺ هو الاعجاز الذي وقف عليه اليوم العلم الحديث في تفسير ادق نتائجه , حيث اوصانا ﷺ بالتداوي بالقسط الهندي من خلال حديثه ﷺ (**عليكم بهذا العود الهندي , فان فيه سبعة اشفية : يستعط به العذرة ,ويلد به من ذات الجنب**) رواه البخاري (٥٦٩٢). وقد فسر اسماعيل (2008) ان المقصود بالسعوط في الحديث النبوي الشريف هو الاستنشاق بالقسط عن طريق الانف , ويكون ذلك عند الاصابة بأمراض الجهاز التنفسي عامة كالربو ونزلات البرد والتهاب اللوزتين والحلق والبلعوم والسعال والسل . والعذرة (بضم العين) وجع في الحلق يهيج من الدم .وهذا التفسير يوافق في الطب امراض الحلق التي تترافق- باحتقان دموي سواء اكان التهاب لوزات او التهاب لهاة ام التهاب بلعوم , كما انه يحل البلغم المتجمد في القصبة الهوائية ويسهل عملية التقشع . ويفيد في معالجة الالتهابات الشعبية والرئوية بجميع انواعها بما في ذلك السل الرئوي لاسيما انه يعتبر مادة مطهرة تخفف من عسر التنفس وتحد من نوبات السعال الديكي , وهو ما ذكره (كامل , تذكرة داوود الانطاكي) . بالإضافة الى قوله (صلى الله عليه وسلم) **(لا تعذبوا صبيانكم بالغمز من العذرة وعليكم بالقسط)** رواه الترمذي(٢٠٧٩) (متولي ,2005) . ومن تلك الاحاديث النبوية الشريفة يتضح اهمية التداوي بالقسط الهندي في علاج امراض الجهاز التنفسي والتي تسببها بعض الاحياء الدقيقة المجهرية مثل بعض الانواع التابعة لجنس *Aspergillus*

قال الموفق البغدادي :(وفي جمعه صلى الله عليه وسلم بين القسط والحجامة سر لطيف وهو انه اذا طلي به مشرط الحجامة لم يتخلف في الجلد اثر المشرط وهذه من غرائب الطب , فان هذه الاثار اذا نبتت في الجلد قد تبدو لمن راها انها بهق و الطباع تنفر من هذه الاثار(العلياني وآخرون ,2011)

ويتضح لنا مما سبق بأن إظهار الإعجاز العلمي في الأحاديث النبوية التي ذكرت في السابق كان منصباً على عجز الجنب فقط ولكن لو تمعنا في الأحاديث النبوية السابقة , لوجدناها تحمل بين معانيها أكثر من إعجاز علمي واحد والذي يظهر من خلال , استخدام جذور من هذه النباتات كمصدر بديل Diosgenin وتستخدم عادة للسيطرة على مرض السكري (ابن القيم الجوزية وآخرون ,2004) .

3.3.2. الخصائص البيولوجية لنبات القسط *C.speciosus*

نبات القسط كان هدفاً للعديد من الدراسات نتيجة لاختلاف المركبات التي يحتويها واهميتها من الناحية البيولوجية ولخصائصها الطبية والصيدلانية , حيث افادت التجارب التمهيدية التي اجريت من (Dutt *et al*., 1960 ; Sastry and Dutta , 1961) فعالية القسط كعلاج مفيد ضد التهاب القصبات الهوائية المزمن والربو . من جهة اخرى , فان الحقن بالأجزاء الهوائية لنبات *C. speciosus* تفيد في معالجة البرودة وقرحة الحناجر والاسهال (Cruz , 1965) . وفي البحث الذي اجراه Bhattacharya *et al*., (1972) لاحظ وجود قلويد يظهر نشاطاً Anticholinesterase ولذا قد يعزى هذا السبب الى استخدم النبات في علاج امراض العيون . واظهرت مركبات الصابونين لنبات القسط *C. speciosus* وجود نشاط مضاد للخصوبة Antifertility مماثل لهرمون الاستروجين في الجرذان البيض (Tewari *et al*.,1973) , بينما اثبتت دراسة Banerji *et al* ., (1982) ان جميع مستخلصات نبات القسط اظهرت درجة معتدلة النشاط غير محدد مزيل للتشنج Spasmolytic عند اختباره على خنازير غينيا , على الرغم من ان النشاط كان ضعيفاً مقارنة بعقار Papaverine . كذلك اظهرت الزيوت الاساسية في جذور نبات القسط *C. speciosus* نشاطا مضادا للميكروبات (Asolkar *et al*., 1992) . وأفادت دراسة Woynarowski *et al*., (1997) التجريبية الاثر الوقائي لمستخلص نبات القسط في علاج

الامعاء المسرطنة حيث تحفز بعض مركباته الكيميائية موت الخلايا المبرمج في خلايا السرطان . ويعتبر نبات القسط المكون الرئيس ل Brahmyadi Ghanavati والمستخدم كضابط لارتفاع ضغط الدم (Rath *et al*.,1999) . وفي البحث الذي اجراه Otrero وآخرون (2000) وجد 13 من 74 مستخلصاً لنباتات القسط مستعملة من قبل المعالجين التقليديين للدغات الافاعي في المنطقة الشمالية الغربية لكولمبيا , وكانت المستخلصات فعالة ضد التأثير القاتل من سم Bothropsatrox وبينت دراستا Vigayalakshim and Sarada ,(2008) ; Devi and Urooj ,(2010) ان محتوى Polyphenol لمستخلصات نبات *C. speciosus* كانت عالية في الجذور وقشرة الجذع مقارنة بالأوراق وبالتالي فعالية هذه الاجزاء كمجاميع بديلة لمضادات التأكسد الصناعية . في حين ان مستخلص الكلوروفورم للأوراق اظهر نشاطا في كسح الجذور الحرة (Chakraborty ,2009) . ونتيجة للجهود المشتركة التي قام بها Daisy *et al*., (2009) ; Bavara and Narasimhacharya (2008) تبين الاثر الوقائي لمستخلص الهكسان والميثانول وخلات الثيل والبترول ايثر لجذور نبات القسط *C. speciosus* في خفض مستوى الكلوكوز في مصل الدم والمعايير البيوكيماوية للجرذان المصابة بداء السكري المستحث بوساطة Streptozotocin (STZ) (50mg/ml) , لذا يولى الاهتمام بها لعلاج حالة فرط السكر.

اوضحت النتائج العقاقيرية الحاصل عليها Verma and Khosa ,(2009) من النشاط الحيوي لمستخلص الايثانول لنبات القسط *C. Speciosus* , واستعمال جذوره لعلاج اضطرابات الكبد من خلال تقييم نشاط الكبد لذكور الجرذان المعاملة ب CCl_4 , لوحظ انخفاض كبير بمستويات أنزيمات الكبد SGOT , SGPT, ALKP بالمقارنة مع مجموعة السيطرة , مدعومة بدراسات التشريحية المرضية . كذلك عززت دراسة Binny *et al.* (2010) تأثير مستخلص الايثانول لجذور نبات القسط كمضاد لإلتهاب المفاصل الروماتزمي Anti-Infammatory المستحدثة في الحيوانات المختبرية مقارنة بالعقاقير القياسية , وخافض للحرارة Antipyretic properties التي يسببها . وكان لمساهمة Vishalakshi and Asna , (2010) دور في استكشاف نشاط المستخلص الكحولي لجذور *C. speciosus* ضد الشلل Adaptogenic المتسبب عن الاجهاد العصبي والناجم عن التغيرات بالنواقل العصبية في الدماغ.

4.3.2.الفعالية المضادة للميكروبات لنبات القسط *C. speciosus*

اثبتت العديد من الدراسات أن المستخلصات المستحصل عليها من نبات القسط *C. speciosus* فاعلية مضادة للمايكرو بات , فقد اسفرت ابحاث (Singh *et al*., 1992) في اختبار وتحليل النشاط

المضاد للفطريات لمركبات Steroid-saponine في مستخلصات جذور نبات القسط *C. speciosus* على ستة انواع من الفطريات الممرضة للنبات ومنها: *Penicillium* sp. , *Alternaria* sp. , *Aspergillus* sp. , *Botrytis fabae* , وتم اثبات القدرة التثبيطية العالية لإنبات ابواغ *Botrytis cineria* و *Alternaria* sp. . وعزت دراسة Ahmed and Abdelgalei (2005) هذا التأثير المثبط لمركبات Costunolide المعزولة من نبات القسط , بينما ذكر Moreira *et al*.,(2003) أن لحامض Coumaric acid المستخلص من جذور نبات القسط فاعلية مثبطة ضد بعض الأنواع الفطرية المسببة لأمراض النبات منها *Curvularia Penicillium* sp. *Cladosporium cladosporioides* sp. , *Colletotrichum* sp.و . في حين بينت دراسة Joji and Benna (2010) بجامعة فيمالا الهندية الاثر الفعال للزيوت الاساسية المستخلصة من نبات *C. speciosus* المضادة لعشرة سلالات بكتريا , *Bacillus cereus, Enterobacter faecalis , Salmonella paratyphi , Staphylococcus aureus , Escherichia coli , Streptococcus faecalis , Proteus vulgaris , Klebsiella pneumonia , Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* إذ أظهرت المستخلصات عامة نشاطاً ملحوظاً ضد جميع انواع البكتريا مقاربة من فعالية المضادات الحيوية المثالية التي استخدمت بالدراسة , وهذه الفاعلية قد أكدتها نتائج دراسة Aritharan *et al*.,(2012), كذلك أفادت دراسة للباحثين Manorama *et al*., (2013) الخصائص المضادة للبكتريا والفطريات مختبرياً (*in vitro*) وباستخدام الايثر البترولي والاسيتون والميثانول كمذيبات عضويه إذ أظهرت نشاطاً واسع الطيف لأنه كان نشطاً ضد كل من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام التي تم اختبارها وفاعلية مضادة لفطريات الاختبار مضاهية تماماً لعقار Itroconazole كمضاد للفطريات وذلك باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص.

3- المواد وطرائق العمل Materials and methods

أجريت هذه الدراسة في مختبرات قسم علوم الحياة /كلية العلوم/جامعة القادسة , وكلية الطب البيطري/جامعة القادسية ومختبرات العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية وشعبة الامراض الانتقالية في المستشفى التعليمي العام التابعة لمديرية صحة الديوانية .

1.1.3.الاجهزة والمستلزمات المختبرية .

استعملت الاجهزة المبينة في الجدول (3-1) لغرض تنفيذ التجارب الخاصة بهذه الدراسة .

جدول (3-1) الاجهزة المستخدمة بالتحارب ومنشأها .

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم الجهاز	
Japan	National	(Anatomy Tools)	أدوات التشريح
Turkey	Amal	(Burner)	بيرنر
Japan	G.F.L.	(Refrigerator)	الثلاجة
U.K.	Gallen Khamp	(Soxhlet extract)	جهاز الاستخلاص
England	Griffin	(Thermocycler PCR)	جهاز الدورات الحرارية
Germany	Centaure	(Centrifug)	جهاز الطرد المركزي
Germany	Lobbo	(U.V.Specteophyotometer)	جهاز المطياف الضوئي
Japan	G.F.L.	(Distillater)	جهاز تقطير الماء
Germany	Hettich EBAzo	(Eppendrofe centrifuge)	جهاز طرد مركزي خاص تقنيةPCR
Germany	Memert	(Incubator)	حاضنة
Turky	Eiectro-Mag	(Water bath)	حمام مائي
Germany	Memert	(Electric oven)	فرن كهربائي
England	Griffin	(Laminar flow cabinet)	كابينة زرع المجهري
Italy	Bio-rad	(Vortex mixer)	المازج الدوار
Germany	Daglef patz	(Rotaryvaeum evaporator)	المبخر الدوار
England	Griffin	(Lyophilizeder)	مجفد
USA	Lw scientific	(Microscope with camera)	مجهر تصوير
Japan	Olymps	(Light Microscopic compound)	مجهر ضوئي مركب
England	Gallenghamp	(Magnetic stirrer)	محرك مغناطيسي
U.K	Stewart	(Hot plate)	مسخن حراري
Germany	R.Tunge	(Rotary microtome)	المشرح الدوار
USA	Biostep	(U.V. transilluminate)	مصدر الاشعة فوق البنفسجية
England	Gallanghamp	(PH-meter)	مقياس الاس الهيدروجيني
Germany	Memert	(Autoclav)	موصده
India	Osaw	(Electric balance)	ميزان حساس
Switzerland	Melter	(Balance)	ميزان عادي
Italy	Bio-rad	(Electrophoresis unit)	وحدة الترحيل الكهربائي
England	Difco	(Millipore Filter unite)	وحدة الترشيح الدقيق
Germany	Sony	(Sony camera)	كاميرا صني

2.1.3. المواد الكيميائية والحياتية .

استعملت المواد الكيميائية الواردة بالجدول (٣-٢) لغرض تنفيذ التجارب الواردة في الدراسة.

جدول (٣-٢) المواد الكيميائية المستخدمة بالدراسة .

المنشأ	الشركة المصنعة	المادة	
France	Oxide	(Dimethylsulphoxide)	4-2 ثنائي مثيل امين
USA	Sigma	(Ethylene)	اثيلين كلايكول
England	BDH	(Ether)	ايثر
England	Hoechst	(Cotten blue)	ازرق القطن
England	BDH	(Actone)	اسيتون
India	Himedia	(Agar - Agar)	أكار – أكار
England	BDH	(Magnesium oxid)	اوكسيد المنغنيز
France	Oxide	(peptone)	الببتون
England	BDH	(Hydrogen peroxide)	بزوكسيد الهيدروجين
England	BDH	(TEP buffer)	بفر TEP
England	BDH	(sodium bicarbonate)	بكاربونات الصوديوم
England	BDH	Crystal violet	البلور البنفسجي
England	BDH	(phenol crystal)	بلورات
switzerland	Fluka	(pirmers)	البوادئ
Germany	Merck	(Tris - Base)	التراس القاعدي
England	BDH	(Glacial acetic acid)	حامض الخليك الثلجي
switzerland	Fluka	(sulfuric acid)	حامض الكبريتيك
England	BDH	(Hydrochloric acid)	حامض الهيدروكلوريك
U.S.A	Difco	(Lead acetade)	خلات الرصاص
England	BDH	(Dextrose)	دكستروز
USA	promega	(DNA ladder)	الدنا قياسي
England	BDH	(Xylazine)	زايلوزين
switzerland	Fluka	(xylole)	زايلين
England	BDH	(Sodium citrate)	سترات الصوديوم
England	BDH	(S0dium Sylcilate)	سلسيلات الصوديوم
Switzerland	Fluka	(potassium)	شب البوتاسيوم
England	BDH	(paraffin wax)	شمع البرافين
England	BDH	(Ethidium bromide)	صبغة أثيديم بروماید
Korea	Riedle	(Eosin stain)	صبغة الايوسين
England	BDH	(Acid fuchsinstain)	صبغة الفوكسين الحامضي
Korea	Riedle	(Haematoxyline stain)	صبغة الهيماتوكسلين
England	BDH	(Loading dye)	صبغة لودنك داي
England	BDH	(α- naphthol)	الفا نفثول
France	Oxide	(Formalin)	فورمالين
Switzerland	Fluka	(Formalin)	فورمالين
England	BDH	(Sodium carbonate)	كاربونات الصوديوم

England	BDH	(Monohydrate sodium carbonate)	كاربونات الصوديوم احاديةالهيدروجين
England	BDH	(Magnesium carbonate)	كاربونات المغنسيوم
England	BDH	(Magnesium sulphate)	كبريتات المنغنيسيوم
USA	Sigma	(Copper sulfate)	كبريتات النحاس
England	BDH	(Ethanol 96%)	كحول الايثانول
England	BDH	(Methanol cohol)	كحول ميثانول
England	BDH	(Glycerol)	كليسيول
India	AP L	(Chloramphenicol)	كلورامفنيكول
France	Oxide	(Chlorophorm)	كلوروفورم
switzerlan	Fluka	(Meric chlorid)	كلوريد الزئبقيك
England	BDH	(Feric chloride)	كلوريدا الحديديك
England	BDH	(Sodium chloride)	كلوريدا الصوديوم
Germany	Mercy	(Balsam Candia)	كندا بلسم
Iraq	Samarra	(Ketoconazole)	كيتوكونيزول
England	BDH	(PCR water)	ماء خاصPCR
England	BDH	(Distrene Plasticizor Xylene)	مادة D.P.X اللاصقة
England	BDH	(Kelamine – Hamelin 50 mg / ml	مادة تخدير
England	BDH	(Tween - 80)	مادة توين-80
England	BDH	(Normal saline)	محلول الملح الفسلجي
U.S.A	Sigma	(Lactophenol blue)	محلول لاكتوفينول الازرق
England	BDH	(Liquid nitrogen)	نايتروجين سائل
England	BDH	(Nitrate sodium)	نترات الصوديوم
England	BDH	(n-hexane)	هكسان
switzerland	Fluka	(Potassium hydroxide)	هيدروكسيد البوتاسيوم
switzerland	Fluka	(Sodium hydroxide)	هيدروكسيد الصوديوم
France	Oxide	(Hydrocortisone)	هيدروكورتزون
switzerland	Fluka	(potassium iodide)	يوديد البوتاسيوم

2.3. طرائق العمل Methods

٣.٢.١. تحضير الاوساط والمحاليل والكواشف والصبغات المستخدمة بالدراسة .

تم تحضير الأوساط الزرعية الجاهزة كافة استنادا إلى تعليمات الشركة المنتجة والارشادات الموجودة على العبوات وعقمت جميع الاوساط بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121مْ وتحت ضغط 15 باوند/انج٢ لمدة 20 دقيقة . وبعد تعقيم الأوساط الصلبة تترك لتبرد في حمام مائي بدرجة حرارة 45-50 مْ قبل صبها في الأطباق حتى لا يتكون ماء تكاثف.

1. وسط أكار السابرويد ديكستروز Sabouraud s Dextrose Agar (SDA)

حُضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بإذابة (62) غم منه في (1000) مل من الماء المقطر في دورق زجاجي , ثم رج جيداً وسخن بوساطة المسخن الحراري Hot plat حتى الغليان وضبط الأس الهيدروجيني عند pH=6.8 , ثم عقمت بالمؤصدة Autoclave , وبعد التعقيم تترك لتبرد , وأضيف إليه (0.05)غم/لتر من المضاد الحيوي Chloramphenicol لمنع نمو البكتريا (Meletiadis *et al*., 2002). وبعدها وزع في أطباق بتري معقمة.

2. وسط الزابك أكار Czapek's Agar (CZA)

حُضر هذا الوسط على وفق تعليمات الشركة المجهزة بإذابة (44) غم من مسحوق هذا الوسط في (1000) مللتر من الماء المقطر .

3. وسط خلاصة الشعير Malt Extract Agar (M.E.A)

حُضر هذا الوسط على وفق تعليمات الشركة المجهزة بإذابة (50) غم من مسحوق هذا الوسط في (1000) مللتر من الماء المقطر.

٤. وسط السابر ويد السائل Sabouraud s Dextrose Broth (SDB)

حُضر حسب طريقة (Larone , 1995) بإذابة (20) غم من الدكتروز مع (10) غم من الببتون في (1000) مللتر من الماء المقطر .

5. صبغة اللاكتوفينول الزرقاء Lacto phenol-cotton blue stain(LCB)

حضرت طبقًا لما ذكره (Ellis,1994) بإذابة (20)غم من مادة الفينول البلوري في مزيج السوائل المتكون من حامض اللبنيك (Lactic acid) (20) مل و(40)مل من الكليسرول و(20)مل من الماء المقطر . بعدها أضيف (0.075) غم من أزرق القطن , وحفظ المحلول في قنينة معتمة . وأستعمل هذا المحلول لغرض تصبيغ الفطر لإجراء الفحص المجهري .

6. محلول هيدروكسيد البوتاسيوم Potassium hydroxide (KOH) %10

حُضر بإذابة 10 غم من هيدروكسيد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر لغرض استخدامه بالفحص المجهري المباشر للعينات (Suhonen *et al*., 1999) .

7. المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline 0.85 %

حُضر هذا المحلول بإذابة (0.85) غم من مادة كلوريد الصوديوم NaCl, شركة BDH (الوزن الجزيئي 54.44) في كمية قليلة من الماء المقطر ومن ثم إكمال الحجم النهائي إلى (100)مل من

المحلول بالماء المقطر ثم عقم في جهاز المؤصدة بدرجة حرارة (121)°م وضغط (15) بار لمدة (15) دقيقة , استخدم هذا المحلول في إجراء الاختبارات اللاحقة (Vacca , 1985) .

8. كاشف موليش **Molish reagent**

حُضر محلول الفا نفثول الكحولي بإذابة (0.5) غم من الفا نفثول (α-naphthol) في (100) مل من كحول الاثيلي (الشيخلي وجماعته ,1993) . وأستخدم للكشف عن المواد الهيدروكاربونية .

9. كاشف بندكت **Benidict reagent**

حُضر هذا الكاشف بإذابة (137) غم من سترات الصوديوم و(100)غم من كربونات الصوديوم المائية في (800) مل من الماء المقطر المعقم , رُشح المحلول ثم أضيف للراشح محلول كبريتات النحاسيك (17.3) في (100)مل ماء مقطر ثم أكمل الحجم إلى (1000) مل الماء المقطر, وأستخدم لغرض الكشف عن الكلايكوسيدات في المستخلصات النباتية (الشيخلي وأخرون ,1993) .

10. كاشف فهلنك **Fehling reagent**

حُضر هذا الكاشف وفقاً لطريقة (Adebayo *et al* ., 2001)

المحلول A: أذابه (70) غم من كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.7H_2O$ في لترمن الماء المقطر.

المحلول B: أذابه (240) غم من NaOH و(246) غم من ملح روشيل Sodium Potassium tartarate في لتر من الماء المقطر . مزج حجمان متساويان من محلول (A) و(B) للحصول على كاشف فهلنك .

11. كاشف خلات الرصاص **Lead acetate reagent 1%**

حُضر هذا المحلول حسب طريقة (Atlas *et al.*, 1995) بوزن (1) غم من خلات الرصاص $(CH_3COO)_2Pb$ ووضعت في أسطوانة مدرجة ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر . أستعمل هذا المحلول للكشف عن الدباغيات في المستخلصات النباتية .

12. كاشف كلوريد الحديديك **Ferric Chloride reagent 1%**

حُضر هذا المحلول حسب طريقة (Atlas, 1995) حيث وزن (1) غم من كلوريد الحديديك ووضع في أسطوانة مدرجة ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر. أستعمل هذا المحلول للكشف عن

الفينولات في المستخلصات النباتية , تغير لون المحلول الى الاصفر أوالأخضر دليل على وجود الفينولات (Harborne , 1984).

١٣. كاشف كلوريد الزئبق Mercuric Chloride 1%

حُضر هذا المحلول حسب طريقة (Atlas , 1995) حيث وزن (1) غم من كلوريد الزئبقيك HgCl3, ووضع في أسطوانة مدرجة ثم أكمل الحجم إلى (100) مل من الماء المقطر. أستعمل هذا المحلول للكشف عن وجود الصابونيات في المستخلصات النباتية .

حُضر كاشف الفينول بإذابة (25) غم من بلورات الفينول في (500)مل من الماء المقطر المعقم (Meyer & Walther , 1988) . أستعمل للكشف عن الكاربوهيدرات في المستخلصات النباتية .

١٤. كاشف ماير Mayers reagent

حُضر بإذابة (3.5) غم من كلوريد الزئبق HgCl3 و(5) غم من يوديد البوتاسيوم في (1000) مل من الماء المقطر (Harbome , 1984) , وأستعمل للكشف عن عموم القلويدات .

15. كاشف (2-4) داي نايتروفنيل هيدرازيل Dinenzuffinel Hedrasil Reagent(2-4)

حُضر بإذابة (0.4) غم من (2-4) داي نايتروفنيل هيدرازيل في مزيج مقداره (100)مل من (حامض الفسفوريك + كحول أثيلي) (زكريا ورديف , 1981) , أستعمل للكشف عن مجموعة الكاربونيل.

16. محلول ألبومين ماير Mayer s albumin solution

حُضر بمزج (50) من زلال البيض مع (50) مل من الكليسرين مع (1) غم من سلسيلات الصوديوم لمنع نمو الفطريات , ورشح الخليط بأستخدام قطعة شاش نظيفة , أستعمل في تثبيت المقاطع النسيجية (الخالدي , 2010) .

17. صبغة الهيماتوكسيلين هارس Harris-Haematoxylin stain

حُضر بإذابة (1) غم من مسحوق صبغة الهيماتوكسيلين في (10)مل من كحول الاثيلي المطلق ثم أضيف الية (20) غم من شب البوتاسيوم المذاب مسبقا في الماء الحار , سخن المزيج إلى درجة حرارة 60 مْ ثم أضيف إليه (0.5) غم من أوكسيد الزئبقيك إلى أن أكتسب اللون الارجواني الغامق ثم برد المحلول تحت الحنفية وأضيف أليه (8)مل من حامض الخليك الثلجي , ورشح المحلول قبل الاستعمال , استعملت هذه الصبغة في تصبيغ المقاطع النسيجية (Bancroft and Steven , 1982) .

19. صبغة الأيوسين Eosin stain

حضرت حسب طريقة (Bancroft and Steven , 1982) بإذابة (10) غم من مسحوق الأيوسين في لتر من الماء المقطر , استعملت هذه الصبغة في تصبيغ المقاطع النسيجية أيضا .

٢.٢.٣. جمع العينات Specimens collection

جمعت (406) عينة سريرية , تضمنت (380) عينة قشع و(26) عينة من الغسيل القصبي عائدة ل(378) مريض وجميع المرضى هم من المراجعين الى العيادة الاستشارية للأمراض الصدرية والتنفسية , ومن المحالين إلى شعبة الامراض الانتقالية في مستشفى الديوانية التعليمي للمدة من (2012/10/1) لغاية (2013/4/1) والذين يعانون من أصابات رئوية مزمنة .

حيث جمعت عينات القشع في الصباح الباكر بعد غسل الفم بالماء المقطر المعقم (لتقليل الاحياء الطبيعية Normal Flore الموجودة بالفم قدر الامكان) وضعت العينة في قنينة معقمة تحتوي مسبقًا على (5) مل من الماء المقطر المعقم , ثم مزجت العينة باستعمال جهاز Vortex للحصول على عينة متجانسة بشكل جيد (Ellis , 1994) .

بينما أخذت عينات الغسيل القصبي من مختبر شعبة الامراض الانتقالية في مستشفى الديوانية التعليمي والعائدة للراقدين في الشعبة.

3.3. الفحوصات المختبرية للعينات Laboratory examination of samples

1.3.3. الفحص المجهري المباشر Direct Microscopic examination

تبعًا لطريقة (Finegold and Martin , 1982) أخذت مسحة من القشع أو الغسيل القصبي ووضعت على شريحة زجاجية نظيفة تحتوي قطرة من محلول KOH (10%) وقطرة من صبغة اللاكتوفينول أزرق القطن ثم سخنت بأمرارها على لهب مصباح بنزن مع تجنب الغليان , ثم وضع غطاء الشريحة وتركت 10 دقائق بعدها فحصت تحت المجهر على القوى (40X) لملاحظة الغزل الفطري والتراكيب الفطرية الاخرى .

2.3.3. زرع العينات Culturing of Specimens

أخذ جزء من القشع بوساطة المسحة القطنية (Cotton Swabs) ونقلت مباشرة الى مركز طبق بتري الحاوي على وسط Sabouraud's Dextrose Agar وبواقع مكررين لكل عينة , ثم حضنت الاطباق في درجتي حرارة مختلفتين فالمكرر الاول بدرجة (28±1) مْ والمكرر الثاني بدرجة (37) مْ , ولمدة ثلاثة أسابيع مع مراعاة مراقبة الاطباق يومياً. فتعد النتيجة سالبة إذا لم تنمو بعد 21 يوماً من الحضن (Green *et al*.,2002) , وعند ظهور النمو خلال الاسبوع الاول عزلت الفطريات باستخدام الابرة المعقمة وزرعت على أطباق تحتوي على وسط SDA أعدت لهذا الغرض (ملحق 3) بواقع مكررين لكل عزلة وحضنت تحت درجة حرارة (28 ,37) مْ وهي الطريقة المباشرة للعزل والتنقية Direct plate method (Pryor and Michailides, 2002) .

3.3.3. أدامة العزلات Maintenance of Isolation

نميت العزلات بعد تنقيتها على وسط SDA الصلب بسطح مائل Slant داخل عبوات صغيرة (Vials) , وحضنت بدرجة حرارة 28±1 مْ لمدة أسبوع ثم حفظت في الثلاجة لاستعمالها في التجارب اللاحقة . وقد تم تجديد المزروع كل ثلاثة أشهر(Ashoor and Abu-Baleer, 2002).

4.3. طرائق التشخيص .

1.4.3. تشخيص الأنواع الفطرية Diagnostic of fungi species

شخصت انواع جنس *Aspergillus* المعزولة من عينات القشع والغسيل القصبي والنامية على وسط SDAبالاعتماد على الصفات المظهرية للمستعمرات وباستخدام اوساط زرعية اساسية للتشخيص وهي CZA وMEA (ملحق 3) , حيث سجلت الخواص العامة لكل عزلة من حيث شكل المستعمرة ولونها وقوامها وقطرها وحوافها وارتفاع المستعمرة بالإضافة الى الصبغات التي تنتجها من الجهة الخلفية للطبق , وتم حساب عدد الأيام التي يستغرقها الفطر لبدء النمو وحساب مدة الحضانة وكذلك بالاعتماد على الصفات المجهرية التي أوردها كل من (Ellis ,1994; Klich , 2002; Quinn *et al*., 2002 ; Ellis *et al*., 2007 ; Houbraken *et al*.,2008) من خلال إتباع طرائق التشخيص التالية :

- الفحص المجهري الرطب طبقاً لما ورد في (Moris *et al*., 2008) بوضع قطرة من صُبغة ازرق القطن واللاكتوفينول على شريحة زجاجية نظيفة وبوساطة إبرة التلقيح المعقمة Sterile Needle ثم نقل

جزء من الخيوط الفطرية من المسُتعمرة النامية إلى الشريحة الزجاجية , ومُزجت مع الصبغة , ثم وضع عليها غطاء الشريحة وضغط عليها بلطف لغرض فرش العينة , وفُحصت العينة تحت المجهر باستخدام القوة (10X) أولاً ثم على القوة (40X) , لملاحظة التراكيب المجهرية التشخيصية .

- استخدمت تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية Slide culture technique لدراسة الصفات المجهرية للأنواع المعزولة بغية الحصول على تشخيص أكثر دقة , طبقاً لما أورده (Benson , 2002) وكما يأتي :

1. عقم طبق بتري حاوٍ على ورقة ترشيح مبللة وقضيب زجاجي بشكل الحرف V ووضعت علية شريحة زجاجية نظيفة ومعقمة .
2. قطع وسط الاكار المائي على شكل مكعبات صغيرة وبأبعاد لا تزيد عن (1 سم) ونقل مكعبان ووضعا على سطح الشريحة الزجاجية وغطي بغطاء الشريحة المعقم .
3. لقحت الزاويتان المتقابلتان للوسط الزرعي على سطح الشريحة بالنوع المراد تشخيصه ورطب سطح ورق الترشيح ب (3) مل ماء مقطر معقم ووضع غطاء طبق بتري وحضن عند 28 مْ ولمدة 7 أيام .
4. تم رفع غطاء الشريحة بالملقط ووضع على شريحة زجاجية أخرى حاوية على قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن .
5. لوحظ شكل وترتيب تراكيب الغزل الفطري تحت المجهر مثل شكل الحوصلة Vesicle وتوزيع Metula أو Phialides أو كليهما معاً , وشكل ولون الكونيدات وأبعادها .

2.4.3. التشخيص التأكيدي لبعض الانواع جنس *Aspergillus* بطريقة تفاعل سلسلة أنزيم البلمرة (PCR).

بعد تشخيص الفطريات بالاعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية وللتأكد من صحة هذا التشخيص تم استخلاص DNA لبعض عزلات الانواع جنس *Aspergillus* spp. الأكثر تردداً وظهوراً .

1.2.4.3. الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA)

1.استخلاص ال DNA Genomic DNA extraction

تم استخلاص الDNA باستخدام العدة الجاهزة (ملحق ١) ووفقاً لتعليمات الشركة المجهزة كالتالي :

1. تم تنشيط العزلات المختبرة على الوسط الزرعي الصلب (SDA) .

2. جمعت الخيوط الفطرية والابواغ بوزن (100 - 500) ملغم في هاون خزفي معقم مسبقًا , وأضيف إليه النيتروجين السائل لمدة 4 دقائق وسحقت بوساطة المطرقة الخاصة بالهاون . ثم أضيف 1 مل من الماء المقطر والمعقم .
3. نقل (١) مل من عالق كل عزلة بوساطة ماصة دقيقة ووضعت في أنابيب ابندروف Eppendorfe tube قياس 1.5 مل معقمة وبعدها مزجت باستعمال جهاز Vortex للحصول على عالق متجانس بشكل جيد .
4. أضيف (180) مايكرو ليتر من Universal Digestion Buffer و(20) مايكرو ليتر من Proteinase K إلى كل أنبوبة والمجهزة من العدة ومزجت بوساطة vortex وحضنت بدرجة حرارة 56 مْ لمدة 30-60 دقيقة باستخدام الحمام المائي .
5. أضيف للأنابيب (100) مايكرو ليتر من Universal Buffer PF ومزج بالتقليب وحضنت بدرجة حرارة 20- مْ لمدة 5 دقائق .
6. نبذ المزيج بسرعة 12,000 دورة/دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ونقل الطافي إلى أنبوبة ابندروف جديدة .
7. أضيف للمزيج (200) مايكرو ليتر Universal Buffer BD ومزج بوساطة vortex.
8. أضيف (200) مايكرو ليتر من الكحول المطلق (100-96%) الى المزيج المتحلل , ومزج بوساطة vortex.
9. نقل المزيج من الخطوة 8 إلى EZ-10 tube الحاوية على أعمدة تحتوي مرشحات لتنقية الحامض النووي , ونبذ بسرعة 12,000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة . ثم تم التخلص من الراشح المترسب ونقل أنبوبة الترشيح الحاوية على الحامض النووي الى أنبوبة ابندروف جديدة .
10. أضيف (500) مايكرو ليتر من Universal PW Solution إلى الأنبوبة ونبذت بعد ذلك بسرعة 12,000 دورة/دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من المحلول الراسب للخلايا المتحللة .
11. أضيف (500) مايكرو ليتر من Universal Wash Solution إلى الانبوبة ونبذ بسرعة 12,000دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة ونقل أنبوب الترشيح الى انبوبة ابندروف جديدة , ولتخلص من الراسب نبذت مرة أخرى بالسرعة نفسها لمدة دقيقتين لتجفيف غشاء ال EZ-10 Tube .
12. أضيف (50-100) مايكرو ليتر من TE Buffer مباشرة الى مركز غشاء ال EZ-10 Tube وحضن بدرجة حرارة الغرفة لمدة دقيقة واحدة بعدها نبذ بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة لتركيز الحامض النووي . وحفظ في درجة حرارة 20- مْ لحين أجراء تفاعل سلسلة البلمرة .

2. تحضير هلام الأكاروز Preparation of Agarose gel

حُضر بحسب طريقة (Sambrook *et al*., 1989) وكالاتي :

1. أذيب (1.5) غم من مسحوق الأكاروز Agarose gel في (100) مل من محلول TEB Buffer الداريء بتركيز (1X) وباستعمال الصفيحة الحرارية الهزازة الممغنطة Magnetic hot plate stirrer لمدة 15 دقيقة .
2. ترك الهلام ليبرد بدرجة حرارة 50 مْ وبعدها تم إضافة (3) مايكرو ليتر من الصبغة المشعة Ethidium bromide ومزجت جيدًا مع الهلام .
3. صب هلام الأكاروز في قالب الترحيل (Tray) الحاوي على المشط (Comb) وبعدها ترك الهلام ليتصلب في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة , تم إزالة المشط من الهلام بعناية . ثم نقل الى حوض الترحيل الكهربائي Electrophoresis Tranck .
4. غطي هلام الأكاروز بداريء TEB بارتفاع 3 ملم (حتى ينغمر سطح الهلام) .
5. أضيف (9) مايكرومتر من الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA) إلى (3) مايكرو ليتر من صبغة ال Bromophenol أي بنسبة 1:3 ثم وضعت في الحفر في هلام الأكاروز . بعدها ربطت الأقطاب بصورة مناسبة بحيث يربط القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب بالسالب .
6. أجريت عملية الترحيل الكهربائي بفولتية مقدارها 80 فولت وب100 ملي أمبير ولمدة ساعة ثم تم أيقاف عملية الترحيل , بعدها تم فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي (320) نانوميتر بوساطة صندوق الأشعة فوق البنفسجية U.V Transilluminater وتم تصوير الهلام باستخدام الكاميرا لملاحظة الDNA المتداخل مع الصبغة Ethidium bromide بشكل حزم برتقالية براقة .

2.2.4.3. تحضير محلول التفاعل لسلسلة تفاعلات البلمرة PCR :

حُضر مزيج التفاعل بحجم 25 مايكرو ليتر لسلسلة تفاعلات البلمرة بأتباع الخطوات المثبتة والمرفقة مع العدة AccuPower® PCR PerMix المجهزة من الشركة Bioneer وكالاتي :

١. حُضر مزيج التفاعل في أنابيب AccuPower PCR PerMix tube الحاوية على مكونات تفاعل أنزيم البلمرة (الملحق 2) مع إضافة المكونات الاخرى لمزيج التفاعل كما في الجدول (3- 1).

الجدول (3-3) مكونات مزيج تفاعل إنزيم البلمرة PCR وحجومه .

PCR master mix		Volume
DNA template		5µL
Master mix		5µL
Primer	Forward Primer	1.5µL
	Revers Primer	1.5µL
PCR water		12µL
Total		**25µL**

جدول (3 - 4) :البوادئ المستخدمة في هذه الدراسة .

المصدر	حجم ناتج التضخيم	تسلسل القواعد النيتروجينية ('5→'3)		نوع البادئ
Logothetic and Tseleni, (2009)	150 bp	*F	/5-CCA GTA CGT TGG TCT TCA ACT C-/3	*PEPI*
		**R	/5-CAT CAC CAT GAC CAT CGT TTG CT	
	200 bp	F	/5-CGA CGT CTA CAA GCC TTC TGG AAA-3	*PEPO*
		R	/5-CAG ACC GTC ATT GTT CTT GTC-/3	
	250 bp	F	/5-TAT GTC TTC CCC TGC TCC-/3	*PEX*
		R	/5-CTA TGC CTG AGG GGC GAA-/3	
	450bp	F	/5-CTA TTG TAC CTT GTT GCT TCG GCG-/3	*ATA*
		R	/5-AGT TGC AAA TAA ATG CGT CGG CGG-	

*F: Forward primer البادئ الأمامي **R: Reverse primer البادئ العكسي

2. بعد إكمال تحضير مزيج تفاعل إنزيم البلمرة تم غلق الأنابيب مع المزج بعناية بجهاز Vortex لمدة 5 ثوانٍ.

3. نقلت الأنابيب الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل أنزيم البلمرة لأجراء عملية التضخيم ال DNA (DNA Amplication) على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermo cycling conditions والمتمثلة بعمليات فصل شريط DNA (Denaturation) وارتباط البادئات مع شريط المنفصل (Annaling) وتطويل سلسلة الDNA (Extension) . والمبرمج باستخدام اربع بادئات وفاقًا لما ورد في (Logothetic *et al.*, 2009), والمبينة في الجدول (3-3) :

جدول (3-5) : برنامج الدورات الحرارية لتفاعل إنزيم البلمرة PCR .

Temperature (˚C)/Time					Gene
Final extension	Cycling condition of 38 N0.			Initial denaturation	
	extension	annealing	denaturation		
72/5 min	72/1 min	59/1 min	94/1 min	94/5 min	*PEPI*
72/5 min	72/1 min	59/1 min	94/1 min	94/5 min	*PEPO*
72/5 min	72/1 min	59/1 min	94/1 min	94/5 min	*PEX*
72/5 min	72/1 min	59/1 min	94/1 min	94/5 min	*ATE*

3.2.4.3. الترحيل الكهربائي لناتج تفاعلات البلمرة:

تم إجراء الترحيل الكهربائي بأتباع طريقة الترحيل نفسها لل DNA حيث أستخدم هلام الأكاروز بنسه 1.5% تحت فرق جهد 100 فولت وتيار 80 أمبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) ال DNA المستخلص والمضخم والذي يمثل نواتج ال PCR (PCR Product) وبالمقارنة مع سلم الحمض النووي القياسي (100-2000 bp) DNA Ladder .

5.3. حساب حساسية الاختبارات التشخيصية وخصوصيتها:

تم احتساب حساسية الاختبارات Sensitivity وخصوصيته Specificity بالاعتماد على (Thrusfield , 1986) وبالشكل التالي :

جدول (3-٦) : حساسية اختبارات تشخيص عزلات جنس *Aspergillus* وخصوصيتها .

الفحص المجهري	نتائج الزرع الفطري		المجموع
	Positive	Negative	
Positive	a	b	a + b
Negative	c	d	c + d
المجموع	a + c	b + d	a+c+b+d

الحساسية = وهي قابلية الاختبار على الكشف عن الحالات الموجبة للنمو الفطري وتحسب بالمعادلة التالية :

$$\%Sensitivity=\frac{a}{a+c}x100$$

الخصوصية = وهي قابلية الاختبار على الكشف عن الحالات السالبة للنمو الفطري وتحسب بالمعادلة التالية :

$$\%\ Specificity=\frac{d}{d+b}x100$$

حيث أن : (a):true positive , (c): false negative , (b): false positive , (d): true negative

6.3. النسبة المئوية لظهور العزلات Percentage of observation the isolates

تم حساب النسبة المئوية لظهور الاجناس والانواع التابعة لجنس *Aspergillus* وبحسب المعادلة التالية: (Krebs , 1978)

$$\text{النسبة المئوية للتردد} = \frac{\text{عدد العينات التي ظهر فيها الجنس أو النوع}}{\text{العدد الكلي للعينات}} * 100$$

7.3. المستخلصات النباتية Plant Extracts

1.7.3. النبات المستخدم في الدراسة .

نبات القسط *Costus speciosus* (Koen.) , تم الحصول على رايزومات وجذور نبات القسط وهو مجفف ومطحون في اكياس ومحفوظ في علب مغلقة من متاجر العشابين المجهزة بموافقة وزارة الصحة / مركز طب الاعشاب , وخاضع للفحص والتشخيص من النواحي الصحية والفعالية الفارماكولوجية . وتمت تعبئته في شركة غذاء الحياة التجارية , عمان – الاردن .

2.7.3. الاستخلاص Extractions

1. الاستخلاص الكحولي Alcoholic extractions

حضر المستخلص الكحولي باستخدام (250) مل من الكحول الميثانول 80 % كمذيب ل(25) غم من المسحوق النباتي الجاف أي بنسبه 10:1 (v/w) (Das *et al*., 2010) وذلك بطريقة الاستخلاص ألترجيعي المستمر باستخدام جهاز السوكسليت Continuous Soxhlet Extraction طبقاً لما أورده . (Nikhal *et al*., 2010)

حيث بدأت عملية الاستخلاص بالتسخين مع المذيب (كحول الميثانول) في الدورق الزجاجي عند درجة حرارة40 مْ وتصاعد البخار في الدورق الزجاجي إلى وحدة التقطير بوساطة الانبوبة الرابطة بينهما , وبعد أن تكثف البخار نتيجة لمرور الماء البارد في أنبوبة حلزونية داخل الاسطوانة الزجاجية بدأ بالنزول على شكل قطرات وأنساب على الكأس السليلوزي Thumbles الحاوي على المسحوق النباتي الجاف الموجود في وحدة الاستخلاص الى أن انغمر الكأس السليلوزي بالمذيب وبهذه الحالة تم انتقال مركبات المادة النباتية مع محتوياتها الى المذيب ومع بدء امتلاء وحدة الاستخلاص غادر المذيب مع ما تم أذابته من المادة النباتية فيه الى الدورق الزجاجي بعملية السيفون وبتكرار العملية رجع المذيب ليتبخر تاركاً مركبات النباتات في الدورق الزجاجي واستمرت العملية حتى أصبح لون المذيب داخل وحدة الاستخلاص رائقا وبدون لون وهذه أشارة الى انتهاء عملية الاستخلاص والتي استغرقت 24 ساعة متواصلة , أخذت المستخلصات وجففت باستخدام المبخر الدوار Vacceum rotary evaporator تحت درجة حرارة تراوحت بين (45-50) مْ لحين الحصول على سائل كثيف ثم أكمل تجفيف المستخلص بعد وضعه في دورق زجاجي في الفرن الكهربائي بدرجة حرارة 45 مْ خلال 24 ساعة وكررت العملية عدة مرات للحصول على كميات كافية من المستخلصات شديدة اللزوجة وحفظ الناتج بعد وزنه في الثلاجة لحين الاستعمال وبدرجة حرارة 4 مْ(Thakare , 2004)

2. الاستخلاص المائي Water extractions

حضر المستخلص المائي لجذور ورايزومات نبات القسط بالاعتماد على طريقة Handa وآخرون (2008) وذلك بمزج (25) غم من المسحوق النباتي مع (250) مل من الماء المقطر بدرجة الغليان أي بنسبه 10:1 وترك ليبرد مع التحريك المستمر بوساطة الهزاز shaker ، ثم رشح المحلول عبر طبقات من الشاش ، ثم رشح ثانيةً باستخدام أوراق الترشيح (Whatmann No.2) واخذ الراشح وتم تجفيفه بواسطة الفرن الكهربائي oven بدرجة حرارة (45-50) م لحين الحصول على المسحوق المجفف،

وكررت العملية لحين الحصول على كمية كافية من المستخلص , ثم جمع المسحوق وحفظ في قنينة زجاجية نظيفة ومعتمة ووضع في الثلاجة بدرجة 4 مْ لحين الاستعمال .

3.7.3 . النسبة المئوية للمستخلصات النباتية

أما النسبة المئوية للمستخلص فتمت بقسمة الوزن الصافي لمسحوق المستخلص الجاف والذي تم جمعه في كل عملية استخلاص على الوزن الأصلي للمسحوق النباتي الجاف المستعمل (25) غم مضروباً في 100 .

$$\text{النسبة المئوية للمستخلص} = \frac{\text{الوزن الصافي للمستخلص}}{\text{الوزن الأصلي للمسحوق}} * 100$$

4.7.3. تعقيم المستخلصات وتحضير المحلول الخزين Sterilization of extract and preparation of stock solution

لغرض اختبار الفعالية البايولوجية للمستخلص الخام في فطريات الاختبار اعتمدت طريقة (Mitcher *et al*., 1972) في تحضير المحلول الخزين Stock solution وتعقيمه , وذلك بأخذ (1)غم من مسحوق المستخلص النباتي الجاف وأذيب في (10) مل من الماء المقطر المعقم , فأصبح لدينا محلول خزين بتركيز(100) ملغم/مل , عقم المحلول بالترشيح باستخدام مرشح سايتز (Seitz Filters) الحاوي على مرشحات غشائية (Millipore filters unit) بقطر 0.22 ما يكرون للتخلص من الملوثات الجرثومية الموجودة فيه والحصول على محلول خزين معقم , وقد استخدم هذا المحلول مصدراً لتحضير التراكيز (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم/مل .

8.3. دراسة تأثير مستخلص نبات *C. speciosus* الكحولي والمائي على بعض انواع جنس *Aspergillus* .

تم اختيار الأنواع الأكثر تردداً لجنس *Aspergillus* وهي , *A.terreus, A.flavus , A.niger* *A.fumigatus* لأجل اختبار تأثير مستخلصات النبات المتناول بالدراسة تجاهها .

1.8.3. تأثير التراكيز المختلفة من مستخلصات نبات *C. speciosus* في النمو الشعاعي للفطريات الاختبارية .

لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي والمائي في النمو الشعاعي للفطريات أتبعت طريقة (Hmawndi , 2006) وهي تقنية الغذاء المسموم (Poisoned Food Technique) حيث تم اختبار خمسة تراكيز هي (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم/مل ولكل المعاملات , والتي تم التوصل أليها بالاعتماد على اختبارات أولية .

حُضر الوسط الزرعي (SDA) في خمس دوارق سعة كل منها 250 مل بواقع (6.2 غم وسط / 25, 50 , 75, 90 ,95 مل من الماء المقطر)/دورق ولكل معاملة على حدى , عقمت في جهاز المؤصدة , وبعد التعقيم تركت لتبرد في حمام مائي بدرجة (45) مْ حتى لا يتكون ماء التكاثف اثناء صبها في الاطباق , كذلك أضيف اليها المضاد الحيوي Chloramphenicol (0.5%) قبل صبها , وبحسب المعادلة ($N_1\ V_1=N_2\ V_2$) من المحلول الخزين Stock Solution البالغ تركيزه 100 ملغم/مل , أضيف محلول كل معاملة بتركيز 100% من المستخلص النباتي الى كل دورق بحيث أكمل الحجم الى 100 مل للحصول على التراكيز (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم/مل على التوالي , وقبل تصلبه صبت محتويات الدوارق في أطباق بتري معقمة بواقع (6) أطباق لكل دورق . أما معاملة المقارنة فقد تضمنت أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي المعقم (SDA) من غير أي أضافة لقحت ثلاثة من الأطباق كل تركيز ولكل معاملة من المستخلص النباتي وثلاثة من الاطباق المقارنة بأقراص قطر كل منها 5 ملم مأخوذة من حافة مستعمرة الفطر *A.niger* وبعمر أسبوع بوساطة ثاقب فليني (Cork bore). وذات الخطوات طبقت على بقية الفطريات المختبرة وهي *A.flavus* , *A.terreus* و *A.fumigatus* .

حضنت الاطباق بدرجة حرارة 28 ±1 مْ , وبعد وصول نمو مستعمرات الفطر في معاملة المقارنة الى حافة الطبق حسب مقدار التثبيط للنمو الشعاعي (القطري) (PIRG) Percent Inhibition of Radial Growth بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية على وفق المعادلة الواردة (Jinantana and Sariah , 1997).

$$PIRG = \frac{R1-R2}{R1} * 100$$

R1 : أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر في معاملة المقارنة .

R2 : أقصى نمو شعاعي لمستعمرة الفطر في الأطباق الحاوية على المستخلص .

2.8.3 . تأثير مستخلصات النبات في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية .

لاختبار تأثير المستخلص الكحولي والمائي في الوزن الجاف للفطريات المختبرة استخدمت دوارق مخروطية سعة كل منها 250 مل وضع في كل منها 50 مل الوسط الغذائي السائل SDB ملحق (3) , أذ تم تحضير خمس تراكيز وهي (5, 10, 25 , 50 ,75) ملغم/مل من المستخلص الكحولي والمائي من الوسط الغذائي السائل المعقم , أما معاملة المقارنة فقد تضمنت الوسط الغذائي السائل المعقم من غير أية إضافة , ثم لقحت كل الدوارق بقرص قطره 5 ملم من غزل الفطريات المختبرة وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز , وحضنت الدوارق بدرجة حرارة 28 ±1 مْ ولمدة أسبوع بعدها تم ترشيح الغزل الفطري لكل فطر على ورقة ترشيح معقمة ومعلومة الوزن ثم جففت بالفرن بدرجة حرارة 60 مْ ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تم قياس الوزن الجاف لكل فطر (Pinto *et al*., 2001) .

3.8.3. تأثير مستخلصات النبات في إنبات ابواغ الفطريات وطول الأنبوب الجرثومي للفطريات الاختبارية .

لاختبار تأثير المستخلص الكحولي والمائي في إنبات ابواغ الفطريات المنتخبة تم تحضير خمس تراكيز من المحلول القياسي 100% وهي (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم/مل من المستخلص الكحولي والمائي بالتخفيف بالماء المقطر المعقم , وقد أستخدم الماء المقطر المعقم في معاملة المقارنة , وقد تم تحضير عالق أبواغ الفطريات من مزارع نقية عمرها أسبوع واحد وذلك بإضافة 5 مل ماء مقطر معقم لكل طبق بعدها فصلت الابواغ باستخدام الناقل Loop ورشح العالق باستخدام الشاش المعقم لغرض عزل الخيوط الفطرية وبقايا الوسط الغذائي الموجود بالعالق من جراء عملية فصل الابواغ (Srivastava and Kediyal, 1984) . وبعد أن أصبح العالق جاهزاً تم أخذ (0.1) مل من العالق ومزجت مع (0.1) مل من المستخلص لكل تركيز من تراكيز المستخلص المائية والكحولية باستخدام تقنية شريحة إنبات الابواغ (Spores Germination Slid Technique) (Shekawat and Prasada , 1971) وبواقع ثلاثة مكررات لكل تركيز وحضنت الشرائح بدرجة حرارة 25±1 مْ لمدة 16-18 ساعة وبعدها تم حساب نسبة إنبات الابواغ تحت المجهر من خلال المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للإنبات} = \frac{\text{عدد الأبواغ النابتة}}{\text{عدد الأبواغ الكلي}} * 100$$

وتم قياس أطوال الأنابيب الجرثومية للأبواغ النابتة بعد احتساب نسبة الإنبات وذلك باستخدام العدسة العينية المقسمة Ocular Micrometer بحسب طريقة (الخليل,٢٠٠٥).

4.8.3. دراسة تأثير مستخلصات النبات على مُورْفُولُوجْيا الخلايا الفطرية .

لمعرفة تأثير المستخلص النباتي الأكثر فعالية (اعتماداً على نتائج الاختبارات السابقة) على مُورْفُولُوجْيا خلايا الفطريات المختبرة أتبعت طريقة (Benson , 2002) وهي تقنية الزرع على الشريحة الزجاجية Slide Culture Technique وكما ورد ذكرها في الفقرة (1.3.3) مع بعض التحويرات , حيث قطع وسط الاكار الحاوي على مستخلص النبات الكحولي بتركيز(75) ملغم/مل بشكل مكعبات صغيرة لا تزيد عن (1) سم ونقل مكعبان ووضعا على سطح الشريحة الزجاجية , وأتبعت الخطوات التقنية نفسها , وبعد أسبوع فحصت الشريحة الزجاجية تحت المجهر ورافق ذلك تحديد نوع التأثير من خلال وجود أو عدم وجود تشوهات في طرف الخيط الفطري وكذلك نوع هذه التشوهات .

9.3. اختبار حساسية الفطريات للمضاد الفطري Ketoconazole

- **تحضير محلول المضاد الفطري Preparation antifungal solution**

تم تحضير محلول الأساس للمضاد الفطري KCZ تبعاً لطريقة (McGinnis ,1980) وبتركيز 10.000 ميكروغرام/مل . أذ تم وضع (5) مل من مادة Dimethyl sulphoxide بتركيز (100) % في أنبوبة محكمة الغلق وأضيف اليها (50) ملغرام من المضاد الفطري ثم رج المحلول بقوة باستخدام المازج الدوار Vortex, ليصبح المحلول الاساس بتركيز (10.000) ميكروغرام/مل . ترك المحلول بدرجة حرارة الغرفة لمدة (30) دقيقة قبل استعماله وأما الباقي فقد حفظ في درجة حرارة (-20 مْ) لحين الاستعمال .

ثم حضر محلول مخفف بتركيز (1000) ميكروغرام/مل من المحلول الأساس للمضاد الفطري وذلك بإضافة (9) مل من محلول DMSO تركيز(100)% إلى (1) مل من المحلول الأساس تركيز(10.000) ميكروغرام/مل . وللحصول على محلول تركيزه (100) ميكروغرام/مل تم إضافة (9)مل من (DMSO) تركيزه (100)% إلى (1) مل من المحلول ذو التركيز(1000) ميكروغرام/مل

وحضرت عدة تخافيف للحصول على التراكيز الاتية (5 , 10 , 25 , 50 , 75) ملغم/مل من الوسط الزرعي (SDA) .

- **اختبار التأثير المثبط للمضاد KCZعلى نمو الفطريات المختبرة .**

تم اختبار تأثير المضاد الفطري القياسي KCZ على نمو الفطريات المختبرة بالاعتماد على طريقة خلط المضاد مع الوسط الزرعي والواردة في (Miorin *et al* .,2002) والتي تتضمن حساب الاختزال في النمو بقياس أقطار المستعمرات الفطرية النامية على الأوساط الزرعية الحاوية على تراكيز معينة من مضاد KCZ مقارنة مع أقطار المستعمرات الفطرية النامية على الأوساط الزرعية الخالية من المضاد . تم استخدام الوسط الغذائي SDA المضاف الية المضاد البكتيري Chloramphenicol (0.5%) . حيث تم مزج (0.2) مل من المضاد الفطري مع (4) مل من الوسط الغذائي ليصبح التركيز (5) ملغم/مل , وتم مزج (0.4) مل من المضاد الفطري مع (4) مل من الوسط الغذائي ليصبح التركيز (10) ملغم/مل , وتم مزج (1) مل من المضاد الفطري مع (4) مل من الوسط الغذائي ليصبح التركيز (25) ملغم/مل , وتم مزج (2) مل من المضاد الفطري مع (4) مل من الوسط الغذائي ليصبح التركيز (50) ملغم/مل , وتم مزج (3) مل من المضاد الفطري مع (4) مل من الوسط الغذائي ليصبح التركيز (75)ملغم/مل , وبعد تصلب الوسط أخذ قرص من حافة المستعمرة الفطرية الحديثة وبعمر أسبوع بوساطة الثاقب الفليني Cork borer وبقطر 5 ملم ووضع في وسط الطبق وبظروف معقمة ثم حفظت الأطباق وفي درجة حرارة 28 مْ ولمدة 7 ايام . ولغرض مقارنة نتائج التأثير المضاد على الفطريات فقد تم تحضير الوسط الغذائي (SDA) الخالي من أية أضافة . وتم أتباع الخطوات السابقة الذكر في اختبار تأثير المثبط للمضاد الفطري على نمو الفطريات . وتم أخذ النتائج المجموعتين كلاهما بحساب متوسط قياس قطرين متعامدين لكل مستعمرة فطرية (PIRC) أما فيما يخص النسبة المئوية للتثبيط نمو الفطريات فقد تم الحصول عليها باستخدام المعادلة الواردة في الفقرة (1.7.3).

- **اختبار تأثير المضاد KCZ على الوزن الجاف للفطريات**

لمعرفة تأثير المضاد الفطري القياسي KCZ في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية تم اتباع طريقة (Pinto *et al*., 2001) والواردة الذكر في الفقرة (2.7.3) .

- **اختبار تأثير المضادKCZ على أنبات ابواغ الفطريات**

لمعرفة تأثير المضاد الفطري القياسي KCZ في إنبات أبواغ الفطريات الاختبارية تم أتباع طريقة (Shekawat and Prasada , 1971) والواردة الذكر في الفقرة (3.7.3.) .

1.10.3 . الكشف الكيمياوي التمهيدي الاستدلالي للمكونات الفعالة في النبات المتناول بالدراسة .

تحديد الpH (pH-determination)

قبل إجراء الكشوفات الكيميائية ولغرض التأكد فيما إذا كانت هناك اختلافات في مستوى الحامضية لمستخلص نبات الدراسة الكحولي والمائي أذيب 10غم من مسحوق النبات المستخلص في 50 مل ماء مقطر, وتُرك في درجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق , قيس الأُس الهيدروجيني بوساطة جهاز pH-meter (Shihata,1951) **.**

1. الكشف عن الفلافونات Flavonoides

طبقاً لطريقة (Jaffer *et al*., 1983) أذيب (10) غم من المستخلص النباتي في (50) مل من الكحول الأثيل (95%) ثم رشح المحلول , وحضر محلول مكون من إضافة (10) مل الكحول الأثيل تركيزه (50)% الى (10) مل من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH) (50)% . مزجت كميات متساوية من المحلولين السابقين وظهور اللون الاصفر دليل على وجود الفلافونات .

2. الكشف عن التربينات Terpenes

أتبعت طريقة (Al-Abid , 1985) بإذابة (1) غم من المستخلص النباتي في (2) مل من الكلوروفورم , وأضيف اليه قطرة من Acetic anhydrate وقطرة من حامض الكبريتيك المركز , ظهور الراسب البني دليل على احتواء المستخلص على التربينات .

3. الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

أ- أضيف كاشف بندكت بمقدار (5) مل الى (1) مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار, سخنت في حمام مائي بدرجة حرارة (100) مْ لمدة 5 دقائق ثم بردت الأنبوبة , تكون راسب أحمر يشير الى وجود المركبات الكلايكوسيدية (Al-Khazraji , 1991).

ب ـ مزج (1) غم من المسحوق النباتي الجاف مع (10) مل الماء المقطر , بعدها رشح المحلول ثم أضيف إليه بضع قطرات من كاشف فهلنك , ظهور اللون الأحمر الغامق دليل على وجود الكلايكوسيدات (Adedayo *et al*., 2001) .

4. الكشف عن المركبات الفينوليه Phenolic compounds

تبعًا لطريقة (Al-Khazraji , 1991) أضيف (1) مل من المستخلص النباتي الى (1) مل من محلول كلوريد الحديديك 1% , ظهور اللون الأخضر أو الأزرق المخضر يدل على وجود المركبات الفينولية .

5. الكشف عن القلويدات Alkaloids

تم غلي (10)غم من المستخلص النباتي مع (50) مل من الماء المقطر المحمض ب 4 % HCl , أعقبها ترشيح المحلول بعد تبريده , وأختبر 0.5 مل من الراشح الرائق في زجاجة ساعة Watch glass مع 0.5 مل من كاشف ماير حيث يدل ظهور الراسب البني على وجود القلويدات (Harborne , 1984).

6. الكشف عن الصابونيات Saponins

أضيف (3) مل من محلول كلوريد الزئبق HgCl3 بتركيز1% إلى (5) مل من المستخلص النباتي , ظهور الراسب الأبيض دليل على وجود الصابونيات (AL-Khazraji , 1991) .

7. الكشف عن الفيوكومارينات Fuocoumarins

مزجت كميتين متساويتين من المستخلص النباتي مع هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 10% , ظهور اللون الأصفر المخضر يدل على وجود الفيوكومارينات (Harborne , 1984).

8. الكشف عن الكربوهيدرات Carbohydrates

أضيف (0.5) مل من كاشف الفينول (إذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر المعقم) الى (0.5) مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار رجت جيداً ثم أضيف اليها(0.5) مل من حامض الكبريتيك المركز , ظهور الراسب ذو اللون الأحمر إلى البني دل على وجود الكربوهيدرات (Meyer and Walther ,1988)

9. الكشف عن الدباغيات Tannins

تبعًا لطريقة (Harborne , 1984) أضيف بضع قطرات من محلول خلات الرصاص lead 1%) (acetate الى (5) مل من المستخلص النباتي , يدل ظهور الراسب الهلامي الابيض اللون الى وجود التانينات .

10. الكشف عن الراتنجانات Resins

أضيف (50) مل من الكحول الأثيل 95% الى (5) غم من المسحوق المستخلص النباتي , سخن بحمام مائي بدرجة حرارة 100 مْ , ورشح المحلول ,ثم أضيف له 100مل من الماء المقطر المحمض ب HCl 4% وأستدل على وجود الراتنجانات بظهور العكورة (Shihata , 1951).

11. الكشف عن الكومارين Coumarin

وضعت ا غرام من المستخلص النباتي الكحولي في أنبوبة اختبار ثم غطيت الأنبوبة بورقة ترشيح مرطبة بمحلول NaHO المخفف ووضعت بحمام مائي مغلي لبضعت دقائق , ثم عرضت ورقة الترشيح الى مصدر للأشعة فوق البنفسجية U.V Source حيث يدل ظهور اللون الأصفر المخضر البراق على وجود الكومارين (Harborne , 1984).

2.10.3. الاختبارات النهائية للكشف عن المجاميع الفعالة في مستخلصات نبات الاختبار

1. الكشف عن مجموعة الأمين NH بوساطة كشف حامض النتروز.

أضيف (6) قطرات من حامض HCl المركز الى (2) مل من المستخلص النباتي ثم خفف المحلول باستخدام (10)مل من الماء المقطر وبرد المحلول الى درجة 0 مْ , وأذيب (2) غم من نترات الصوديوم (Sodium Nitrite) في (1) مل من الماء المقطر ثم أضيف هذا المحلول ببطء مع الرج الى المحلول المبرد, دل خروج الغاز وتلون المحلول باللون الأصفر المائل الى البني على وجود مجموعة الامين (NH) في المركب (زكريا ورديف ,1981).

2. الكشف عن مجموعة OH المرتبطة بحلقة بنزين (مجموعة فينول)

أضيف (2) مل من محلول كاشف كلوريد الحديديك (Ferric chloride) الى (2) مل من محلول المستخلص النباتي , دل ظهور اللون الأخضر على وجود حلقة الفينول ضمن المركب , مما يدل على احتواء على حلقة أرماتية غير مشبعة متصلة بها مجموعة هيدروكسيل بصورة غير مباشرة (زكريا ورديف ,1981).

3.الكشف عن الأصرة المزدوجة

وضع (2) مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار وأضيف اليها (2) مل من محلول برمنغنات البوتاسيوم قطرة فقطرة , يدل اخفاء لون البرمنغنات على وجود الآصرة المزدوجة (زكريا ورديف , 1981)

4. الكشف عن مجموعة الكاربونيل

أستعمل كاشف (2-4) داي نايتروفنيل هيدرازيل للكشف عن مجموعة الكاربونيل , وذلك بإضافة (5) مل من محلول المستخلص النباتي الى (5) مل من محلول الكاشف , بعدها دفئ المحلول لمدة 3 دقيقة , دل ظهور البلورات على وجود مجموعة الكاربونيل (زكريا ورديف , 1981) .

5. الكشف عن المركبات الهيدروكربونية

تم الكشف عن المركبات الهيدروكربونية بوساطة كاشف مولش , حيث أضيف (2) مل من محلول α-naphthol الكحولي الى حوالي (2) مل من محلول المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار ورج الخليط جيدا , وأضيف مع الحذر (1) مل من حامض الكبريتيك المركز على جدران الانبوبة بحيث تنزلق الى قعر الأنبوبة مكونة طبقتين , كان المحلول الهيدروكربوني الى الأعلى والحامض الى الاسفل وعند السطح الفاصل ظهرت حلقة بنفسجية (زكريا ورديف , 1981).

٣.١١. تقييم السمية الخلوية للمستخلص الميثانولي والمائي لنبات *C. speciosus* .

استخدمت كريات الدم الحمراء للإنسان لحساب السمية الخلوية للمستخلصين وذلك طبقاً لطريقة Xian-guo and Urasella (1994) إذ تم سحب (2)مل من الدم ووضع في أنبوبة حاوية على مادة مانعة لتخثر الدم (EDTA) وحضر تركيز (500)ملغم / مل من محلول الفسيولوجي (PBS) لكلا المستخلصين واستخدم معامل سيطرة سالب يحتوي محلول الملح الفسيولوجي فقط ومعامل السيطرة

الموجب (ماء حنفية) , تم بعدها وضع (0.8) مل من كلا المستخلصين في أنبوبة معقمة وأضيف (0.2) مل من كريات الدم الحمراء ليصبح الحجم النهائي (1)مل . بعدها حضنت الانابيب في الحاضنة وبدرجة حرارة (37) مْ ولمدة (3) ساعات حيث تم فحصها كل ساعة من الحضن لملاحظة تحلل كريات الدم الحمراء (Hemolysis) وسجلت النتائج بعد ذلك .

1.12.3. الحيوانات المختبرية Laboratory animals

أجريت الدراسة الحالية على ذكور الجرذان البيض (Males Albino Rat) من سلالة (*Rattus ratus*) اذ تم الحصول عليها من معهد علاج العقم وبحوث الأجنة– جامعة النهرين بأعمار وأوزان متقاربة تراوحت بين 100 – 180 غرام , وقد أدخلت بمختبر خاص في البيت الحيواني لكلية التربية – جامعة القادسية في اقفاص لدائنية ذات أبعاد (20x21x45) سم , وبواقع أربعة حيوانات في كل قفص , وتمت تهيئة الظروف الملائمة من حيث التهوية والإضاءة والتغذية .

2.12.3. الامراضية Pathogenicity

لغرض التحري عن امتلاك الفطر *Aspergillus* spp. القدرة على إحداث تأثيرات مرضية تم اختبار أحد عزلات النوع الأكثر ظهوراً من بين الانواع الاخرى وحسب ما تم التوصل اليه في نتائج الاختبارات المختبرية (*in-vitro*) الواردة في الفقرة (3.3.) تم انتخاب أحد عزلات الفطر *A.fumigatus* , وتم إخضاعها لسلسلة من الاختبارات المعتمدة أساساً على الطريقة الأحيائية في الكشف عن التأثيرات المرضية والمحتمل حدوثها بفعل هذا الفطر .

1.2.12.3. تحضير العالق البوغي Preparation of Fungal Suspension

أتبعت طريقة السامرائي (1997) حيث غمرت عزلات الفطر *A. fumigatus* المنماة على بيئة SDA في أنابيب مائلة (Slant Agar tubes) سعة 15 مليلتر بعمر (5-7) أيام وتحت ظروف بيئية معقمة بحوالي 2 مليلتر من محلول الملح الفسلجي (0.85%), ثم باستخدام Needle المعقم تم كشط الجزء العلوي للمستعمرات الفطرية الذي يحتوي على المكونات الفطرية (Fungi elements) والتي تشمل على الخيوط الفطرية والكونيدات والابواغ وتم إضافة قطرة من مادة Tween 80 (0.01%) للتقليل من التوتر السطحي للخلايا الفطرية حتى لا تلتصق بجدار الأنابيب وتم تحريك الأنابيب جيداً حتى تكون مزيجاً معلقاً Suspension , وتم نقل المزيج الى أنابيب معقمة وتركت لمدة 5 دقائق لكي تترسب الأجزاء الثقيلة , ثم أخذ هذا المزيج المعلق وتم خلطه جيداً بجهاز Vortexحتى تم التجانس.

3 .2.2.12. حساب تركيز العالق البوغي

أخذ قياس كثافة العالق البوغي بوساطة جهاز قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometer كما هو موضح في الخطوات التالية : تم معايرة وضبط الجهاز على (100 , 0) وضبط النفاذية Transmittance وتم ضبط الطول الموجي Wavelength عند (530) نانوميتر حيث تم وضع المحلول المعياري الذي تم استخدامه في تحضير اللقاح الفطري وهو المحلول الفسيولوجي (0.85%) في الانبوبة الخاصة بالجهاز بعد تعقيمها وتم ضبط المحلول المعياري على النفاذية بالفطريات تحت طول موجي (530) نانوميتر ونفاذية (95%) بالنسبة للفطريات للحصول على تركيز اللقاح الفطري (10^7 كونيديا/مل) (Gazzoni *et al*., 2013; Espinel – Ingroff *et al*.,1997) .

12.3 .٣. تحضير الجرع العلاجية لنبات *C.speciosus*

على ضوء نتائج الاختبارات (*in-vitro*) والواردة ضمن الفقرة (٧.3.) والتي بينت نوع المستخلص الأكفأ والتركيز الاكثر فاعلية , وانطلاقا من هذا التأثير قمنا باقتراح الجرعة العلاجية (ملغم /كغم) بغية تحديد فاعلية هذا المستخلص على الفطر *A.fumigatus* المؤثر في الانسجة الحيوية لرئات ذكور الجرذان البيض المختبرية , فقد تم تحضير هذه الجرعة بإذابة (10) غم من مسحوق المستخلص الكحولي لنبات الاختبار في (100)مل من الماء المقطر المعقم للحصول على محلول قياسي (Stock solution) تركيزه (100) ملغم /مل وباستخدام المعادلة ($N_1\ V_1=N_2\ V_2$) خفف المحلول للحصول على الجرعة العلاجية المطلوبة بتركيز (75) ملغم / مل .

12.3. 4 . تصميم التجربة Experimental Design

استخدمت في هذه التجربة (30) من ذكور الجرذان البيض , وتم تقسيمها مبدئياً على مجموعتين , سجلت أوزانها الابتدائية , وعندئذ عوملت على النحو الاتي :

1. **مجموعة السيطرة (C)** :تضمنت (10) جرذان تناولت العليقة الغذائية القياسية وماء الشرب الاعتيادي طيلة مدة التجربة , وحقنت مرة واحدة فقط بالمحلول الملحي الفسلجي (Normal saline 0.85%) داخل التجويف الأنفي (I.N) .

2. **مجموعة المعاملة (T) :** تضمنت (20) من ذكور الجرذان البيض , التي قد تم عمل تضعيف للجهاز المناعي للجرذان المعاملة المختبرة مما يزيد من نسبة حدوث الإصابة الاصطناعية , وذلك من خلال حقنها تحت الجلد (S.C) بعقار الهيدروكورتزون (Hydrocortisone) وبجرعة 129 ملغم/كغم وبواقع خمس جرع لكل جرذ مقسمة على النحو الاتي , وذلك استنادا لما ورد في دراسة (ناجي وأخرون , 2006).

   1. الجرعة الأولى - قبل إحداث الإصابة بأربعة أيام .
   2. الجرعة الثانية - بعد يومين من الجرعة الأولى .
   3. الجرعة الثالثة - وهذه الجرعة اعطيت قبل إحداث الإصابة .
   4. الجرعة الرابعة - بعد ثلاثة أيام من إحداث الإصابة .
   5. الجرعة الخامسة - بعد يومين من الجرعة الرابعة .

قبل إحداث الإصابة تم التخدير الجزئي لجميع جرذان المجموعة المعاملة باستخدام جرعة من Ketamine-Hameln (0.02) مايكرو ليتر/جرذ عن طريق الحقن في الوريد الذيلي (I.V) تبعاً لطريقة (Goodman and Gilmans , 2001) .

ومن ثم تم حقن عالق الفطر *A. fumigatus* الجرثومي داخل التجويف الأنفي (I.N) وذلك بعد أزاله التحسس تبعاً للطريقة التي أشار إليها (Mondon *et al.*, 1996) باستعمال قطعة من القطن المشبعة بخليط من الكلوروفورم والكحول الأثيل والأيثر 1:2:3 , بجرعة واحدة تركيزها (10^7 كونيديا/مل) مقدار (25) مايكرو ليتر وذلك بوساطة (Micropipette), طبقاً لطريقة (Shatha and Akbal , 2010) .

تركت الجرذان لمدة أسبوع بعد الحقن بالعالق الجرثومي وتم خلال هذه المدة متابعتها يومياً وملاحظة حركتها وتغذيتها وطريقة تنفسها , وحالما بدأت العلامات السريرية للجرذان المعاملة بالظهور

والمتمثلة بالكسل والخمول وفقدان الشهية ونقصان الوزن واحتقان الأنف والعيون (ناجي وأخرون ,2006) , عندئذ قسمت على مجموعتين :

1. **المجموعة المعاملة الأولى (T_1)** : اشتملت (10) جرذان . تركت بدون معالجة كمجموعة سيطرة موجبة .

2. **المجموعة المعاملة الثانية (T_2)** : اشتملت (10) جرذان . تم معاملتها بالمستخلص الكحولي لنبات *C.speciosus* بجرعة مقدارها (75 ملغم/كغم) وبكمية (0.25 مل)عن طريقة الشرب بالأنبوبة المعدية (Stomach tube) التي توضع في الفم مباشرة (ابن القيم الجوزية وآخرون ,2004) لمدة (21) يوماً (مدة التجربة) , وبواقع جرعة علاجية واحدة كل يوم .

3.12.٥. الدراسة المرضية Pathological study

سجلت خلال مدة التجربة العلامات والاعراض التي تظهر على جرذان التجربة وسجلت عدد الحيوانات المصابة والهالكة فضلاً عن بعض العلامات والاعراض التي استخدمت كمعيار وهي : اضطراب التنفس وفقدان التوازن واحتقان الأنف ونقصان الوزن , أذ تمت مراقبة ظهور هذه العلامات يومياً بعد تعرض هذه الحيوانات للإصابة التجريبية .

3.12.6. التضحية بالحيوانات Animal Sacrificing

تمت التضحية بالحيوانات بعد انتهاء مدة التجربة (28) يوماً , تم خلالها تشريح الحيوانات المصابة بفطر *A.fumigatus* حال موتها أما مجموعة الجرذان المعاملة بمحلول المستخلص فقد خدرت في اليوم (29) من بدء التجربة بطريقة الحقن داخل الخلب (I.P) بكل من Xylazine وKetamin وبجرعة 5 و 50ملغم/كغم من وزن الجسم للمخدرين كلاهما على التوالي , بعد ذلك ثبتت أطرافها الامامية والخلفية بوساطة دبابيس في صحن التشريح وفتحت بطنها في مقص حاد في أسفل المنطقة الجلدية البطنية وبالقرب من الجهاز التناسلي الذكري , وذلك بعمل شق طولي ابتداء من المنطقة الخلفية حتى المنطقة الامامية بعدها تم استخراج (الرئة Lung) لكل جرذ ثم غسلت جيداً بمحلول الملح الفسلجي (Normal saline) ثم تم حساب أوزانها باستخدام ميزان حساس بعدها ثبتت بالفورمالين 10% لغرض دراسة التغيرات النسجية فيها (الصالحي , 2012) .

7.12.3. الفحوصات المرضية Pathological Examination

1.7.12.3. الفحص العياني

لوحظت التغيرات المرضية العيانية في الاعضاء الداخلية للجرذان المحقونة بفطر *A.fumigatus* ومجاميع السيطرة من حيث شكل العضو(الرئة) واللون والحجم والتغيرات التي طرأت عليه.

2.7.12.3. الدراسة النسيجية Histological study

تم تحضير المقاطع النسجية من العضو الذي اشتملت عليه الدراسة بالاعتماد على الطريقة الموصوفة من قبل (Scheuer and Chalk ,1986) والمتضمنة ما يأتي :

1. الحفظ والتثبيت Preservation and Fixation : حفظت الأنسجة في محلول الفورمالين 10% وهذا المحلول يعد مثبتاً أيضاً ولمدة لا تقل عن 48 ساعة .
2. الغسل Washing: غسلت الأنسجة بالماء المقطر للتخلص من أثار المادة المثبتة .
3. سحب الماء (الأنكاز) Dehydration: تمت هذه الخطوة بأمرار النسيج بتراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي (50 , 70 , 90 , 100 , 100)% ولمدة ساعة لكل تركيز .
3. الترويق Clearing: تمت بمعاملة النسيج بمحلول مختلط من كحول الأثيلي والزايلول (Xylol) وبنسبة (3:1 , 1:1 , 1:3) على التوالي ثم تركت بالزايلول النقي لمدة ثلاث دقائق .
4. التشريب Infiltration: غمر النسيج في خليط من الزايلول وشمع البرافين المنصهر بدرجة 60 مْ وبنسبة (3:1 , 1:1 , 1:3) على التوالي بمعدل ساعتين لكل تركيز. ثم نقلت إلى البرافين النقي المنصهر بدرجة 60 مْ وتركت لمدة أربع ساعات .
5. الطمر Embedding: بعد التشبيع نقل النسيج إلى قالب معدني مكعب الشكل وأضيف له البرافين النقي المنصهر بدرجة 60 مْ ثم ترك ليتصلب في درجة حرارة الغرفة .
6. التقطيع Sectioning : تم تقطيع الأنسجة باستخدام المايكرو توم الدوار (Rotary microtome) بسمك (5) مايكرو وميتر, أذ قطعت العينات على صورة أشرطة تم نقلها إلى حمام مائي بدرجة (45- 40) مْ , لغرض فرش المقاطع وانبساطها ثم نقلت الى شرائح زجاجية وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 24 ساعة .
7. التلوين Staining : صبغت المقاطع بصبغة الهارس هيماتوكسلين والأيوسين (H&E) حيث وضعت الشرائح بالزايلين لمدة دقيقتين ومررت بعدها بسلسلة تنازلية من الكحول الأثيلي (70 , 90 , 95 , 100)% ولمدة دقيقتين في كل تركيز ثم تم تصبيغها بالهيماتوكسلين لمدة دقيقتين وغسلت بماء الحنفية

ثم صبغة بالأيوسين لمدة دقيقتين ثم غسلت بماء الحنفية أيضا ثم مررت بسلسلة تصاعدية من الكحول الأثيل Ethanol (70 , 90 , 95 , 100)% لمدة دقيقتين بعدها تم وضعها في الزايلين لمدة دقيقتين .

8. التحميل Mounting : بعد الانتهاء من التصبيغ وضعت مادة D.P.X اللاصقة على الشريحة الزجاجية ووضع فوقها غطاء الشريحة وتركت لتجف .

بعد ذلك تم فحص وتصوير الشرائح باستخدام المجهر المركب نوع (Lw scientific – USA) والمزود بكامرة رقمية وعلى قوة تكبير مختلفة لملاحظة التغيرات النسجية المرضية Histophathological changes.

13.3. التحليل الإحصائي Statistical analysis

بهدف معرفة الفروق المعنوية بين معدلات المعايير المدروسة حللت قسم من نتائج هذه الدراسة إحصائياً باستعمال مربع كاي X^2-square وهي كل من نتائج عزل انواع جنس *Aspergillus* spp. باستعمال البرنامج الإحصائي الشامل (SPSS) الإصدار (Version-20) عند مستوى احتمال ($P<0.05$) . في حين حللت بقية نتائج التجارب باستعمال تحليل التباين الاحادي (ANOVA) One Way Analysis of Variance Test ضمن برنامج التحليل الاحصائي ذاته (محمود , ٢٠١٣) وتم اختبار الفروقات بين متوسطات المجاميع باستعمال قيمة أقل فرق معنوي (LSD) Least Significant Difference عند مستوى احتمال ($P<0.05$) لتحديد معنوية الاختلافات وفق ما جاء في (الراوي وخلف الله , ٢٠٠٠).

٤. النتائج Results

1.4. العزل والتشخيص للعينات المرضية

1.1.4. العزل

أظهرت نتائج الفحص المجهري المباشر (Direct Microscopic Examination) لعينات الدراسة نتيجة موجبة للتحري الأولي عن جود الخيوط الفطرية لجنس *Aspergillus* التي تبدو ثنائية التفرع ومقسمة في (36) عينة قشع مقابل (370) عينة سالبة من المجموع الكلي للعينات , وتم اختبار حساسية الفحص بالمقارنة بنتائج الزرع المختبري فقد أظهرت (96) عينة من المجموع الكلي للعينات

نتيجة موجبة على وسط السابرويد , وبلغ عدد الحالات السالبة (310) حالة بالنسبة لجنس *Aspergillus* وكما مبين في الجدول (4 - 1) .

جدول (4 - 1): نتائج الفحص المجهري وطريقة الزرع لعينات القشع .

الفحص المجهري المباشر (KOH)	نتائج الزرع الفطري		المجموع
	Positive	Negative	
Positive	7 (a)	29 (b)	36
Negative	89 (c)	281 (d)	370
المجموع	96	310	406

ويوضح الجدول (4 - 2) الحساسية والانتقائية لطرائق التشخيص المختبري , فبلغت حساسية الفحص المجهري المباشر (7.29 %) , في حين بلغت خصوصية الفحص (90.64%) بالمقارنة مع حساسية وخصوصية الزرع الفطري والبالغة (100%) .

جدول (4-2) : حساسية وخصوصية الفحص المجهري وطريقة الزرع .

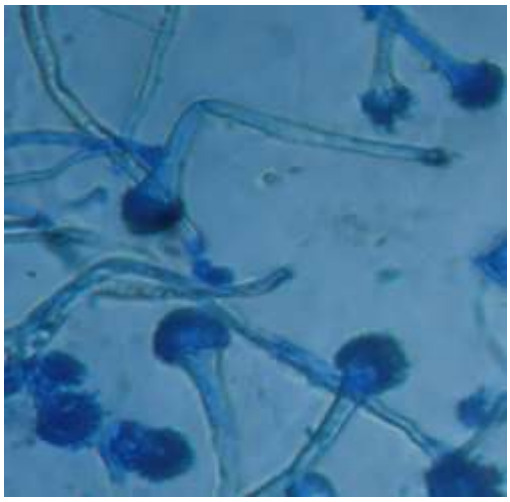
نوع الفحص	Sensitivity	Specificity
الفحص المجهري المباشر (KOH)	% 7.29	% 90.64
نتائج الزرع الفطري	% 100	%100

2.1.4. تشخيص أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة .

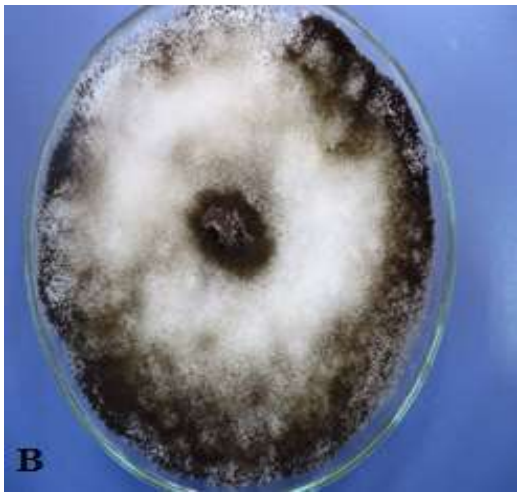
بينت نتائج الدراسة الحالية تشخيص تسعة أنواع تابعة للجنس *Aspergillus* من العينات المشمولة بالدراسة , وهي *A. fumigatus* , *A. niger* , *A. flavus* , *A. terreus* , *A. nidulans* , *A. ochraceous* , *A. penicillioides* , *A. parasiticus* & *A. ustus* وذلك اعتمادا

على ما ابدت هذه الأنواع من تباين واضح في الصفات المجهرية والمظهرية على الأوساط الزرعية التفريقية (ملحق 4) , كما مبين بالشكل (4-1) .

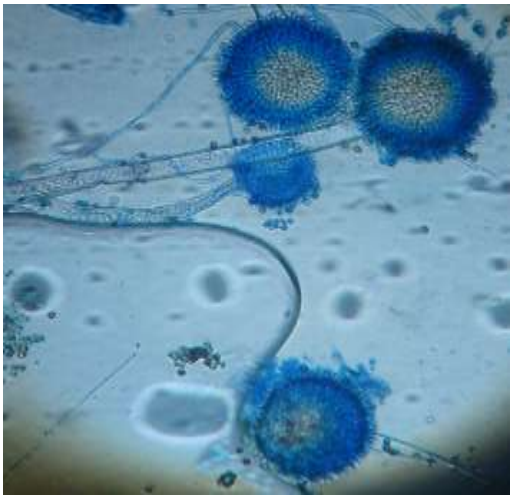
مستعمرة الفطر *A. fumigatus*



الرؤوس الكونيدية وحامل الكونيدات (40x)

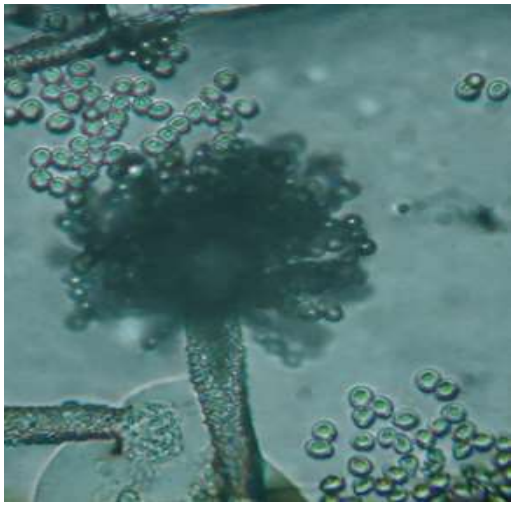


مستعمرة الفطر *A. niger*

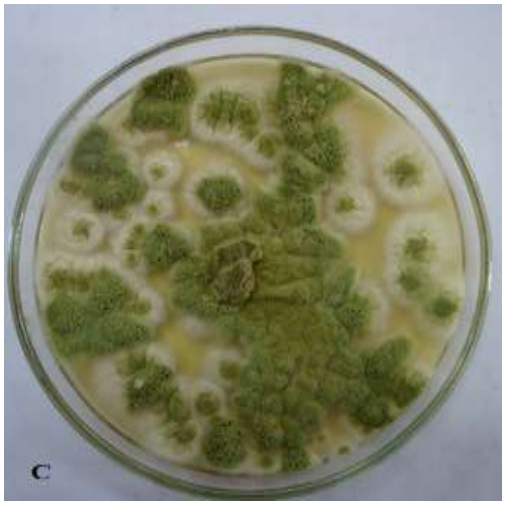


الرؤوس الكونيدية وحامل الكونيدات

(40x)

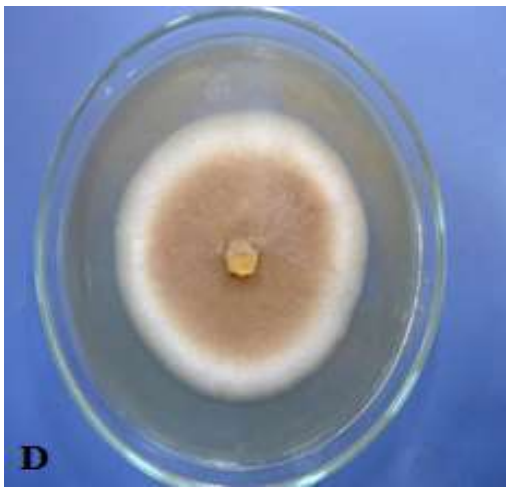


الرأس الكونيدي (40x)

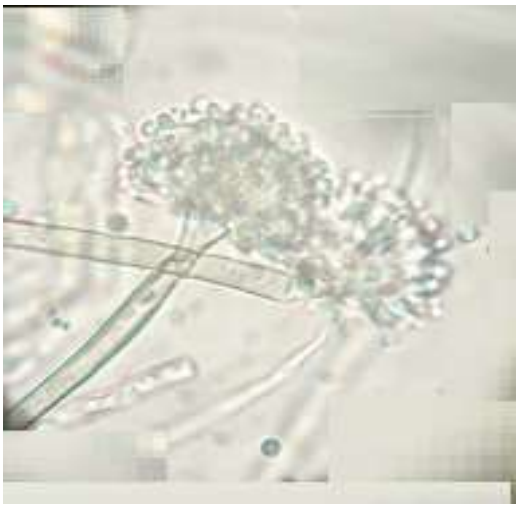


مستعمرة الفطر *A. .flavus*

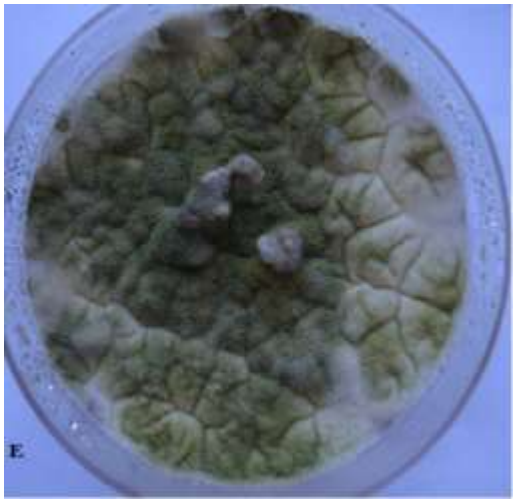
الرؤوس والحامل الكونيدي (40x)



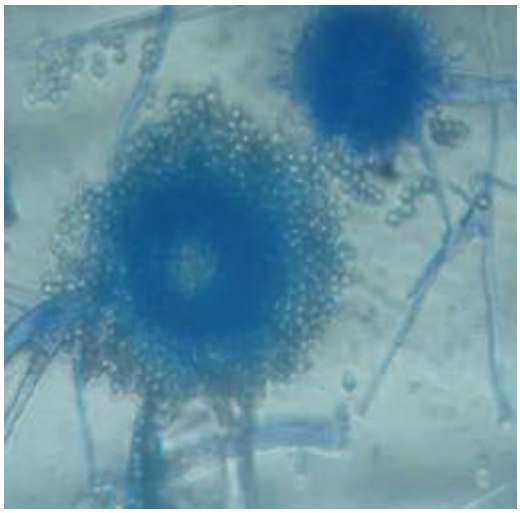
مستعمرة الفطر *A. terreus*



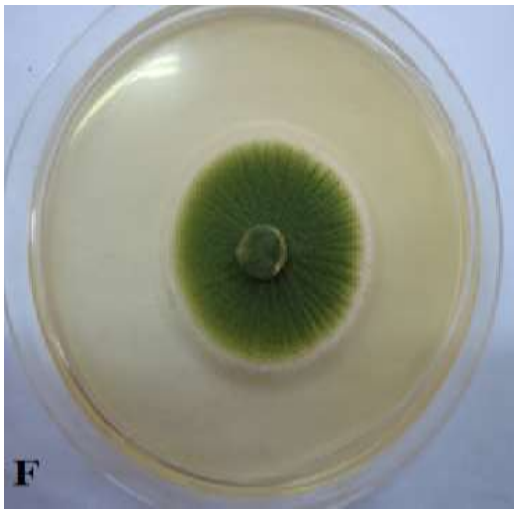
الرؤوس والحامل الكونيدي (40x)



مستعمرة الفطر *A.nidulans*

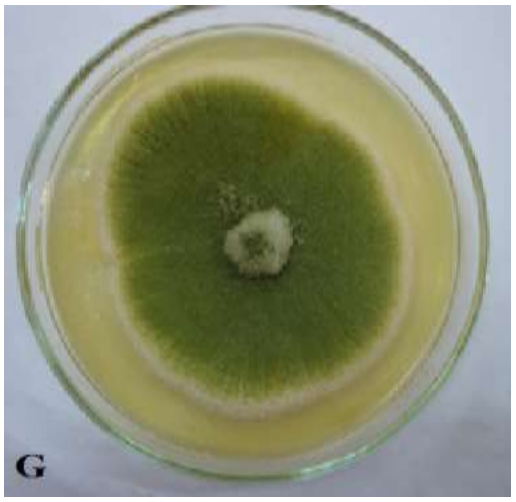


الرأس الكونيدي (40x)

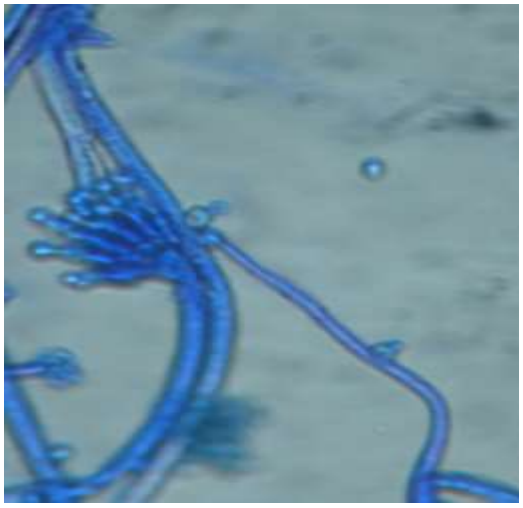


مستعمرة الفطر *A.ochraceus*

الرأس الكونيدية (40x)



مستعمرة الفطر *A. parasiticus*



الرأس الكونيدية (40 x)

مستعمرة الفطر *A. ustus*

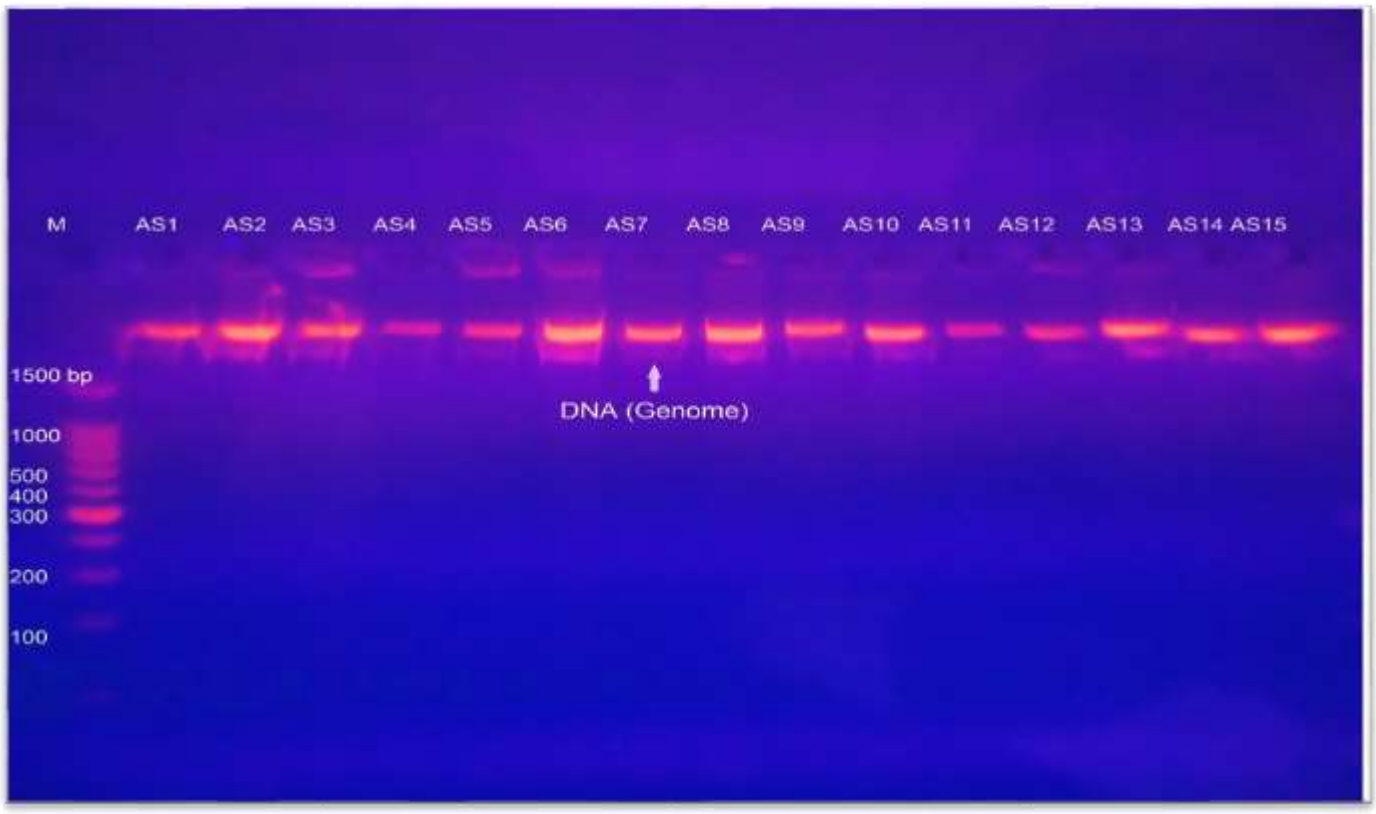
شكل (4-١): انواع جنس *Aspergillus* المعزولة على وسط (CZA) .

3.1.4.التشخيص الجزيئي باستخدام تفاعل سلسلة انزيم البلمرة Molecular Diagnosis by PCR

بعد أن تم تشخيص الأنواع الفطرية المعزولة بوساطة الطرائق التقليدية والقائمة على تحديد المعايير المظهرية باستخدام المفاتيح التصنيفية كما مبين سابقاً , تم انتخاب اربعة أنواع تابعة لجنس *Aspergillus* للتأكد من صحة تشخيصها بالاعتماد على الخصائص الوراثية للعزلات المختارة وباستخدام بادئات الخاصة بكل نوع .

1.3.1.4. استخلاص ال DNA

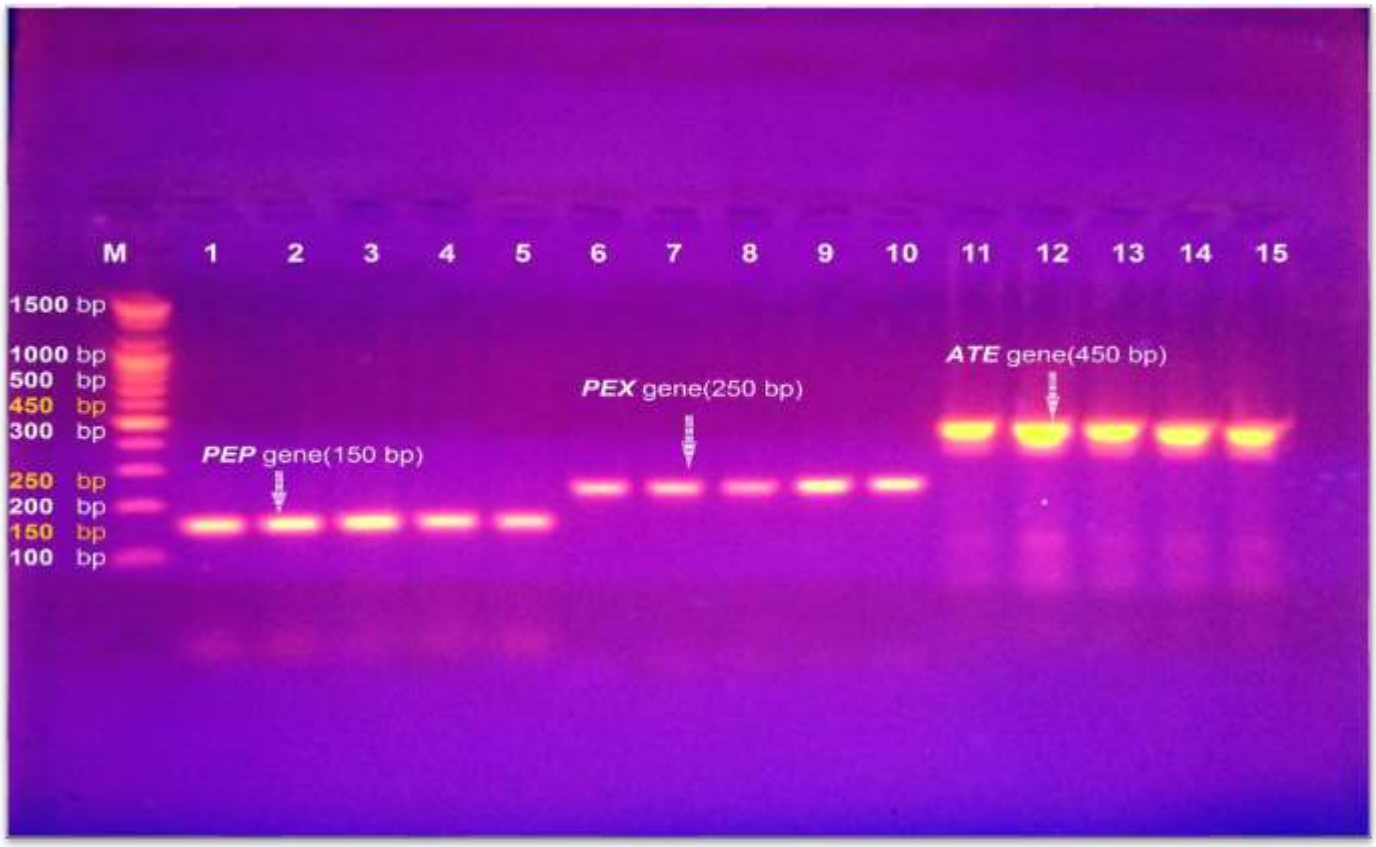
أظهرت نتائج استخلاص ال DNA لعزلات الأنواع المختبرة باستعمال العدة الخاصة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الأكاروز (1.5 %) والكشف عنه باستعمال صبغة الأثيديوم بروماید وفحصه تحت الأشعة فوق البنفسجية (U.V.transiluminator) احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة للحامض النووي DNA المستخلص بأخذ الموقع نفسه على صفيحة أسناد الأكاروز. كما مبين بالشكل (4-2) . وتم قياس كمية ونقاوة ال DNA المستخلص بأستعمال جهاز Nanodrop كما موضح في الملحق (5).



الشكل (4-2) : **الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) لل DNA على هلام الأكاروز (1.5%) وفولتية (100) ولمدة ساعة لعزلات فطر.*Aspergillus* spp باستعمال عدة Genomic DNA Mini Kit** . حيث أن M: DNA Ladder(100-1500 bp) ,bp: base pair زوج قاعدي , $AS_{(1,2,3)}$: *Aspergillus niger* , $AS_{(4,5,6,7)}$: *A.fumigatus* , $AS_{(8,9,10,11)}$: *A.flauvs* , $AS_{(12,13,14,15)}$: *A.terreus* .

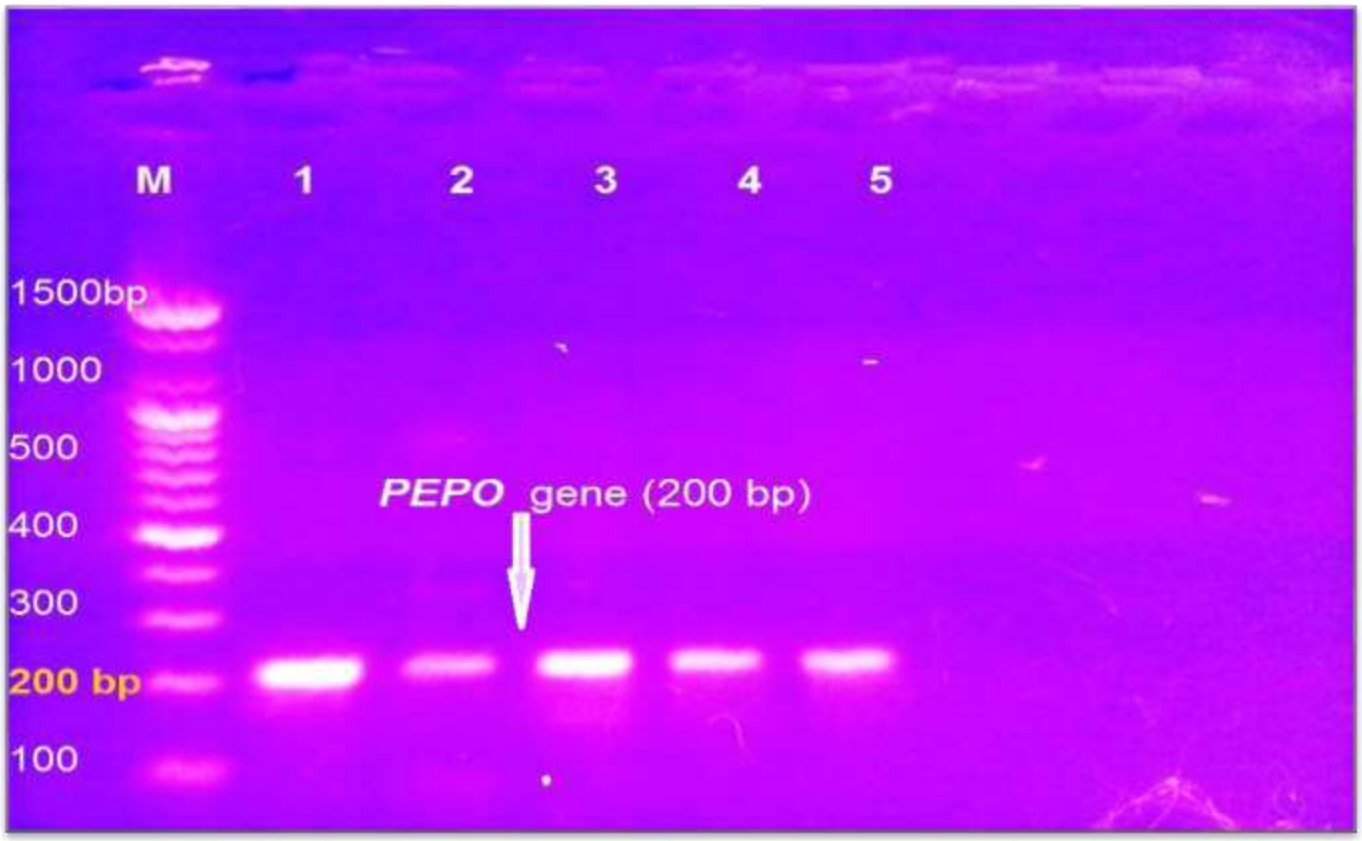
2.3.1.4. التشخيص ألتوكيدي للتحري عن عزلات *Aspergillus* spp. باستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة (PCR).

أشارت بوضوح نتائج تقنية ال PCR إلى وجود تباين في حجوم نواتج التضخيم للجينات المدروسة باستخدام بادئات الجينات *PEP* , *PEX* , *ATE* , *PEPO* لجميع عزلات الفطريات المدروسة وهي *A. fumigatus* , *A.niger* , *A. terreus* , *A.flavus* , حيث بلغت 200,450,250,150 زوج قاعدي على التوالي , مما اعطى فرصة التمييز بينها اثناء عملية الترحيل الكهربائي . كما مبين بالشكلين (4-3) و (4-4) .



الشكل (4-3) : **الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضخيم الجينات (*PEP* , *PEX* , *ATE*) لعزلات الفطر .*Aspergillus* spp باستعمال تقنية Single PCR** . حيث أن M : DNA Ladder (100-1500 bp) , العزلات (1,2,3,4,5) العائدة للفطر *A. niger* أظهرت نتيجة موجبة لجين *PEP* (150 زوج قاعدي) , العزلات

(6.7.8.9.10) العائدة للفطر *A.fumigatus* أظهرت نتيجة موجبة لجين *PEX* (250 زوج قاعدي) , والعزلات (11,12,13,14,15) العائدة للفطر *A.terreus* أظهرت نتيجة موجبة لجين *ATE* (450 زوج قاعدي) .



الشكل (4-4) : **الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضخيم الجين (*PEPO*) لعزلات الفطر *Asp. flavus* باستعمال تقنية Single PCR .** حيث أن M : DNA Ladder (100-1500 bp) , العزلات (1,2,3,4,5) العائدة للفطر *A. flavus* أظهرت نتيجة موجبة لجين *PEPO* .

2.4. النسبة المئوية لظهور وتردد أنواع الجنس *Aspergillus* spp.

أوضح التحليل الإحصائي باستخدام مربع كاي وجود فروق عالية المعنوية لنسب العزل المئوية بالنسبة للأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* المعزولة وأعدادها ($X^2 = 0.589$, P=0.05) جدول (4 - 3) , إذ يتضح من نسب العزل المئوية سيادة الفطر *A. fumigatus* بواقع (32) عزلة مشكلة نسبة تكرار (29.90 %) من المجموع الكلي للعزلات جنس *Aspergillus* , وبنسبة ظهور (33.3 %) من مجموع العينات البالغة (96) عينة , وشكل الفطر *A. niger* المرتبة الثانية بواقع (31) عزلة وبنسبة تكرار (٢٨.٩٧%) , في حين بلغت نسبة التكرار بالنسبة للفطر *A. flavus* (18.69%) وبواقع (20) عزلة , وفي الجدول نفسه ظهر الفطر *A. terreus* بواقع (13) عزلة بنسبة تكرار(12.14%) وفي

دراستنا هذه سجلت (6) عزلات لنوعين غير شائعة كمسببات مرضية جهازية وهي *A. ochraceous* و *A. parasiticus* بواقع (4) و(2) عزلة وبنسبة (3.73%) و (1.86%) على التوالي , ويعتبر هذا أول عزل محلي لهما من قشع مرضى أصابات الجهاز التنفسي .

وتضمنت الدراسة أيضاً عزل الفطرين *A. ustus* و *A. penicillioides* بواقع عزلة واحدة لكل نوع مشكلة نسبة (0.93%) لكل فطر, ويعتبر هذا أول عزل لهذين النوعين في العراق من مرضى أصابات الجهاز التنفسي .

جدول (4 - 3): النسبة المئوية لظهور وتردد أنواع جنس *Aspergillus* spp. **المعزولة من قشع مرضى الأخماج الرئوية**

انواع جنس *Aspergillus* Micheli exLink المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية للتكرار(%)	النسبة المئوية للظهور(%)
Aspergillus fumigatus **Fersenium**	**32**	**29.90**	**33.3**
Aspergillus niger **Van Tieghen.**	**31**	**28.97**	**32.29**
Aspergillus flavus **Link & Fries.**	**20**	**18.69**	**20.83**
Aspergillus terreus **Thon.**	**13**	**12.14**	**13.54**
Aspergillus nidulans**(Eidam) Wint.**	**3**	**2.80**	**3.12**
Aspergillus ochraceus **K.Wilh.**	**4**	**3.73**	**4.16**
Aspergillus parasiticus **Speare.**	**2**	**1.86**	**2.08**
Aspergillus penicillioides **Spegazzini.**	**1**	**0.93**	**1.04**
Aspergillus ustus **(Bainier)Thom & Church.**	**1**	**0.93**	**1.04**
مجموع العزلات الكلي	**107**	**100**	**—**

قيمة X^2 = (0.589) بين الأنواع الفطرية وعدد العزلات تحت مستوى احتمالية (P = 0.05) .

3.4. نتائج فاعلية مستخلصات نبات *Costus speciosus* الخام والمضاد الفطري Ketoconazole على بعض الجوانب الفسلجية للفطريات مختبرياً.

1.3.4. تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في النمو الشعاعي للفطريات المنتخبة .

بين التحليل الإحصائي لنتائج التأثير التثبيطي لمستخلصات النبات المختبر على معدل أقطار مستعمرات أنواع جنس *Aspergillus* والتراكيز المستعملة كافة , أن هنالك فروقات معنوية ($P<0.05$) بين الفعالية التثبيطية للمستخلصات الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ بمعدلات متباينة فيما بينها بحسب تركيز المعاملة ونوع الفطر . إذ أن معدلات أقطار المستعمرات الفطرية كانت تتناسب عكسياً مع تركيز المعاملة , إذ تقل معدلات أقطار نمو الفطريات كلما أزداد تركيز المستخلص والمضاد الفطري على العكس من النسبة المئوية للتثبيط التي كانت تزداد بزيادة التركيز , وقد بينت النتائج تفوقاً معنوياً للمستخلص الكحولي للنبات المختبر في تثبيط النمو الشعاعي للفطريات جميعها بمتوسط تأثير بلغ (78.01 , 76.94 , 77.38 , 80.42 %) في حين بلغ متوسط تأثير المستخلصات المائية (62.98 , 63.94 , 73.75 , 72.09 %) للفطريات , *A.terreus* *A.niger* , *A.fumigatus* , *A.flavus* على التوالي لكل معاملة , بالقياس لمعاملات المضاد الفطري KCZ حيث بلغ متوسط تأثير المضاد بالتراكيز نفسها (51.61 , 59.49 , 73.43 , 69.06 %) على التوالي وللفطريات نفسها.

أظهرت نتائج الاختبار الموضحة في الجدول (4 ـ 4) أن جميع المعاملات المستخدمة كانت فعالة في الحد من نشاط الفطر *A. niger* قياساً بمعاملة المقارنة , وقد تباينت المعاملات في ما بينها في قدرتها على تثبيط النمو الشعاعي للفطر, وقد تفوقت معنوياً ($P<0.05$) معاملة المستخلص النبات الكحولي للتراكيز جميعها مقارنة في المعاملات الأخرى للتراكيز نفسها , فقد بلغ معدل قطر مستعمرات الفطر ما بين (35.6±1.35 - 9.73±0.61) ملم بالقياس لمعاملات المقارنة لهذا الفطر التي كانت

بمعدل قطر (0±90.00) ملم , وقد أحدثت التراكيز جميعها خفضاً معنوياً في معدل النمو بالقياس لمعاملة المقارنة بشكل متفاوت وكان التأثير في ما بين التراكيز (75,50 ملغم/مل) غير معنوياً (P>0.05) , كما موضح في الشكل (4- 5) . وقد جاء المستخلص المائي بالمرتبة الثانية في تأثيره على الفطر *A. niger* ومن الجدول نفسه نلاحظ التفوق المعنوي للمستخلص المائي على المضاد الفطري KCZ للتراكيز جميعها عدا التركيز(25 ملغم/مل) الذي أظهر تأثيراً مقارباً معنوياً لما أظهره المضادKCZ .

كذلك بينت نتائج التحليل الإحصائي وجود الفروق المعنوية (P<0.05) لتأثير المستخلص الكحولي على الفطر *A. fumigatus* إذ بلغ معدل قطر المستعمرات ما بين (1.82±33.5 - 0.58±10.2) ملم بالقياس لمعاملات المقارنة لهذا الفطر التي كانت بمعدل قطر (0±90.00) ملم , وكان التراكيز(75 ملغم/مل) للمستخلص الكحولي مقارب معنوياً لمعاملة المضاد KCZ عند التركيز نفسه . أما تأثير المستخلص المائي على الفطر *A. fumigatus* كان أعلى من تأثير المضاد KCZ , وأزداد التأثير بزيادة التركيز محققاً نسب التثبيط أعلاه عند أعلى تركيز للمستخلص المائي المستخدم (75ملغم / مل) , علماً انه لم يسجل فرق معنوي (P>0.05) بين المستخلص المائي والمضاد الفطري KCZ عند التركيز (5 ملغم/مل) وكذلك عند التركيز(50ملغم/مل) للفطر نفسه كما موضح في الشكل(4-6) والجدول (4 - 5).

أما بالنسبة للفطر*A.flavus* فقد أدت جميع المعاملات إلى خفض معنوي لمعدلات أقطار المستعمرات قياساً بمعاملة المقارنة . حيث بينت النتائج بأن معاملة الفطر بالمستخلص النبات الكحولي كانت الاكفأ من بين المعاملات المستخدمة , إذ بلغ معدل قطر المستعمرات(9.73 ± 0.8) ملم عند التركيز(75 ملغم/مل) والتي لم تختلف معنوياً عند التركيز نفسه لمعاملة المضاد KCZ (0.21±9.56) ملم , في حين تفوق المستخلص الكحولي عن باقي التراكيز مقارنة مع معاملة المضاد بفروق تعد منوية (P<0.05) . واختلفت معاملة المستخلص الكحولي بجميع بتراكيزه معنوياً في خفض النمو الشعاعي عن معاملة المستخلص المائي للنبات نفسه وللتراكيز نفسها عدا التركيز (10ملغم/مل) إذ لم يكن الاختلاف معنوياً , في حين تباينه معنوياً معاملة المستخلص المائي عن معاملة المضاد KCZ تبعاً للتركيز رغم ان متوسط التأثير التثبيطي للمعاملة بالمستخلص المائي والمضاد KCZ لجميع التراكيز مقارب معنوياً كما هو موضح في الشكل (4-٧) وفي الجدول (4 - 6) .

وقد تبين أن الفطر *A.terreus* أكثر العزلات حساسية للمستخلص الكحولي حيث بلغ معدل قطر المستعمرات مابين (24.7±2.06 - 8.3±0.81) ملم بالقياس لمعاملات المقارنة لهذا الفطر التي كانت بمعدل قطر (90.00±0) ملم وكما موضح في الشكل (4-8) , أما بالنسبة للمستخلص المائي فقد أظهر فاعلية عالية التثبيطية مقاربة معنوياً ($P>0.05$) لما أظهره المضاد KCZ عند التركيز (5 , 10 , 25 ملغم/مل) , في حين تفوق المضاد KCZ معنوياً ($P<0.05$) في التأثير التثبيطي على المستخلص المائي عند التركيز (50 , 75 ملغم/مل) بمعدل قطر بلغ (16.4±1.65 , 0.66±0.66) ملم على التوالي , كما مبين في الشكل (4-8) وفي الجدول (4 - 7).

وبصورة عامة كان تأثير مستخلص النبات الكحولي والمائي عالياً مقارنة مع المضاد KCZ , وأزداد تأثيرها بزيادة التركيز محققاً نسب التثبيط أعلاه عند أعلى تركيز للمستخلص المستخدم (75 ملغم/مل) .

جدول (4-4) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus niger* في الزجاج .

نوع المعاملة	معدل قطر مستعمرة السيطرة (ملم)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (ملم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبط)
		تركيز المعاملة (ملغم/مل)					
	0	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0±90	1.35±35.6 (60.3)	0.86±25.8 (71.33)	2.11±15.8 (82.36)	0.7±11.8 (86.88)	0.61±9.73 (89.18)	78.01 A
مستخلص نبات القسط المائي	0±90	2.42 ±43.5 (51.61)	1.46±41.1 (54.25)	2.19±37.8 (57.98)	1.14±21.9 (75.66)	2.94±22.1 (75.40)	62.98 B
المضاد الحيوي KCZ	0±90	1.46 ±67.8 (24.62)	1.03±47.6 (47.11)	1.06±36.1 (59.88)	1.13±29.8 (66.88)	2.7±17.2 (80.88)	51.61 C
متوسط تأثير التراكيز	90 (0.0) a	48.96 (45.51) b	38.16 (55.5) c	29.90 (63.01) d	21.16 (74.73) e	16.34 (81.82) f	للمعاملات = 1.99
L.S.D 0.05		للتراكيز = 2.82					
		للتداخل = 4.89					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للتثبيط على معدل أقطار مستعمرات الفطر القياسية.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية (بين متوسط تأثير التراكيز) في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية (بين المعاملات)
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات والتراكيز تحت مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD .

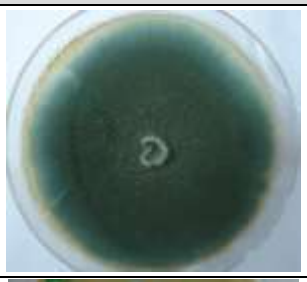
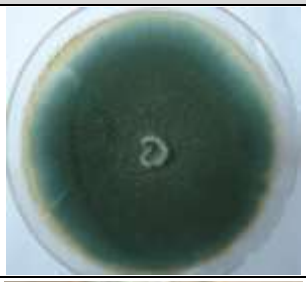
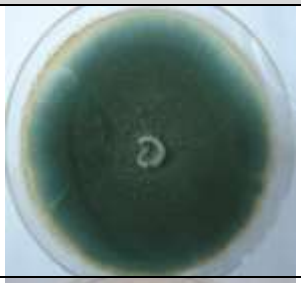
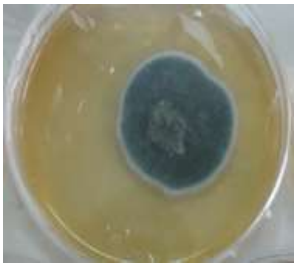
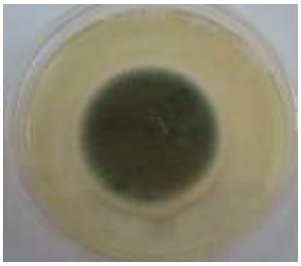
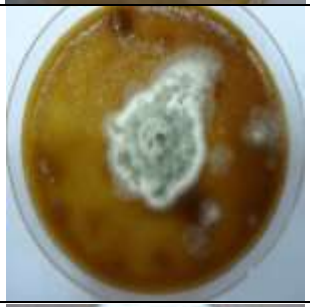
التركيز	مستخلص نبات القسط الكحولي	مستخلص نبات القسط المائي	المضاد الحيوي KCZ
0 (ملغم/مل)			
5 (ملغم/مل)			
10 (ملغم/مل)			
25 (ملغم/مل)			
50 (ملغم/مل)			
75 (ملغم/مل)			

الشكل (4-٥) : تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A. niger*.

جدول (4-5) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر*Aspergillus fumigatus* في الزجاج .

نوع المعاملة	معدل قطر مستعمرة السيطرة (ملم)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (ملم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبط)
		تركيز المعاملة (ملغم/مل)					
	0	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0±90	1.82±33.5 (62.77)	2.08±25.0 (72.22)	0.37±20.1 (77.63)	1.68±14.8 (83.5)	0.58±10.2 (88.60)	76.94 A
مستخلص نبات القسط المائي	0±90	1.48±57.7 (35.81)	2.52±33.8 (62.44)	0.46±29.4 (67.29)	1.45±21.8 (75.77)	1.36±19.4 (78.40)	63.94 B
المضاد الحيوي KCZ	0±90	3.74±59.2 (34.22)	11.4±54.0 (40.00)	3.73±36.1 (59.8)	0.95±20.3 (77.40)	1.16±12.5 (86.11)	59.49 C
متوسط تأثير التراكيز	90 (0.0) a	50.13 (44.76) b	37.61 (58.2) c	28.53 (68.24) d	18.97 (78.89) e	14.06 (84.37) f	للمعاملات = 0.058
L.S.D 0.05		للتراكيز = 2.32					
		للتداخل = 3.56					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للتثبيط على معدل أقطار مستعمرات الفطر القياسية.
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية (بين متوسط تأثير التراكيز)في حين تشيرالحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية (بين المعاملات)
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات والتراكيز تحت مستوى احتمالية ($P\leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD .

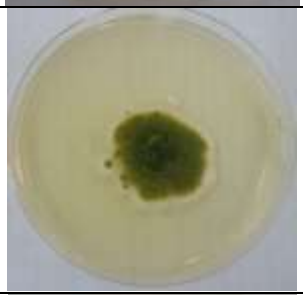
التركيز	مستخلص نبات القسط الكحولي	مستخلص نبات القسط المائي	المضاد الحيوي KCZ
0 (ملغم/مل)			
5 (ملغم/مل)			
10 (ملغم/مل)			
25 (ملغم/مل)			
50 (ملغم/مل)			
75 (ملغم/مل)			

الشكل (4-6) : تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.fumigatus* .

جدول (4 - 6) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus flavus* في الزجاج .

نوع المعاملة	معدل قطر مستعمرة السيطرة (ملم)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (ملم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبط)
		تركيز المعاملة (ملغم/مل)					
	0	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0±90	2.07±31.2 (65.25)	1.55±28.5 (68.33)	1.09±19.0 (78.87)	1.23±13.2 (85.30)	0.8±9.73 (89.18)	77.38 A
مستخلص نبات القسط المائي	0±90	1.83±33.7 (62.55)	1.16±29.5 (67.15)	1.53±22.3 (75.18)	1.55±17.0 (81.10)	0.99±15.4 (82.81)	73.75 B
المضاد الحيوي KCZ	0±90	1.29±37.9 (57.81)	2.03±24.4 (67.82)	2.03±23.7 (73.61)	1.94±19.6 (78.18)	0.21±9.56 (89.73)	73.43 B
متوسط تأثير التراكيز	90 (0.0) a	34.30 (61.87) b	27.48 (67.76) c	21.69 (75.88) d	16.61 (81.52) e	11.58 (87.24) f	للمعاملات = 1.62
L.S.D 0.05	للتراكيز = 2.29						
	للتداخل = 3.98						

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للتثبيط على معدل أقطار مستعمرات الفطر القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية (بين متوسط تأثير التراكيز) في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية (بين المعاملات)
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات والتراكيز تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) حسب اختبار أقل فرق معنوي LSD .

التركيز	مستخلص نبات القسط الكحولي	مستخلص نبات القسط المائي	المضاد الحيوي KCZ
0 (ملغم/مل)			
5 (ملغم/مل)			
10 (ملغم/مل)			
25 (ملغم/مل)			
50 (ملغم/مل)			
75 (ملغم/مل)			

الشكل (4-7) : تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.flavus* .

جدول (4 - 7) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole على النمو الشعاعي للفطر *Aspergillus terreus* . في الزجاج .

نوع المعاملة	معدل قطر مستعمرة السيطرة (ملم)	معدل قطر المستعمرات بوجود المعاملة (ملم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة (نسبة التثبط)
		تركيز المعاملة (ملغم/مل)					
	0	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0±90	2.06±24.7 (72.55)	2.15±22.8 (74.62)	0.92±19.1 (78.74)	0.64±13.1 (85.44)	0.81±8.3 (90.77)	80.42 A
مستخلص نبات القسط المائي	0±90	2.3±33.6 (62.64)	0.87±28.8 (68.00)	2.31±24.4 (72.88)	1.24±23.2 (74.22)	1.94±15.6 (82.81)	72.09 B
المضاد الحيوي KCZ	0±90	1.52±33.6 (62.64)	4.23±30.7 (65.85)	0.88±24.9 (72.25)	1.65±16.4 (81.77)	0.66±0.66 (99.25)	69.06 C
متوسط تأثير التراكيز	90 (0.0) a	30.63 (65.94) b	27.45 (71.55) c	22.85 (72.99) d	17.56 (80.00) e	8.20 (90.88) f	للمعاملات = 1.85
L.S.D 0.05	للتراكيز = 2.61						
	للتداخل = 4.53						

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للتثبيط على معدل أقطار مستعمرات الفطر القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية (بين متوسط تأثير التراكيز) في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية (بين المعاملات)
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات والتراكيز تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD .

التركيز	مستخلص نبات القسط الكحولي	مستخلص نبات القسط المائي	المضاد الحيوي KCZ
0 (ملغم/مل)			
5 (ملغم/مل)			
10 (ملغم/مل)			
25 (ملغم/مل)			
50 (ملغم/مل)			
75 (ملغم/مل)			

الشكل (4-8) : تأثير المستخلصات الكحولية والمائية للنبات المختبر في النمو الشعاعي للفطر *A.terreus*

2.3.4. تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في الوزن الجاف للفطريات المختبرة .

تبين نتائج دراسة تأثير مستخلص نبات الاختبار الكحولي والمائي والمضاد الفطري KCZ في الوزن الجاف للفطريات الاختبارية كفاءة تثبيطية عالية في نمو الفطريات , وتؤكد هذه النتائج نتائج اختبار تأثير هذه المستخلصات في النمو الشعاعي للفطريات , حيث أعطت جميع المستخلصات تثبيطاً متمثلة بانخفاض معدلات الوزن الجاف للفطريات *A. niger* , *A. fumigatus* , *A. flavus* , *A. terreus* بصورة معنوية ($P<0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة , إذ تراوحت معدلات الوزن الجاف لجميع الفطريات المختبرة للمعاملات المستخلص الكحولي ما بين (0.40 ±0.02 - 0.01 ±0.003 غم) , أما بالنسبة للمستخلص المائي فقد تراوحت فيها معدلات الوزن الجاف للفطريات المختبرة ما بين (0.42±0.03 - 0.08±0.01 غم) وبالمقارنة بمعاملة المضاد KCZ حيث تراوحت معدلات الوزن الجاف لهذه الفطريات ما بين (0.34±0.01 - 0.01±0.004 غم) , بالقياس مع معاملات المقارنة لهذه الفطريات التي أعطت معدلات أوزان جافة عالية تراوحت ما بين (0.85±0.02 - 0.90±0.02 غم) .

وتبين من نتائج التحليل الإحصائي لتأثير المستخلص الكحولي والمائي لنبات المختبر في الوزن الجاف للفطريات المنتخبة أن جميع التراكيز المستعملة لمستخلصات النبات قد أثرت بصورة عالية المعنوية ($P<0.05$) في خفض معدلات الوزن الجاف لجميع الفطريات المنتخبة وأعطت نتائج متفاوتة معنوياً لنتائج تأثير المضاد الفطري KCZ , إذ بلغ متوسط التأثير التثبيطي للوزن الجاف للفطر *A. niger* (0.21 غم) لمعاملات المختلفة من المستخلص الكحولي و (0.26 غم) لمعاملات المختلفة من المستخلص المائي في حين كان معاملة المضاد الاكفأ تأثيراً في تثبيط الوزن الجاف بمتوسط تأثير بلغ (0.15 غم) وبشكل متفاوت معنوياً حسب التركيز كما مبين في الجدول (4 - 8).

أما بالنسبة للفطر *A. fumigatus* فقد بلغ متوسط التأثير التثبيطي للوزن الجاف (0.21 غم) لمعاملات المستخلص الكحولي , أما المستخلص المائي فبلغ متوسط تأثيره (0.23 غم) بالتراكيز المستعملة كافة , في حين تفوقت معنوياً ($P<0.05$) معاملات المضاد KCZ عند التراكيز جميعها في تثبيط النمو بمتوسط تأثير بلغ (0.14 غم) بالقياس مع معاملات المقارنة لهذه الفطر التي أعطت معدل وزن جافة بلغ (0.86 غم) كما مبين في الجدول (4 - 9).

وقد بلغ متوسط التأثير التثبيطي للوزن الجاف للفطر*A. flavus* (0.14 غم) لمعاملات المستخلص الكحولي والتي تفوقت معنوياً على معاملات المضاد KCZ الذي بلغ متوسط تأثيره (0.15 غم) وكانت ذروة التأثير عند التراكيز (5 , 10 , 25 ملغم/مل) في حين كان المضاد KCZ متفوقاً على المستخلص الكحولي عند التركيز (50 , 75 ملغم/مل), أما بالنسبة لمعاملات المستخلص المائي فبلغ متوسط تأثيرها (0.17 غم) , وكان المضاد KCZ متفوقاً عند التراكيز (50 , 75 ملغم/مل) على معاملة المستخلص المائي بفروق معنوية ($P<0.05$) , في حين كان التفوق المعنوي عند التركيزين (5 , 10 ملغم/مل) للمستخلص المائي , كما مبين في الجدول (4 - 10) .

أما بخصوص الفطر *A. terreus* فقد أظهرت المعاملات جميعها دوراً فعالاً في تثبيط الوزن الجاف للفطر بالقياس مع معاملة المقارنة , إذ بلغ متوسط تأثير التثبيط (0.18 غم) لمعاملات المستخلص الكحولي وبفروقات معنوية ($p<0.05$) لتأثير معاملة المضاد KCZ الذي بلغ متوسط تأثيره (0.14 غم) في حين جاء المستخلص المائي بالمرتبة الأخيرة في تأثيره على الوزن الجاف لعزلات الفطر بمتوسط تأثير (0.21 غم) وتعد هذه الفروق متفاوتة المعنوية بحسب تركيز المعاملة وذلك للتراكيز المستعملة بالدراسة جميعها كما هو موضح في الجدول (4 - 11) .

جدول (4-8) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر*Aspergillus niger*.

نوع المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	**0.02±0.4** (54.02)	**0.01±0.27** (68.19)	**0.02±0.21** (75.80)	**0.01±0.12** (86.20)	**0.002±0.06** (93.10)	**0.21** (75.24)**C**
مستخلص نبات القسط المائي	**0.03±0.42** (51.70)	**0.01±0.33** (62.06)	**0.01±0.28** (67.81)	**0.02±0.17** (80.07)	**0.01±0.12** (86.20)	**0.26** (68.38) **B**
المضاد الحيوي KCZ	**0.003±0.3** (64.70)	**0.008±0.21** (75.40)	**0.01±0.16** (81.21)	**0.04±0.06** (93.10)	**0.001±0.04** (95.40)	**0.15** (81.80)**D**
السيطرة	**0.008±0.87** (0.0)	**0.008±0.87** (0.0)	**0.008±0.87** (0.0)	**0.008±0.87** (0.0)	**0.008±0.87** (0.0)	**0.87** (0.0)**A**
متوسط تأثير التركيز	**0.49** (56.80)**a**	**0.42** (67.91)**b**	**0.38** (73.80)**c**	**0.30** (86.45)**d**	**0.27** (91.30)**e**	**للمعاملات = 0.0240**
L.S.D 0.05	**للتركيز= 0.0339**					
	للتداخل=0.0588					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للوزن على معدل وزن المستعمرات القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4-9) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus fumigatus*.

نوع المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	**0.01±0.38** (55.5)	**0.02±0.27** (68.19)	**0.01±0.24** (62.00)	**0.02±0.12** (85.44)	**0.02±0.06** (93.10)	**0.21** (74.92)**C**
مستخلص نبات القسط المائي	**0.02±0.41** (52.80)	**0.006±0.3** (65.50)	**0.01±0.25** (70.40)	**0.01±0.13** (84.88)	**0.01±0.09** (89.53)	**0.23** (72.70)**B**
المضاد الحيوي KCZ	**0.01±0.34** (60.90)	**0.01±0.25** (70.80)	**0.02±0.12** (85.80)	**0.08±0.01** (98.40)	**0.04±0.01** (98.80)	**0.14** (82.94)**D**
السيطرة	**0.03±0.86** (0.0)	**0.03±0.86** (0.0)	**0.03±0.86** (0.0)	**0.03±0.86** (0.0)	**0.03±0.86** (0.0)	**0.86** (0.0)**A**
متوسط تأثير التركيز	**0.49** (56.4)**a**	**0.42** (68.16)**b**	**0.36** (76.2)**c**	**0.28** (89.28)**d**	**0.25** (94.23)**e**	**للمعاملات = 0.0231**
L.S.D 0.05	**للتركيز= 0.0327**					
	للتداخل= 0.0567					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للوزن على معدل وزن المستعمرات القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4-10) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus flavus*

نوع المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	**0.02±0.24** (73.03)	**0.02±0.19** (78.3)	**0.01±0.13** (85.05)	**0.01±0.10** (88.12)	**0.02±0.05** (93.70)	**0.14** (83.64)**D**
مستخلص نبات القسط المائي	**0.01±0.27** (70.00)	**0.02±0.23** (75.50)	**0.01±0.17** (81.11)	**0.01±0.12** (86.66)	**0.01±0.09** (90.00)	**0.17** (80.02)**B**
المضاد الحيوي KCZ	**0.01±0.31** (65.55)	**0.01±0.26** (71.11)	**0.005±0.16** (82.22)	**0.02±0.02** (97.03)	**0.01±0.02** (97.03)	**0.15** (81.69)**C**
السيطرة	**0.02±0.90** (0.0)	**0.02±0.90** (0.0)	**0.02±0.90** (0.0)	**0.02±0.90** (0.0)	**0.02±0.90** (0.0)	**0.90** (0.0)**A**
متوسط تأثير التركيز	**0.43** (68.91)**a**	**0.39** (74.97)**b**	**0.34** (82.8)**c**	**0.28** (89.07)**d**	**0.26** (93.17)**e**	للمعاملات = **0.022**
L.S.D 0.05	**للتركيز= 0.0323**					
	للتداخل= 0.0559					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للوزن على معدل وزن المستعمرات القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) حسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4-11) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في الوزن الجاف للفطر *Aspergillus terreus*

نوع المعاملة	معدل الوزن الجاف للغزل الفطري (غم) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	**0.02±0.37** (56.4)	**0.02±0.24** (71.76)	**0.02±0.17** (79.6)	**0.01±0.11** (87.05)	**0.003±0.01** (98.85)	**0.18** (78.21)**C**
مستخلص نبات القسط المائي	**0.01±0.39** (54.1)	**0.01±0.29** (65.8)	**0.02±0.20** (76.4)	**0.02±0.11** (87.05)	**0.01±0.08** (90.6)	**0.21** (74.67)**B**
المضاد الحيوي KCZ	**0.02±0.30** (64.7)	**0.03±0.20** (76.7)	**0.02±0.16** (80.3)	**0.02±0.06** (92.9)	**0.008±0.02** (97.67)	**0.14** (82.37)**D**
السيطرة	**0.02±0.85** (0.0)	**0.02±0.85** (0.0)	**0.02±0.85** (0.0)	**0.02±0.85** (0.0)	**0.02±0.85** (0.0)	**0.85** (0.0)**A**
معدل تأثير التركيز	**0.47** (58.4)**a**	**0.39** (71.42)**b**	**0.34** (78.76)**c**	**0.28** (88.74)**d**	**0.24** (94.96)**e**	للمعاملات = **0.0266**
L.S.D 0.05	**للتركيز= 0.0377**					
	للتداخل= 0.0653					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- الرقم بين القوسين يمثل النسبة المئوية للوزن على معدل وزن المستعمرات القياسية .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

3.3.4. تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في إنبات ابواغ الفطريات .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي واختبار أقل فرق معنوي تأثير المستخلص الكحولي والمائي للنبات المدروس في إنبات أبواغ الفطريات , حيث خفضت المستخلصات من نسبة انبات الابواغ بصورة عالية المعنوية بالقياس مع معاملات المقارنة . إذ تراوح متوسط نسبة إنبات الأبواغ ما بين (20.4– 26.48 %) لمعاملات المختلفة من المستخلص الكحولي لجميع الفطريات الاختبارية , أما بالنسبة لمعاملات المستخلص المائي المختلفة فقد تراوح فيها متوسط نسبة أنبات أبواغ الفطريات ما بين (24.11 - 31.34%) بالقياس لمعاملات المقارنة لهذه الفطريات التي أعطت نسبة أنبات عالية تراوحت ما بين (80.57 - 83.75%) .

كما وجد أن التراكيز المستعملة للمستخلص الكحولي جميعها قد أعطت نتائج مقاربة لنتائج تأثير معاملة المضاد KCZ بشكل متفاوت معنوياً حسب نوع الفطر والتركيز, وأن أعلى نسبة تثبيط لإنبات أبواغ الفطر *A. niger* عند التركيزين (50 , 75 ملغم /مل) (12.77 % , 10.8 %) للمستخلص الكحولي , وبفارق غير معنوي ($p>0.05$) مقارنة لتأثير معاملة المضاد KCZ عند نفس التركيزين المذكورين بنسبة إنبات بلغت (12.77 % , 11.29 %) , في حين تفوقت المعاملات المختلفة للمستخلص الكحولي والمضاد الفطري معنوياً على معاملات المستخلص المائي كما موضح بالجدول (4 - 12) . أما الفطر *A. fumigatus* فقد أظهرت جميع المعاملات كفاءة تثبيطيه عالية المعنوية ($p<0.05$) لإنبات أبواغ الفطر بلغت ذروتها عند التراكيز العالية , إذ بلغ متوسط نسبة إنبات الأبواغ لمعاملات المستخلص الكحولي (26.48 %) متفوق معنوياً على معاملات المستخلص المائي والبالغ متوسط تأثيرها (31.34 %) وبلغ التفوق ذروته عند التراكيز(5 , 10 , 25 ملغم/مل) في حين لم تكن الفروق معنوية ($p>0.05$) عند التركيزين (50 , 75 ملغم /مل), بالمقارنة مع تأثير المضاد KCZ الذي كان أكفأ من المعاملتين بمتوسط تأثير (19.55 %) بالتراكيز جميعها كما موضح في الجدول (4 - 13) .

أما بالنسبة للفطر *A. flavus* فقد أثرت المعاملات جميعها في إنبات أبواغ الفطر قياساً في معاملة المقارنة , كما وجدت إحصائياً فروقات معنوية بين المعاملات متفاوتة حسب التركيز , إذ بلغ متوسط نسبة إنبات الأبواغ (20.4%) لمعاملات المستخلص الكحولي ومقارنة بتأثر معاملات المضاد KCZ المختلفة لم تكن الفروق معنوية ($P>0.05$) إذ بلغ متوسط نسبة إنبات الأبواغ لمعاملة المضاد KCZ (21.08 %) , وجاءت معاملة المستخلص المائي بالمرتبة الأخيرة من حيث تأثيرها في إنبات أبواغ الفطر إذ بلغ متوسط تأثيرها (24.11 %) كما مبين في الجدول (4 - ١٤).

أما الفطر *A. terreus* فقد بلغ متوسط إنبات ابواغه (22.74 %) لمعاملات المستخلص الكحولي و(25.38%) لمعاملات المستخلص المائي وبفروق غير معنوية ($P>0.05$) عند التراكيز (5 , 10 , 25 ملغم/مل) في حين تفوقت معنوياً جميع معاملات المضاد KCZ الذي بلغ متوسط التأثير على انبات الأبواغ (17.8%) كما مبين في الجدول (4 - 15).

جدول (4 - 12) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ الفطر *Aspergillus niger* في الزجاج .

نوع المعاملة	نسبة أنبات الابواغ (%) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	2.18±32.99	2.78±29.05	2.06±21.08	1.4±12.77	1.53±10.8	21.33 C
مستخلص نبات القسط المائي	2.01±40.82	2.06±36.13	1.82±26.73	1.03±21.21	0.72±15.09	27.99 B
المضاد الحيوي KCZ	3.27±34.06	0.94±24.31	2.23±14.43	0.98±12.77	1.02±11.29	19.37 C
السيطرة	1.45±82.3	1.45±82.3	1.45±82.3	1.45±82.3	1.45±82.3	82.3 A
معدل تأثير التركيز	47.54a	42.94b	36.13c	32.26d	29.87e	للمعاملات 2.13 =
L.S.D 0.05	للتركيز= 3.02					
	للتداخل= 5.23					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 13) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ الفطر *Aspergillus fumigatus* في الزجاج .

نوع المعاملة	نسبة أنبات الابواغ (%) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	2.56±37.21	0.89±31.55	2.42±25.46	2.24±23.29	0.9±14.9	26.48 C
مستخلص نبات القسط المائي	2.00±44.29	2.59±40.70	1.34±33.54	2.46±23.27	1.69±14.9	31.34 B
المضاد الحيوي KCZ	2.04±32.34	1.5±23.43	2.8±16.84	2.56±11.92	1.52±11.58	19.55 D
السيطرة	1.24±80.57	1.24±80.57	1.24±80.57	1.24±80.57	1.24±80.57	80.57 A
معدل تأثير التركيز	48.60a	44.06b	39.10c	33.60d	30.48d	للمعاملات 2.99 =
L.S.D 0.05	للتركيز= 4.24					
	للتداخل= 7.34					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 14) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ الفطر *Aspergillus flavus* في الزجاج .

نوع المعاملة	نسبة أنبات الابواغ (%) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	3.78±28.19	2.24±23.29	2.25±19.04	1.9±17.65	2.53±13.87	20.4 C
مستخلص نبات القسط المائي	1.07±33.98	1.58±27.63	1.63±23.15	1.93±18.23	2.68±17.58	24.11 B
المضاد الحيوي KCZ	2.78±31.43	1.38±26.64	1.16±22.84	3.58±13.92	0.79±10.58	21.08 C
السيطرة	0.62±82.37	0.62±82.37	0.62±82.37	0.62±82.37	0.62±82.37	82.37 A
معدل تأثير التركيز	43.99a	39.98b	36.85b	33.04c	31.1c	للمعاملات 2.44 =
L.S.D 0.05	للتركيز= 3.45					
	للتداخل= 5.98					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبير الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 15) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في نسب إنبات أبواغ الفطر *Aspergillus terreus*

نوع المعاملة	نسبة أنبات الابواغ (%) ± الخطأ القياسي					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	3.55±34.99	2.81±29.25	2.07±22.96	2.00±13.66	1.12±12.86	22.74 B
مستخلص نبات القسط المائي	3.61±35.25	1.74±29.25	2.47±24.90	2.15±20.56	1.82±16.94	25.38 B
المضاد الحيوي KCZ	3.77±27.48	1.82±23.15	0.9±14.9	1.93±13.92	1.27±9.58	17.8 C
السيطرة	3.29±83.75	3.29±83.75	3.29±83.75	3.29±83.75	3.29±83.75	83.75 A
معدل تأثير التركيز	45.36a	41.35b	36.62c	32.97d	30.78d	للمعاملات 2.90 =
L.S.D 0.05	للتركيز= 2.58					
	للتداخل= 3.80					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرالى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات أو التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

4.3.4. تأثير مستخلصات نبات القسط *C. speciosus* الكحولية والمائية والمضاد الفطري القياسي KCZ في طول الأنبوب الجرثومي للفطريات .

أظهرت نتائج تأثير المستخلص الكحولي والمائي للنبات المدروس والمضاد الفطري KCZ في أطوال الأنابيب الجرثومية للفطريات انخفاضاً عال المعنوية ($P<0.05$) قياساً مع معاملات المقارنة . إذ تراوحت متوسطات أطوال الأنابيب الجرثومية لجميع الفطريات المنتخبة في التراكيز المختلفة لمعاملات المستخلص الكحولي ما بين (11.71– 13.65) ما يكرون , في حين تراوحت متوسطات أطوال الأنابيب الجرثومية لمعاملات المستخلص المائي (15.88 - 18.54) ما يكرون بالقياس مع معاملات المقارنة لهذه الفطريات التي أعطت أطوال عالية تراوحت متوسطاتها ما بين (40.26 - 42.08) ما يكرون . في حين تراوحت متوسطات أطوال الأنابيب الجرثومية بالنسبة لمعاملات المضاد KCZ ما بين (10.3- 11.7) ما يكرون .

ووجد أن تأثير المستخلصات الكحولية والمائية أزداد بزيادة التراكيز محققاً ذروة التثبيط عند أعلى التراكيز المستخدمة معطيه بذلك نتائج مقاربة معنوياً لنتائج تأثير المضاد KCZ وبشكل متفاوتة حسب نوع الفطر والتركيز, فقد بينت النتائج الموضحة في الجدول (4 - 16) تفوق المستخلص الكحولي في انخفاض اطوال الانابيب الجرثومية للفطر *A. niger* بمتوسط طول بلغ (12.84) ما يكرون على معاملة المستخلص المائي الذي بلغ متوسط طول الأنابيب الجرثومية فيه (18.54) ما يكرون , ولم تختلف معاملات المستخلص الكحولي معنوياَ ($P>0.05$) عن معاملات المضاد KCZ الذي بلغ متوسط طول الأنابيب (11.24) ما يكرون , وتمكن المستخلص الكحولي عند التركيزين (50 , 75 ملغم/مل) من تسجيل أعلى تثبيط بلغت معدل الطول عندها (9.39 , 4.27) ما يكرون على التوالي , متفوقاً بصورة غير معنوية ($P>0.05$) على معاملات المضاد KCZ عند نفس التركيزين بمعدل (9.44 , 6.95) ما يكرون على التوالي . أما الفطر *A. fumigatus* فقد بلغت متوسط أطوال الأنابيب الجرثومية في معاملات المستخلص الكحولي (11.71) ما يكرون متفقة معنوياً مع تأثير المضاد KCZ الذي بلغ متوسط أطوال الأنابيب (11.2) ما يكرون . وبذلك تفوقت كلا المعاملتين على المستخلص المائي الذي بلغ متوسط الطول فيه (17.44) ما يكرون , كما وجدت إحصائياً فروقات معنوية بين التراكيز المستعملة إذ كان معدل طول الأنابيب الجرثومية عند التركيزين (50 , 75 ملغم/مل) الأعلى تثبيطاً قياساً ببقية التراكيز .كما مبين في الجدول (4 - ١٧) . كما وجدت أطوال الأنابيب الجرثومية للفطر *A. flavus* قد بلغ متوسطها (13.65) ما يكرون لمعاملات المستخلص الكحولي وبالقياس مع معاملة المضاد KCZ كانت أقل تثبيطاً بمتوسط طول بلغ (10.3) ما يكرون , وإحصائياً سجلت الفروقات عند جميع التراكيز تفوق معنوياً لمعاملة المضاد KCZ , كما مبين في الجدول (4 - 18). أما بالنسبة للفطر *A. terreus* فقد بلغ

متوسط أطوال الأنابيب الجرثومية لمعاملات المستخلص الكحولي (13.63) ما يكرون في حين بلغ متوسط تأثير معاملة المضاد KCZ (11.7) ما يكرون وجاءت معاملات المستخلص المائي بالمرتبة الأخيرة من حيث التأثير في طول الأنابيب الجرثومية بمتوسط طول (15.88) ما يكرون , كما وجدت إحصائياً فروقات متفاوتة معنوياً لتأثير التراكيز المختلفة بحسب نوع المعاملة كما مبين في الجدول (4 - 19) .

جدول (4 - 16) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus niger* .

نوع المعاملة	طول الأنبوب الجرثومي (ما يكرون) التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					متوسط تأثير المعاملة
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	1.3±20.58	1±18.19	1.04±11.79	1.08±9.39	0.57±4.27	12.84 C
مستخلص نبات القسط المائي	1.86±23.97	1.09±21.3	0.66±19.78	1.1±15.39	0.23±12.18	18.54 B
المضاد الحيوي KCZ	0.72±16.41	0.54±12.63	1.51±10.8	1.3±9.44	1.99±6.95	11.24 C
السيطرة	1.37±42.08	1.37±42.8	1.37±42.8	1.37±42.8	1.37±42.8	42.08 A
معدل تأثير التركيز	25.76 a	23.81 a	21.29 b	19.25 b	16.55 c	
L.S.D 0.05	للتركيز= 2.00					للمعاملات = 1.41
	للتداخل= 3.47					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية

- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات أو التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب اختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 17) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus fumigatus*

نوع المعاملة	طول الأنبوب الجرثومي (ما يكرون)					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0.88±21.5	0.46±15.76	1.06±11.4	0.77±6.41	0.71±3.48	11.71 C
مستخلص نبات القسط المائي	5.53±25.25	2.21±21.39	1.89±17.35	1.12±12.2	0.33±11.01	17.44 B
المضاد الحيوي KCZ	0.87±17.99	1.31±14.40	1.09±9.06	0.55±8.12	0.81±6.44	11.20 C
السيطرة	0.74±40.9	0.74±40.9	0.74±40.9	0.74±40.9	0.74±40.9	40.9 A
معدل تأثير التركيز	26.41 a	23.11 b	19.67 c	16.9 dc	15.45 d	للمعاملات 1.96 =
L.S.D 0.05	للتركيز= 2.77					
	للتداخل= 4.81					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .
- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية

- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات أو التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 18) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر *Aspergillus flavus* .

نوع المعاملة	طول الأنبوب الجرثومي (ما يكرون)					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	1.47±19.16	1.36±16.73	0.96±11.9	1.47±10.38	0.93±10.12	13.65 C
مستخلص نبات القسط المائي	1.22±22.33	0.61±20.89	0.21±16.67	0.25±11.75	0.14±10.81	16.49 B
المضاد الحيوي KCZ	0.35±16.53	1.64±14.42	1.38±11.48	0.9±5.74	0.78±3.33	10.3 D
السيطرة	1.02±40.26	1.02±40.26	1.02±40.26	1.02±40.26	1.02±40.26	40.26 A
معدل تأثير التركيز	24.57 a	23.07 a	20.07 b	17.03 c	16.13 c	للمعاملات = 1.22
L.S.D 0.05	للتركيز= 1.72					
	للتداخل= 2.99					

- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .

- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبير الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات أو التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات معنوية احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

جدول (4 - 19) تأثير مستخلصات نبات القسط والمضاد الفطري Ketoconazole في طول الأنبوب الجرثومي للفطر*Aspergillus terreus* .

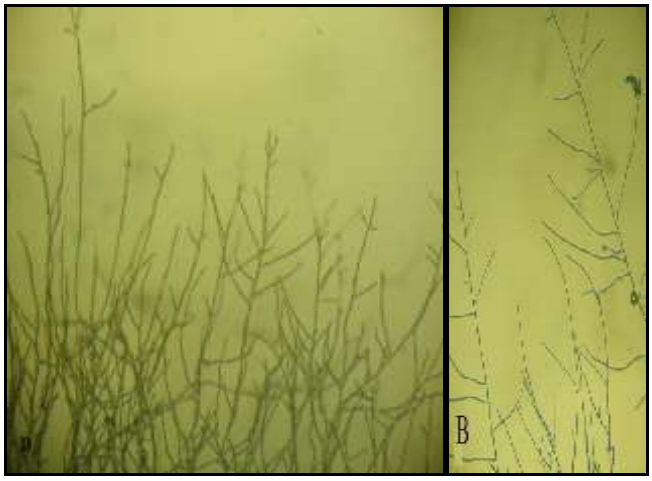
نوع المعاملة	طول الأنبوب الجرثومي (ما يكرون)					متوسط تأثير المعاملة
	التركيز (ملغم/مل) للمستخلصات والمضاد الفطري					
	5	10	25	50	75	
مستخلص نبات القسط الكحولي	0.62±18.97	0.14±16.99	1.23±13.36	0.42±11.33	0.97±7.50	13.63 C
مستخلص نبات القسط المائي	1.25±21.65	0.31±20.71	0.91±15.25	0.67±12.54	1.19±9.26	15.88 B
المضاد الحيوي KCZ	0.36±16.30	1.59±14.84	0.84±12.77	0.23±9.65	0.54±4.96	11.7 D
السيطرة	1.66±41.73	1.66±41.73	1.66±41.73	1.66±41.73	1.66±41.73	41.73 A
معدل تأثير التركيز	24.66 a	23.56 a	20.77 b	18.81 c	15.86 d	للمعاملات = 1.22
L.S.D 0.05		للتركيز= 1.73				
		للتداخل= 3.00				

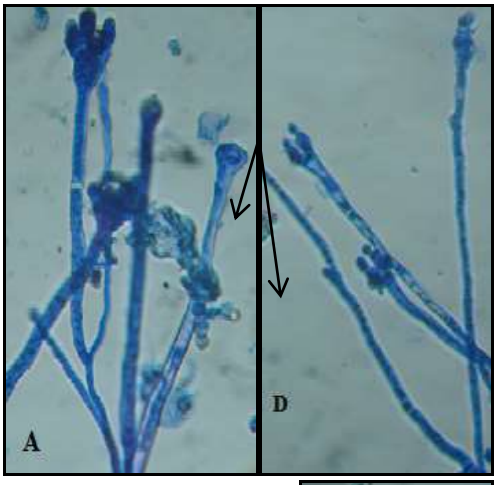
- تمثل النتائج الموضحة بالجدول معدل ثلاثة مكررات ± الخطأ القياسي .

- تدل الحروف الصغيرة الى القراءة الاحصائية الافقية في حين تشير الحروف الكبيرة الى القراءة الاحصائية العمودية
- تشير الحروف المتشابهة الى عدم وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات أو التراكيز في حين تشير الحروف المختلفة الى وجود فروقات مهمة احصائيا بين المعاملات تحت مستوى احتمالية($p\leq 0.05$) بحسب أختبار أقل فرق معنوي LSD.

5.3.4. تأثير مستخلص النبات الكحولي على مورفولوجيا الميسليوم الفطري .

إنّ انخفاض معدل نمو فطريات الاختبار الناتج عن تأثير معاملات مستخلص نبات الاختبار عادة ما يكون مرفقا بتغيرات مورفولوجية للميسليوم النامي . يبدو ذلك جلياً من خلال نتائج الدراسة الحالية متمثلة في نقص بتكوين الهايفات الهوائية وتغيرات مورفولوجية شاذة في بعض قطعها النامية إذ تظهر أخف أو أنحف وعارية واقل اندفاعاً نحو جبهة النمو ويصاحب هذا عطب وكسور على امتدادها في مستويات مختلفة , ويتكون القليل من الخيوط الفطرية الهوائية فضلاً عن زيادة عدد نقط التفرعات الجانبية وانخفاض المسافات بين نقط التفرعية . بالإضافة إلى تحلل الهايفات الفطرية وتكثف للمادة السايتوبلازمية وانتفاخ أطراف الهايفات بالإضافة إلى الشكل غير المنتظم للحوصلة ونقص عدد الفياليدات وانتفاخ في المتكون منها وإن هذه التغيرات المورفولوجية الناتجة عن المعاملة بمستخلص نبا ت الاختبار تكون عامة في كل الانواع الفطرية كما موضح في الشكل (4-9) .

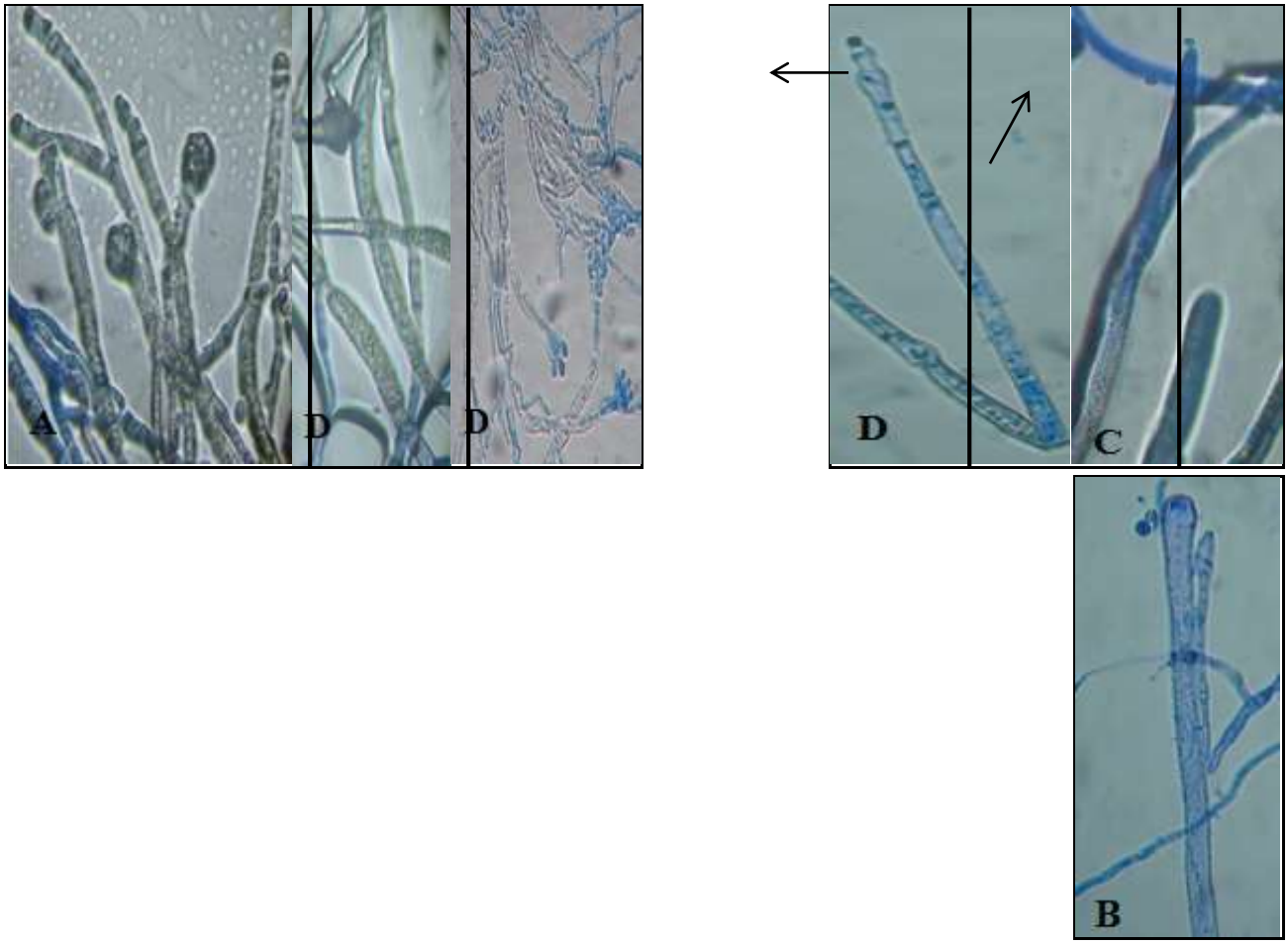




١. تظهر خيوط الفطريات الجانبية وانخفاض المسافة بينها (LCBx100).

٢.نقص عدد الفياليدات وانتفاخ في المتكون منها وزيادة عدد الحواجز septum. (LCBx400) .

ضامرة وعرى وزيادة عدد الفروع



4 .شكل غير منتظم للحوصلة . (LCB x400).

3. تكثف للمادة السايتوبلازمية وانتفاخ في أطراف الهايفات.

الشكل (4-٩) بعض التغيرات المورفولوجية التي تطرأ على مورفولوجيا ميسليوم الفطر *Aspergillus* spp. بعد المعاملة بالمستخلص الكحولي لنبات الاختبار. (A:*A.niger*, B:*A.terreus* , C:*A:flavus* , D:*A.fumigatus*) .

1.4.4. النسب المئوية لمستخلصات نبات *C. speciosus* .

تم الحصول على المستخلص الخام لنبات الاختبار الكحولي والمائي بشكل مادة صمغية لونها بني محمر قاتم وأحمر مسود , رائحته عطرية , شديد اللمعان , بطيء الذوبان بالماء , شديدة المرارة , قارض . تم حفظه في الظلام وعند درجة حرارة (4- مْ) . ويوضح الجدول (4 - 20) أن أقل دالة حامضية سجلت إلى المستخلص الكحولي للنبات إذ بلغت (4.07) , في حين المستخلص المائي سجل (5.29) .

ويلاحظ في الجدول نفسه أن النسبة المئوية للمستخلص الكحولي أعلى من المستخلص المائي لنبات المختبر, إذ كانت النسبة المئوية للمستخلص الكحولي هي (7.4 %) , أما النسبة المئوية للمستخلص المائي فقد كانت (6.76 %) .

جدول (4 -20) : الدالة الحامضية والنسبة المئوية للمستخلصات نبات *Costus speciosus*.

نوع المستخلص	لونه وهو سائل	لونه بعد التجفيف	الاس الهيدروجيني	الوزن الصافي للمستخلص (غم)	النسبة المئوية للمستخلص %
كحولي	بني محمر	بني محمر قاتم	4.07	1.85	% 7.4
مائي	أحمر قاتم	أحمر مسود	5.29	1.69	% 6.76

2.4.4. الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المواد الفعالة طبياً في نبات *C. speciosus* .

أظهرت نتائج التحليل النوعي والكشوفات الكيميائية الاستدلالية للمركبات الفعالة في المستخلصات الخام للنبات المختبر (الميثانولي والمائي) , احتواء كلا المستخلصين على بعض المركبات الفعالة شملت القلويدات Alkaloids و الكلايكوسيدات Glycosides والصابونينات Saponine و الكربوهيدرات من مجموع المواد التي تم الكشف عنها بالإضافة لاحتوائه على الراتنجانات Resines و التانينات Tannins كما هو مبين في الجدول (4 - 21) , وأوضحت النتائج المدروسة في الجدول ذاته إن التربينات Terpenes والفيوكيومارينات Fuocoumarins لم تكن موجودة في المستخلص المائي ولم تحتوي الأخيرة كذلك على الكومارينات Coumarine أيضاً , في حين أحتوى المستخلص الكحولي على المواد الفعالة جميعها التي تم الكشف عنها عدا التربينات لم تكن نتائج الكواشف الظاهرة واضحة لدرجة الجزم باحتواء المستخلص الكحولي لها .

جدول (4-21) يوضح نتائج الكشف الكيميائي *عن المركبات الفعالة في مستخلصات نبات *Costus speciosus* مع بعض صفاتها الكيميائية .

مجاميع المركبات الفعالة	طرق الكشف	دليل الكشف	النتيجة	
	الكواشف المستخدمة		المستخلص الكحولي	المستخلص المائي
القلويدات Alkaloids	كاشف ما ير	راسب بني	++	++

الفلافونات Flavonides	كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 10%	راسب أصفر	+	+
الكلايكوسيدات Glycosides	١.كاشف بندكت ٢.كاشف فهلنك	راسب أحمر لون أحمر	++	++
الصابونيات Saponine	١.كشف كلوريد الزئبقيك 1% ٢.رغوة المحلول المائي	راسب أبيض رغوة كثيفة لفترة طويلة	+++	+++
الراتنجانات Resine	كشف حامض HCl 4%	عكارة Turbidity	++	+
التانينات Tannins	كشف خلات الرصاص 1%	راسب ابيض هلامي	+	+
الكومارينات Coumarine	تعريض المستخلص الكحولي لاشعة U.V	لون اصفر - مخضر	+	–
الفيوكيومارينات Fuocoumarins	كشف هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي 10%	راسب أصفر	+	–
الفينوليه Phenolies	كشف كلوريد الحديديك 1%	راسب أزرق مخضر	+	+
التربينات Terpenes	كشف حامض الكبريتيك المركز مع الكلورفورم	راسب بني	±	–
الكاربوهيدرات	كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز	راسب احمر مائل إلى البني	++	++

(*) تمثل النتائج معدلاً لمكررين . حيث تشير العلامة (+) الى إيجابية الكشف بنسبة 0.1 % من وزن النموذج المأخوذ للتحليل بينما (++) بنسبة 0.2 % من وزن النموذج المأخوذ للتحليل ..... وهكذا . وبحسب التدرج اللوني في النموذج الواحد. تشير العلامة (-) الى سالبيه الكشف بينما تشير العلامة (±) الى عدم ظهور النتيجة الموجبة بوضوح .

3.4.4. الفحوصات النهائية للكشف عن المواد الفعالة كيميائياً في مستخلصات نبات *C. speciosus*

أوضحت نتائج الكشف عن المجاميع الفعالة احتواء نبات *C. speciosus* على عدد من المجاميع الفعالة التي تمثل هيكل المركبات الفعالة في النبات المختبر ويتبين من النتائج في الجدول (4 - 22) احتواء

مستخلصات النبات المختبر على مجموعة الأمين (NH) ومجموعة الهايدروكسيل (OH) والأصرة المزدوجة وبعض المجاميع الهيدروكربونية (الحلقة الأورماتية) ومجموعة الكاربونيل (C=O) .

جدول (4 - ٢٢) الفحوصات النهائية للكشف عن المواد الفعالة في المستخلصات نبات *Costus speciosus* .

المجاميع الفعالة	نوع المستخلص	
	الكحولي	المائي
مجموعة الأمين (NH_2)	+	+
مجموعة الهيدروكسيل (OH)	+	+
الاصرة المزدوجة =	+	+
مجموعة C-N	--	--
مجمووعة الكاربونيل (C=O)	+	+
المركبات الهيدروكاربونية	+	+

(+) إيجابية الفحص . (–) سالبيه الفحص .

5.4. السمية الخلوية

أظهرت النتائج خلو المستخلصات النباتية من أي سمية خلوية على كريات الدم الحمراء للأنسان , ويستدل من ذلك على عدم حصول أي تحلل دموي لسلسلة التراكيز المحضرة للمستخلصات النباتية قيد الدراسة كما موضح في الجدول (4 - 23).

جدول (4 - 23) نتائج حساب السمية الخلوية

التحلل الدموي			
المستخلص الكحولي	المستخلص المائي الحار	ماء الحنفية	محلول الملح الفسيولوجي
–	–	+	–

(+) بوجد تحلل دموي (–) لا يوجد تحلل

6.4. نتائج الامراضية :

١.1.6.4. العلامات السريرية Clinical signs

أخضعت جميع حيوانات التجربة إلى المراقبة المستمرة طيلة مدة التجربة , إذ أظهرت مجموعة السيطرة (C) سلوكاً طبيعيا من حيث درجة النشاط والفعالية واستهلاك الماء والغذاء إضافة إلى أنها كانت صعبة المسك , في حين أدت مجموعة الجرذان المعاملة تغيرات مظهرية وسلوكية بعد (4- 5) أيام من أخر جرعة من عقار الهايدروكورتيزون حيث لوحظ ظهور أعراض في المجموعة الأولى (T_1 : المتمثلة بمجموعة الجرذان التي حقنت بالعالق الجرثومي للفطر *A. fumigatus* عن طريق التجويف الأنفي (I.N)). تمثلت بظهور الهيجان الشديد (Severe excitation) خلال (5) دقائق الأولى بعد الحقن وبعدها بدأت علامات البلادة والضعف الشديد (Severe weakness) انخفاض النشاط (Hypoactive) وفقدان التوازن (Loss of balance) والفعالية (activity) والترنح (Ataxia) وسرعة التنفس (Tachypnea) مع ضيق النفس ثم تطورت إلى اعراض اكثر شدة تمثلت بصعوبة تامة في التنفس وحدوث تغير الأصوات التنفسية (خفوت , أزيز , خشونة) فضلاً عن الاضطجاع على الجانب (Lateral recumbency) , قلة الشهية (Anorexia) , فقدان أو انخفاض الوزن (Degiacomo), تهيج المجاري التنفسية العليا Upper Respiratory Tract Irritation وأحياناً نزيف بسيط في فتحتي الأنف وتهيج واحتقان العينين الشديد (Severe eye irritiation) .

كذلك تبين ومن خلال المراقبة المستمرة , أن إعطاء محلول مستخلص نبات *C. speciosus* الكحولي بعد استحداث الإصابة , المجموعة الثانية (T_2) قد أسهم في تقليل العلامات السريرية التي تمثلت بالضعف والخمول وسهولة المسك ولكن بأقل شدة من العلامات الظاهرة على مجموعة الجرذان التي حقنت بالعالق الجرثومي لوحده (T_1) , وعلامات شوهدت فقط في المجموعة الثانية (T_2) مثل فقدان الشعر Alopecia فضلاً عن تزايد إقبالها على الغذاء والماء وعدم حصول الاضطجاع على الجانب .

2.1.6.4. تأثير المعلق الجرثومي في وزن الجسم لذكور الجرذان المختبرية

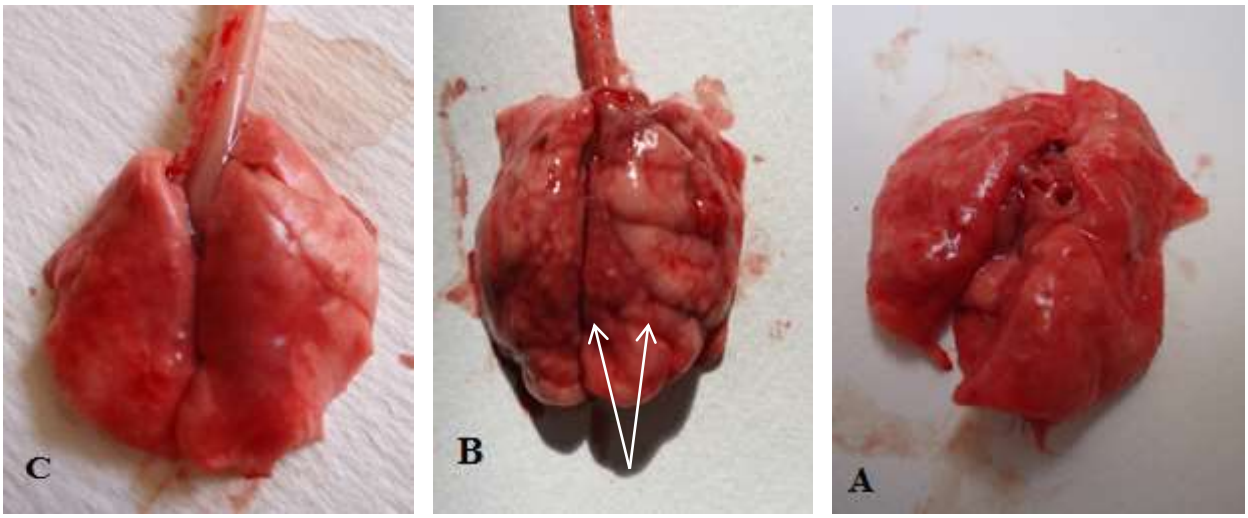
أظهرت نتائج دراسة تأثير عالق الفطر *A. fumigatus* في وزن ذكور الجرذان المختبرية حصول انخفاض دون مستوى المعنوية في معدلات أوزان الجسم . فقد عانت مجموعة المعاملة الأولى (T_1) من هبوط معنوي لوزن الجسم عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة , إذ أن مجموعة السيطرة اكتسبت وزناً إضافيا خلال مدة التجربة , في حين أدى تجريع الحيوانات المجموعة الثانية (T_2) بمحلول المستخلص الكحولي بجرعة (75 ملغم/كغم) عن طريق الشرب بالأنبوبة المعدية عقب الإصابة التجريبية للفطر إلى فقدان حيوانات هذه المجموعة وزناً , وعلى الرغم من أن هذا الفقدان كان أقل معنوياً من معدل السيطرة إلا أنه أعلى معنوياً من معدل حيوانات المجموعة الأولى التي حقنت بالعالق الفطر لوحده (T_1) داخل التجويف الأنفي (I.N) كما مبين في الجدول (4 - 24) .

جدول (4-٢٤) التغير في معدل وزن الجسم (بالغرام) قبل الاصابة وبعد ١٤ و ٢٨ يوماً من الاصابة المستحدثة .

مجاميع المعاملة	معدل وزن الجسم ± الخطأ القياسي		
	قبل الاصابة	بعد 14 يوم من الاصابة	بعد 28 يوم من الاصابة
مجموعة السيطرة (C)	0.243±122.5	0.218±134.3	0.204 ±143.3
المجموعة الأولى (T_1)	0.148±126	0.175± 119.6	—
المجموعة الثانية (T_2)	0.194 ±126.5	0.199 ±121.1	0.229±133.8
$LSD_{0.05}$	بين المجاميع = 4.11		بين المدتين = 3.33
	للتداخل = غير معنوي		

4.6.2.1. التغيرات المرضية العيانية Gross pathological changes

بين الفحص العياني للرئتين لجرذان المجموعة الأولى (T_1) حصول تغيرات واضحة , إذ لوحظ وجود تضخم في الرئتين مقارنة بمجموعة السيطرة الصورة (4 - B 10) , حيث كانت تعاني من وجود مراحل مختلفة من ذات الرئة بدءاً بالاحتقان (Congested) ثم التكبد الأحمر (Red hepatization) مع وجود بقع نزيفيه , بالمقابل لوحظ في المجموعة الثانية (T_2) العلامات نفسها ولكن أقل حدة , إذ كانت أقل احتقاناً وأقل تضخماً وأقل شحوباً (٤ - C10) , في حين لم يلاحظ على مجموعة السيطرة أي علامات أو تغيرات عيانيه وكانت طبيعية كما مبين في الشكل (4 - A10).



الشكل(4-10) : (A) رئة جرذ طبيعي , (B) رئة جرذ مخمج بفطر *A. fumigatus* عن طريق الاستنشاق توضح ذات الرئة متمثلة بالاحتقان والتكبد الاحمر (←) بعد (14) يوم من الحقن , (C) رئة جرذ تم معالجته بمحلول مستخلص نبات *C. speciosus* بعد (21) من المعالجة .

2.2.6.4. التغيرات النسجية ـ المرضية Histopathological changes

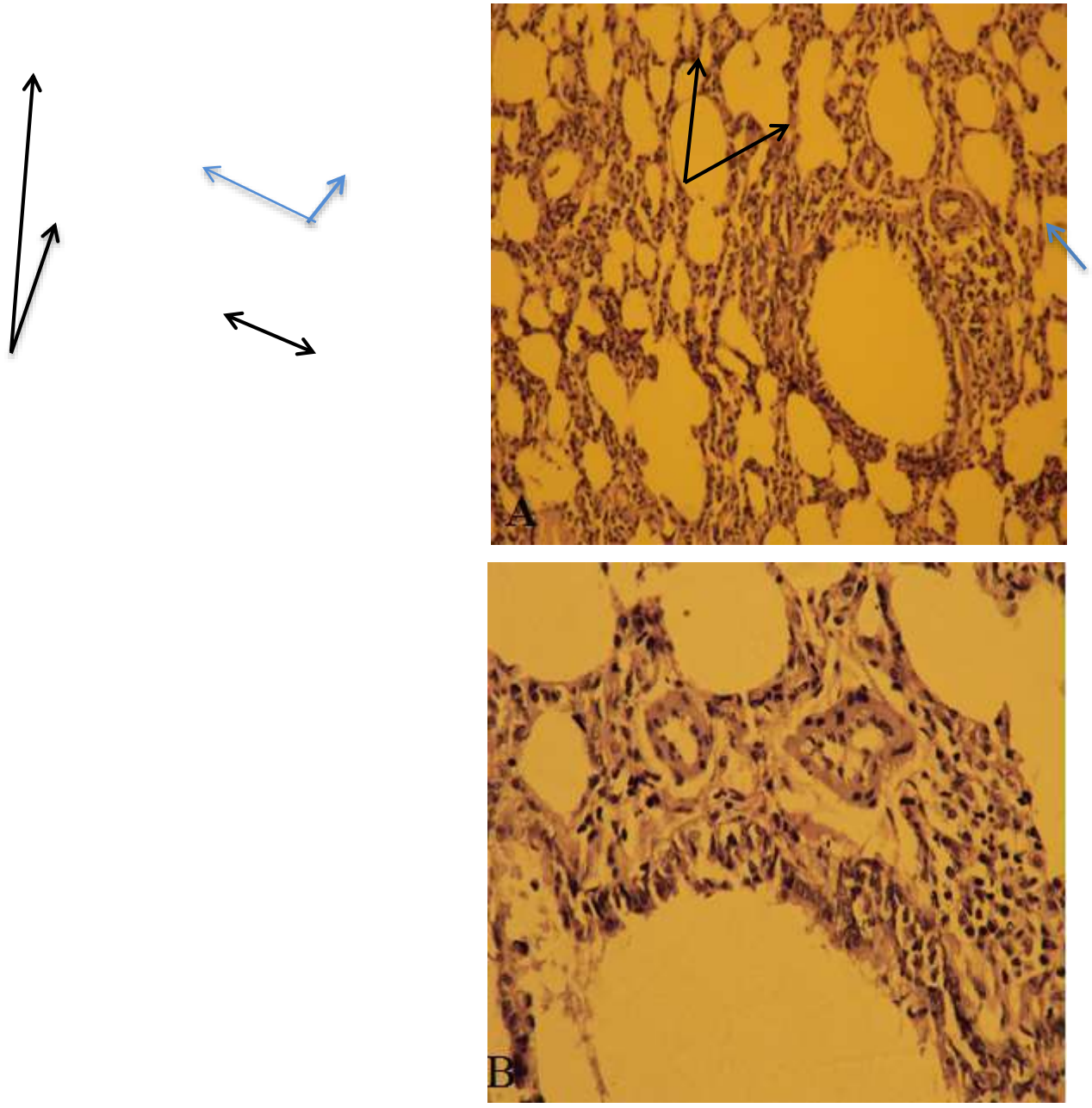
أظهرت نتائج التشخيص المجهري للمقاطع النسجية المأخوذة من رئات جرذان مجموعة السيطرة (C) تركيباً طبيعياً وعدم ظهور أي تغيرات مرضية عليها , إذ لوحظت الأسناخ الرئوية (Alveoli) المفصولة عن بعضها البعض بحواجز بين سنخية (Interalveolar septa) بشكل نموذجي مشكلة معظم نسيج الرئة والأكياس السنخية (Alveolar sacs) التي تمثل مجموعة من الاسناخ الرئوية التي تفتح في قناة سنخيه (Alveolar duct) واحدة ويلاحظ كذلك وجود الاوعية الدموية الرئوية , كما موضح في الشكل (4 -11) .

بينما أظهرت المقاطع المأخوذة من رئات الجرذان المصابة من المجموعة الأولى (T_1) العديد من التغيرات النسيجية ـ المرضية , حيث لوحظ فقدان كبير للتركيب النمطي للرئة بسب التحلل النسيجي أو ظهور فرط تنسج (Hyperplasia) شديد في الطبقة الطلائية المبطنة للقصبات بصورة مشوهة نتيجة الإصابة فضلاً عن ارتشاح خلوي التهابي مع سائل وذمي (Edema) بين الخلايا المكونة للجدار السنخي الرئوي, كما موضح في الشكل (4 - 12), بالإضافة إلى حصول انسلاخ (Sloughing) وتوسّف (Desquamation) في الخلايا الظهارية المبطنة للقصيبات .

كذلك اوضح الفحص المجهري وجود العامل المسبب للإصابة وأتخذ شكله النموذجي الممثل بالحامل الكونيدي (Conidiophores) المنتهي بالرأس الكونيدي (Conidial Head) محاطاً بأرتشاحات من الخلايا الالتهابية المتمثلة بالخلايا اللمفية والبلازمية والبلعمية والعدلات , كما مبين في الشكل (4 -13) .

ونظراً لشدة الإصابة تعرضت رئات الجرذان لتغيرات مرضية تمثلت بوجود انتفاخ رئوي (Emphysema), وارتشاح سائل دموي (بروتين بلازمي Plasma protein) ناتج عن الاحتقان الدموي (Congestion) داخل الأوعية الدموية , فضلاً عن المناطق الكثيرة المغطاة بكميات كبيرة من النزف (4 - 14).

في حين أظهرت المجموعة الثانية (T_2) المتمثلة بالجرذان المصابة بالفطر والمعاملة بمحلول مستخلص نبات *C. speciosus* تغيرات نسيجية ـ مرضية أقل شدة من نظيراتها في المجموعة الأولى (T_1) إذ لوحظ وجود انتفاخ رئوي أقل مع وجود فرط للتنسج بسيط في الطبقة الطلائية المبطنة للقصيبات الهوائية وتمثلت على شكل انثناءات واضحة حول تجويف منتظم إلى حد ما , كما في الشكلين (4 - 15) و(4 - 16) .



الشكل(4-11): مقطع عرضي من نسيج الرئة مجموعة السيطرة يلاحظ وجود الوريد الرئوي (←) والتركيب النمطي الطبيعي للاسناخ الرئوية والحواجز بين السنخية (←) والخلايا المبطنة للقصيبات(↔)(A:) H&E) .(100x , B: 200x

الشكل (4-12) : مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T_1) يلاحظ : (A:100x) فقدان تام للتركيب النمطي للنسيج الرئوي ناتج عن ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية وحدوث فرط تنسج ونزيف (←) وتنخر في بعض الخلايا اضافة الى ارتشاح لسوائل الدم . (B:200x) واحتقان في الأوعية الدموية للرئة وانسلاخ (Sloughing) الطبقة الطلائية المبطنة للقصيبات الهوائية , ارتشاح بالخلايا الالتهابية وتنخر تام للاسناخ الرئوية (←) الرئوية والتحامها. (H&E) .

الشكل(4-١٣) : مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T_1) يلاحظ ظهور الهايفا للفطر المسبب للإصابة (←) مطمور داخل النسيج المملوء بالارتشاحات الالتهابية (A: 100x , B: 200x) (H&E) .

الشكل(4-١٤) : مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر (T_1) يلاحظ (A:200x) تهتك الجدار السنخي (←) مكونة الانتفاخ الرئوي , نزيف (←) , الاحتقان الشديد وتكثف الخلايا الالتهابية حول الاسناخ الرئوية مع تليف الحاجز بين الاسناخ. (B: 200x) توضح ارتشاح وغزو الخلايا الالتهابية في النسيج المحيط حول الاسناخ واحتقان دموي(←) مع نزيف دموي . (H&E) .

الشكل (4-15): مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر و المعاملة فموياً بمستخلص *C. speciosus* بجرعة (75ملغم/مل) توضح :(A:100x) استعادة الاسناخ الرئوية (←) شكلها الطبيعي واستعادة الحواجز بين السنخية سمكها المعتاد ورجوع التركيب النسجي الرئوي لوضعه الطبيعي تقريباً . (B: 100x) القصيبات طبيعية تقريباً(←) ووجود عدد من الاسناخ الطبيعية (↔) مع انتفاخ رئوي بسيط (↔).(H & E).

الشكل (4-16): مقطع من رئة جرذ من المجموعة المصابة بالفطر و المعاملة فموياً بمستخلص *C. speciosus* بجرعة (75ملغم/مل) توضح : (A:200x) فرط تنسج بسيط حول القصيبات (←) مع وجود البطانة الظهارية العمودية البسيطة المبطنة للقصيبات (←) وظهور الاسناخ طبيعية . (B : 100x) يلاحظ ارتشاح قليل للخلايا الالتهابية (←) في النسيج الخلالي بين الاسناخ مع قصيبات طبيعية مبطنة بظهارة عمودية بسيطة . (H & E) .

5. المناقشة Discussion

1.5. نسبة عزل الفطريات Aspergillus .

اعتماداً على نتائج الفحص المجهري المباشر باستخدام KOH (10%) والفحوصات المظهرية , الزرعية منها والمجهرية , باعتبارها وسائل تشخيصية مؤكدة (شريف , 2012a) , تم تشخيص (381) عزلة فطرية عائدة إلى (293) عينة سريرية والخاصة بمرضى أخماج المسالك التنفسية بنسبة بلغت (72.1 %) من المجموع الكلي لعينات الدراسة , مع ملاحظة في بعض الأحيان تسجيل أكثر من عزلة فطرية في آن واحد للعينة الواحدة, وعموماً هي أعلى من النسبة التي سجلها الجناحي (2012) في محافظة الديوانية , إذ بلغت نسبة الإصابات الرئوية بالفطريات الانتهازية (60.4 %) من مجموع (240) عينة قشع شملتها دراسته, وأقل من النسبة التي سجلها الغالبي (2006) إذ بلغت (87,7 %) . وتعزى غزارة وجود الفطريات في الجهاز التنفسي إلى انه مكان مناسب لنمو الأحياء المجهرية التي تصله من هواء الشهيق اثناء عملية التنفس فهو مكان رطب وبدرجة حرارة مناسبة لنمو الفطريات مع وجود المغذيات , فضلاً عن أي خلل أو اضطراب بالجهاز المناعي للمضيف يعزز عملية الاختراق والاستعمار للفطريات داخل انسجة الجهاز التنفسي (Leonar and Rocio, 2011) .

وقد أتضح جلياً عدم كفاءة الفحص المجهري المباشر للعينات السريرية مقارنةً بنتائج الزرع المختبري في النتائج المبينة في الجدول (4 - 1) حيث أن الفحص المجهري المباشر لم يتمكن من إعطاء نتائج دقيقة فقد بلغت حساسية الفحص (7.29%) , وعندما اجري الفحص بالزرع لعينات الدراسة كانت النتائج أدق , إذ يعد هذا الفحص من أدق الفحوصات (الشبلي , 2006) , وأن ظهور بعض النتائج السالبة أو الموجبة كاذبة بالفحص المجهري المباشر يعود إلى أسباب عدة منها ظهور فطريات أخرى مثل *Pseudallescheria boydii* أو *Scopulariopsis* sp. والتي قد تربك الفحص أو تعطي تشخيصاً خاطئاً , فضلاً عن البكتريا اللاهوائية أو المايكوبلازما وغيرها , وأحياناً تكون الخيوط الفطرية قد أضمحلت أو تحللت نتيجة مقاومة الجسم أو نتيجة أخذ العلاج أضافة إلى احتمالية حدوث الخطأ التجريبي , لذا فأن عزل الفطر على الوسط الزرعي يوفر وسيلة مفيدة جداً من أجل التشخيص (Batra *et al.*, 2006) , وهذه النتيجة مطابقة لما توصلت اليه AL-Ameri (2005) من أن نتيجة الفحص المباشر لمسببات الإصابات الرئوية الفطرية غير معبرة عن الوجود الفعلي للمسبب المرضي عند الأشخاص المصابين بأخماج المسالك التنفسية , وبالتالي فإن هذا يدل على أن طريقة الفحص المباشر غير كفؤة في الكشف عن وجود أو عدم وجود الفطريات .

2.5. نسبة العزل بجنس *Aspergillus* وأنواعه المعزولة .

بصورة عامة أظهرت نتائج الزرع المختبري سيادة جنس *Aspergillus* بواقع (107) عزلة أي بنسبة (28.08 %) من المجموع الكلي للعزلات , حيث كان ثاني أكثر الأجناس تكراراً بعد الخمائر وبفارق غير معنوي عند اختبار أقل فرق معنوي LSD . ومن الجدير بالذكر أن سبب شيوع أمراض جنس .*Aspergillus* spp كونه من الفطريات الرمية واسع الانتشار في الطبيعة (التربة , الهواء , الماء وفي المواد العضوية المتعفنة) , فضلاً عن إنتاجها أعداد هائلة من الوحدات التكاثرية الصغيرة الحجم (أقل من 5 ما يكرون) سهلة التطاير والانتشار بوصفها عوالق سائدة ضمن المجتمع الميكروبي الهوائي , فوفقاً للدراسات العديدة في بايولوجيا الهواء (Aerobiology) أن معظم فطريات الهواء ذات التأثير المحسس للإنسان هي ضمن مجموعة الفطريات الناقصة ومن الأجناس التي سجلت سيادة وتفوقا في أعدادها جنس *Aspergillus* الأمر الذي يسهل وصولها الى المجرى التنفسي وبالتالي الأسناخ الرئوية عن طريق الاستنشاق بأضعف تيار هوائي مؤدية إلى حدوث داء الرشاشيات الرئوي (Pulmonary Aspergillosis) (اسماعيل,2008) .

وأن سيادة هذه الفطريات سبق وأن سجلت في دراسات عالمية عديدة منها دراسة (Ramzi *et al*., 1999) و(AL-Rubiaa, (2001 وفي دراسة Kurhade *et al*., (2002) الذي وجد نسبة الإصابة بجنس *Aspergillus* كانت (80%) في المرضى الذين يعانون من مشاكل تنفسية , وكذلك سجل Perfect *et al*., (2001) في الولايات المتحدة نسبة إصابة (40%) , بينما سجلت دراسة Agbetile *et al*., (2012) نسبة (٥٤%) من بين مرضى الربو الرئوي , واتفقت كذلك الدراسة الحالية مع العديد من الدراسات داخل العراق ومنها دراسة Jaffar (1998) حيث سجلت (32) عزلة من جنس *Aspergillus* من (27) شخصاً مصاباً بمرض رئوي بينما في دراسة الربيعي (2001) التي عزلته من القناة التنفسية كأحد الفطريات الانتهازية في محافظة البصرة و بنسبة كبيرة بلغت (74 %), ومع دراسة الرجبو (2004) في محافظة الموصل , بينما سجل الحسيناوي (2006) سيادة جنس *Aspergillus* بنسبة (45 %) في دراسته التي شملت عزل الفطريات الانتهازية من مناطق مختلفة من الجسم في محافظة ذي قار, وذكر ناجي وآخرون (2006) أن أعلى نسبة للإخماج الرئوية الفطرية كانت بسبب جنس *Aspergillus* (31 عزلة) من المرضى الذين يعانون من التدرن , ومحلياً تتفق مع ما ذكره جلوب (2004) , AL-Ameri (2005) , الغالبي (2006) والجناحي (2012) وبنسبة عزل بلغت (76% , 43% , 45% , 60%) على التوالي . ويعزى سبب اختلاف نسبة الإصابة بالنسبة للدراسات السابقة مقارنة بالدراسة الحالية لكون وبائية هذا العفن وانتشاره تعتمد بالدرجة الأساس على الحالة المناعية

للأشخاص وطبيعة البيئة التي يسكنوها من حيث أنتشار الابواغ فيها وربما يعود الاختلاف إلى عدد العينات المتفاوت بين الدراسات , فضلاً عن كون دورة حياة هذا الجنس في الطبيعة بسيطة وله القابلية العالية على التبوغ (السامرائي , 2009)

أما بالنسبة لأنواع جنس *Aspergillus* المعزولة ضمن الدراسة الحالية فكما موضح في الجدول (4 - 3) كان الفطر *A. fumigatus* اكثر الأنواع ترددا في هذه الدراسة بنسبة (29.9%) , وجاءت هذه النتائج متوافقة لما توصل اليه كل من (AL-Ameri ,2005; Jaffar ,1998) بأن نسبة عزل هذا الفطر كانت عالية إذا ما قورنت مع باقي الأنواع الفطرية المسببة لداء Aspergillosis الرئوي إذ سجلت الدراستان نسبة (20.8%) و (36%) على التوالي من المجموع الكلي لعزلات جنس *Aspergillus* , فيما اختلفت مع ما وجده الغالبي (2006) بأن نسبة الإصابة بهذا الفطر شكلت (22.2%) والذي ظهر بالمرتبة الثالثة من بين المسببات الفطرية لأخماج الجهاز التنفسي وقد عزلت الربيعي (2001) هذا النوع من القناة التنفسية من المرضى المراجعين لمركز التدرن والأمراض الصدرية في البصـــرة وبنسبة تردد (12.2%) . في حين سجل Agbetile *et al.*, (2012) نسبة ظهور بلغت (57%) للفطر *A. fumigatus* وفطر *Penicillium* spp. , وإن عزل هذا الفطر بنسبة عالية يعود إلى تحمله درجات الحرارة المتفاوتة فضلاً عن أنه من الفطريات التي تستغل أي فرصة ضعف في مناعة الجسم لأحداث الإصابة (Follet *et al.*, 2011) .

وبيّنت نتائج الدراسة الحالية أن ثاني أعلى نسبة عزل كانت للفطر *A. niger* بنسبة (28.9%) , وقد عزلت الربيعي (2001) هذا النوع بنسبة تردد (25.4%) وجاءت هذه النتائج متوافقة أيضا لما ذكرته (AL-Ameri 2005) التي أشارت إلى أن الفطر *A. niger* هو المسبب الثاني لداء Aspergillosis الرئوي بنسبة (30.1%) , وتتفق كذلك مع Jaffer (1998) في أن هذا الفطر هو المسبب الثاني للإصابات الفطرية الرئوية , فيما اختلفت مع نتائج وادي (٢٠٠٠) بأن الفطر *A. niger*هو المسبب السائد لإصابات الانتهازية , وأن هذه النسبة العالية للنوع *A. niger* تعود إلى كونه من الفطريات الانتهازية ذات المتطلبات الغذائية القليلة ويستطيع النمو بدرجات حرارة ورطوبة مختلفة فضلاً عن إنتاج آلاف من الكونيدات (الربيعي , 2011) .

في حين احتل الفطر *A. flavus* المرتبة الثالثة في إحداث الإصابة بنسبة (18.69%) , وجاءت هذه النتائج أقل مما توصلت اليه AL-Ameri (2005) إذ وجدت أن نسبة إصابة الجهاز التنفسي بفطر *A. flavus* كانت (26.21%) ، لكنها تتفق معها بأن هذا الفطر هو المسبب الثالث من بين أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة , كما عزل الغالبي (2006) الفطر *A. flavus* الذي كان الاكثر انتشارا وبنسبة

(38.89%) من بين المسببات الفطرية لداء Aspergillosis الرئوي , في حين عزل هذا النوع كمسبب ثاني للإصابة من قبل (الربيعي ,2001 ; الحسيناوي , 2006 ; Jaffar,1998) من القناة التنفسية للمرضى المصابين بالتدرن الرئوي وبنسبة عزل متباينة بلغت (٨,٢% , ٩,٣% , ٣,٩%) على التوالي , وقد أشار Ines *et al.*, (2011) إلى أن هذا الفطر يتميز بقدرتة العالية على إحداث الإصابة نظراً لقابليته على إنتاج الأنزيمات المحللة والسموم الفطرية ومنها(Aflatoxinen) التي تسبب أمراضا مختلفة حادة ومزمنة للإنسان وحدوث أورام وتليف للكبد ولقدرته على التوغل داخل الأنسجة من خلال هايفاته بين الخلايا للحصول على الغذاء مما يتسبب بأضرار كبيرة .

وسجل الفطر *A. terreus* المرتبة الرابعة بنسبة (12.14%) من مجموع أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة ضمن الدراسة الحالية , وجاءت هذه النتائج مطابقة لما توصل اليه الغالبي (2006) من أن هذا النوع يأتي بالمرتبة الرابعة من حيث نسب الإصابة , لكنها لم تتفق معه من حيث نسبة العزل إذ كانت النسبة (6.34 %) , وهي مقاربة لنتائج الحسيناوي (2006) الذي عزل هذا النوع من القناة التنفسية بنسبة تردد (11.11%) , أما الجناحي (2012) فقد شكلت نسبة (13.15%) من بين المسببات الفطرية لداء Aspergillosis , وبنسبة تردد (4.6 %) في الدراسة التي أجرتها الربيعي (2001) في البصرة . وقد أشار Baddley *et al.*, (2003) من أن الإصابة الفطرية الرئوية التي يسببها الفطر *A. terreus* ذات أنتشار قليل نوعاً ما وتعزى إلى تردي الظروف البيئية والصحية التي يعيشها المصابون فضلاً عن الضعف في الآلية الدفاعية للجسم ولاسيما في مرحلة الكهولة.

إن النتائج أعلاه تتفق مع ما ذكره ناجي وآخرون (2006) من أن الفطر *A. niger* هو أكثر الانواع انتشارا يليه *A. fumigatus* وهي الاكثر شيوعاً في الاخماج الفطرية بداء Aspergillosis ومن ثم *A. flavus* و *A. terreus*.

وسجل الفطر *A. nidulans* نسبة إصابة بلغت (2.80%) ضمن الدراسة الحالية , وقد عزل هذا النوع كذلك من قبل الجناحي (2012) الذي أظهر أن أدنى نسبة إصابة كانت لهذا النوع بواقع (7.89%) من بين أنواع جنس *Aspergillus* المعزولة من القناة التنفسية .

وتضمنت الدراسة أيضاً عزل الفطر *A. ochraceus* بتردد (3.73%) ويعتبر هذا أول عزل له في محافظة الديوانية من قشع مرضى إصابات الجهاز التنفسي بحسب المصادر المتوفرة , وأن إصابة الجهاز التنفسي بهذا الفطر واردة حيث أشار الحسيناوي (2006) إلى تسجيل (5) إصابات فطرية رئوية بفعل الفطر *A. ochraceus* أي بنسبة(7.32 %) من بين مجموعة الإصابات ال Aspergillosis المسجلة

ضمن دراسة في محافظة ذي قار, وقد عزلت الربيعي (2001) هذا النوع من القناة التنفسية لمرضى مركز التدرن والأمراض الصدرية في البصـــرة وبنسبة تردد (1.04%) .

كما توصلت نتائج الدراسة الحالية إلى عزل أنواع لم يسبق تسجيلها كمسببات انتهازية مصاحبة لالتهاب المسالك التنفسية داخل العراق وفقاً للأبحاث المتوفرة وهي: *A. parasiticus* , *A. penicillioides* و *A. ustus* لكن إصابتها للرئتين مسجلة في دراسات عالمية عدة منها دراسة (Agbetile *et al*., 2012) التي شملت (126) مريض من مرضى الربو تم عزل فطر *A. ustus* بواقع عزلة واحدة كإصابة فطرية خيطية مختلطة (co-culture), كما عُزل Greenberger (2002) النوع ذاته من مرضى (HIV) . ولم تتمكن من ايجاد دراسة ذات إثبات عملي حول عزل النوعين *A. parasiticus* , *A. penicillioides* من القناة التنفسية ليتسنى لنا مقارنة نتائج الدراسة الحالية .

3.5. التشخيص الجزيئي التأكيدي لعزلات جنس *Aspergillus*

استخدمت تقنية (PCR) في الدراسة الحالية لتشخيص ما يربو على (20) عزلة عائدة للأنواع الأربعة الأكثر ترددا بنسبة إصابتها , اعتماداً على بوادئ (Primers) للجينات المشفرة لأحد أنزيمات التفاعلات الحيوية المهمة التي تجري داخل الخلية الفطرية , أي أن الجينات التي تم اعتمادها تعد من الصفات التشخيصية المهمة لهذه الأنواع الفطرية على المستوى الجيني . نظراً لكون الطرائق التقليدية المعتمدة لتشخيص الأعفان ومنها الأنواع التابعة لجنس *Aspergillus* spp. والقائمة على تحديد المعايير المورفولوجية , لم تعد كافية بسبب تداخل هذه المعايير مع غيرها من الأنواع التي تصنف ضمن الانواع الأخرى لجنس *Aspergillus* والتي تزيد على 300 نوع (Geiser *et al*., 2007) , فضلاً عن التباين الوراثي فيما بينها , فمزارع الأحياء المجهرية وإن انتمت إلى المجموعة نفسها تتباين وراثياً في خصائص نموها وصفاتها المورفولوجية , ولا يعني التباين ضرورة الاختلاف في البناء الوراثي لاسيما بين المزارع والعزلات التي تنتمي إلى الجنس والنوع ذاته بل قد يكون نابعاً عن استجابة المزارع أو العزلات للظروف البيئية (محي الدين وجيجان , 2013) . ومن هنا شرع الباحثون الاعتماد على الطرائق الجزيئية باستعمال تقنية PCR التي يطلق عليها الطريقة القياسية الذهبية لما تتميز به من دقة وخصوصية عاليتين في التشخيص (ابراهيم , 2013) . وهذه النتيجة مطابقة لما ذكره Logothetic *et al*., (2009) والذي وجد من خلال دراسة (59) عزلة من جنس *Aspergillus* spp. تعود إلى ستة أنواع , بينها (17) عزلة *A. fumigatus* و (16) عزلة *A. flavus* و(13) عزلة تعود الى *A.niger*

و(8) عزلات *A. terreus* وبأستعمال بوادئ معينة Primers لجينات معينة , انه يمكن التمييز بين هذه الأنواع بتحليل نواتج تضخيم amplicons هذه الجينات بطريقة PCR من خلال الترحيل الكهربائي .

4.5. تأثير المستخلص الكحولي والمائي في نمو الفطريات المختبرة .

على ضوء النتائج المستحصل عليها يكون بحثنا قد أكد إن لمستخلصات جذور نبات *C. speciosus* فاعلية في تثبيط النمو الفطري وإنبات الأبواغ الفطرية, حيث أظهرت نتائج الدراسة الحالية بشكل كلي من جميع الاختبارات الحساسية العالية التي أبدتها جميع العزلات الفطرية المختبرة تجاه مستخلص نبات *C. speciosus* الكحولية والمائية وبدرجات متباينة معنوياً عند اختبار أقل فرق معنوي بين متوسط التأثير بالنسبة إلى المعاملة والتركيز تبعاً لنوع الفطر, وأن هذا التباين في الفعالية التثبيطية للمستخلصات قد يعكس طبيعة التباين في المواد والمكونات الفعالة وكمياتها المؤثرة في الفعالية التثبيطية . كذلك من نتائج التثبيط لوحظ الزيادة التدريجية في النسبة المئوية لتثبيط النمو الفطري وإنبات الأبواغ في الأنواع المختلفة لفطر *Aspergillus* مع زيادة تراكيز المستخلصات المستخدمة , ومن الجدير بالذكر أن المستخلص الكحولي كان الأكفأ مقارنةً بالمستخلص المائي وبما أن ظروف الاستخلاص كانت واحدة لذا فأن الاختلاف يعزى إلى اختلاف قطبية المذيب التي تعود إلى اختلاف ثابت العزل الكهربائي أو ما يعرف بمعامل السماحية النسبي للمذيبين كليهما إذ يبلغ ثابت العزل الكهربائي للماء (78.54 %) في حين كحول الميثانول (30 %) (ابو مجداد , 2007) والتي تؤدي دوراً مهماً في استخلاص بعض المركبات الفعالة من دون المذيبات الاخرى مما يؤدي إلى ترسيب أكبر كمية ممكنة من المركبات الفعالة أثناء الاستخلاص (Kelmanson *et al*.,2000) . ومن الملفت للانتباه أن المستخلصات النباتية عموماً كانت هي الأكفأ مقارنة بمعاملات المضاد الفطري القياسي KCZ (مجموعة سيطرة موجبة) وللاختبارات جميعها وذلك قياساً مع النمو الطبيعي للفطريات بدون أي معاملة (مجموعة السيطرة السالبة) , مما يشير إلى أن مستخلصات هذا النبات تمتلك القدرة في التأثير المضاد لنمو الفطريات ولاسيما عند التراكيز العالية , ويتضح ذلك جلياً من خلال مورفولوجيا الميسليوم , إذ أنّ انخفاض معدل نمو الفطريات الناتج عن تأثير مستخلص النبات الكحولي عادة ما يكون مرفقاً بتغيرات مورفولوجية للميسليوم النامي . فقد خلص من دراستنا أن التركيز (75 ملغم/مل) لمستخلص النبات الكحولي يسبب تغيرات مورفولوجية شديدة مماثلة لتلك التغيرات الناتجة من تأثير المضاد الفطري Itraconazole على الفطر *A. fumigatus* المعزول من إصابات رئوية مرضية ضمن دراسة (Lei *et al*., 2011) .

وفي دراسة للباحثين Parekh and Chanda (2008) بينا أن المستخلصات الميثانولية لعدة نباتات طبية منها نبات *C. speciosus* أظهرت فعالية جيدة ضد ثلاثة أنواع من فطر *Aspergillus* spp. حيث منعت جميع الأنواع من النمو الطبيعي , كما أشار إلى أن تأثير المستخلصات يختلف باختلاف نوع الفطر والتركيز حيث أظهرت التراكيز الأقل نشاطاً مضاداً لفطر *A. flavus* بينما التركيز الأعلى أظهر تأثيراً تثبيطياً لكل *A. niger* و*A.flavus*.

كما أثبتت دراسة سعودية للباحثة القطان (2009) فعالية جذور نبات *C.speciosus* بصورته الجافة ضد فطر *A.fumigatus* و *A.niger* وخميرة *Candida albicans* التي تصيب الجهاز التنفسي , وقد أتضحت تلك الفعالية عند التركيزين (25 %, 30 %) . أما الدراسة التي قام بها القطان والشيخ (2011) بجامعة الملك عبد العزيز قد عززت هذه الفعالية ضد الفطر *A. fumigatus* , *A. flavus* وخميرة *C. albicans* المختبرة , حيث أتضح التأثير لجميع المستخلصات المائية المعاملة على البارد والساخن وعند التركيزات المستخدمة لاسيما المرتفعة منها .

ويمكن تفسير النتائج الحالية إلى أن المستخلصات النباتية قد عملت بشكل مماثل لعمل المضادات الحياتية المصنعة وهذا يتفق مع شاتو (2003) حيث ذكر أن التأثيرات الفسيولوجية للمركبات الفعالة المثبطة لنمو الفطريات قد تكون ناجمة عن التدخل في أحد الوظائف الحيوية التي تستهدفها وتعمل على أبطال مفعولها , فقد تقوم المستخلصات النباتية بتثبيط بناء البروتينات الأساسية والأحماض النووية (DNA,RNA) , كما أشارت دراسة (Thobunluepop *et al*., 2007 ; أسماعيل , 2010) إلى أن بعض المركبات النباتية الفعالة تعمل على زيادة فعالية الانزيمات (Malik , Fumarase , Succnic dehydrogena's , dehydrogenase) مما يؤدي إلى زيادة التسمم وبالتالي خفض معدل النمو للفطر أو تحطيم الجدار الخلوي إذ تؤثر المستخلصات في أيض مركب الايركوستيرول (Ergosterole) وهو نوع من الدهون الكحولية يعتبر جزءاً أساسياً من مكونات الجدار الفطري وذلك من خلال تأثيرها على فعالية الأنزيم (3- hydroxyl-3- methyl glutase) المسؤول عن بناء الحامض (mevalonic acid) الذي يمهد لبناء الايركوستيرول وبالتالي تمنع تكون المركب مما يؤدي إلى تثبيط عمل القنوات والنواقل الأيونية وتهشم غشاء الخلية الفطرية وخروج المحتويات الداخل خلوية وموتها (EL- Mehalawy , 2006) . ولعل هذا ما يفسر مدى التغير المورفولوجي لمايسليوم الفطريات المختبرة , وهذا يتفق مع رأي Neeta and Abhishek (2006) الذي أرجع التغيرات المرفولوجية الحادثة على مستوى الجدار الخلوي عند معالجة *Phythium ultimum* بكل من Thym و Lavender Oil إلى مدى تداخل المركبات الزيتية مع التفاعلات الانزيمية المسؤولة عن التخليق الجداري مما ينعكس على فعالية النمو والتشكل المورفولوجي .

وهذه النتائج تتفق من حيث الاتجاه في التأثير مع ما توصل اليه (Mostert *et al*., 2000 ; Leroux *et al*., 1999) في أن المواد الفعالة في جذور نبات *C.speciosus* قد تمكنت من النفاذ إلى داخل الخلية الفطرية وارتبطت بمكونات الجدار الخلوي وأدت إلى نقص نموها وعدم تكوين الغزول الفطرية .

5.5. الاستخلاص والكشف الكيميائي التمهيدي للمركبات الفعالة لمستخلصات نبات *C.speciosus*

تم اختيار الميثانول (80%) في الدراسة الحالية كمذيب عضوي اعتمادا على دراستي (Veeramuthu *et al*., 2012 ; Nitin and Khosa , 2012) والتي بينت مدى تأثير مختلف المذيبات (الماء وتراكيز مختلفة من المذيبات العضوية) على فعالية نبات *C. speciosus* حيث تم الحصول على أكبر نسبة من المركبات الفعالة والتي أعطت أكبر قوة تثبيطية لنمو الفطريات . وباستخدام جهاز Soxhelet extractor حيث أظهرت هذه الطريقة إيجابية من خلال مردودها , والذي قدر (7.4%) بالنسبة للمستخلص الميثانولي ويعتبر هذا المردود قريباً من النسب التي حصل عليها (Choudhury *et al*., 2012) , و (6.76%) بالنسبة للمستخلص المائي . وتبين على ضوء ما ورد في الجدول (4 - 20) الاختلاف في نوع المركبات الفعالة المستخلصة من نبات الاختبار وبحسب نوع المذيب المستخدم في عملية الاستخلاص , إذ لوحظ أن كحول الميثانول المخفف بالماء بنسبة (80%) كان الأكفأ في إذابه المركبات الفعالة لنبات الدراسة مقارنة بالماء وفي هذا الصدد أشار ابو مجداد (2009) إلى أهمية اختيار المذيب المناسب للاستخلاص إذ أن استخدام خليط من المذيبات مثل الماء والميثانول يزيد درجة ذوبانية المركبات الفعالة وتبعاً لدرجة قطبيتها في هذا الخليط بنسبة أعلى من استخدام أحد المذيبين كلاً على حده وتتفق نتائج دراستنا الحالية من حيث الاتجاه العام مع (الحسن , 2006 ; الموسوي , 2006 ; هميم , 2003) حول كفاءة مزيج من الكحول والماء في استخلاص المركبات الفعالة أكثر من الماء وللنبات الطبي نفسهُ .

نظراً لما تم الحصول عليه من نتائج ذات تأثير تثبيطي جيد لمستخلصات نبات *C. speciosus* في نمو الفطريات المختبرة على الوسط الصلب والسائل وقدرتها التثبيطية العالية في جميع الاختبارات فقد تم الكشف الكيميائي التمهيدي عن بعض المكونات الطبية الفعالة في هذه المستخلصات , إذ أعطى الكشف نتيجة موجبة في الصابونينات والتانينات والقلويدات و الفينولات والكلايكوسيدات والراتنجات والفلافونيدات والكاربوهيدرات و الكومارينات و الفيوكيومارينات وغيرها , جدول (4 - 21) حيث أظهر

المستخلص الكحولي نتيجة موجبة للكشوفات جميعها في حين أن المستخلص المائي للنبات نفسه لم يحتوي على الكومارينات و الفيوكيومارينات والقليل من الفينولات والفلافونيدات , وهذه النتائج تتفق مع (Choudhury *et al*.,2012 ; Gayatri and Rajani , 2011) إذ أشاروا إلى احتواء المستخلص الكحولي لنبات الاختبار على أكثر المركبات الفعالة , ومع الدراسة الهندية للباحث Saraf (2010) التي تضمنت الكشف الاولي عن المركبات الصيدلانية ضمن مركبات الايض الثانوية لنبات *C. speciosus* ومعرفة فعالية التثبيطية على بكتريا *Staphylococcus aureus* , *Klebsiella pnuemoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* إذ بينت احتواء النبات على جميع المركبات الفعالة التي تم الكشف عنها ضمن الدراسة , في حين ذكر Nitin and Khosa , (2012) من أن المستخلص المائي يخلو من القلويدات والتربينات والفلافونيدات وهذا لا يتوافق ونتائج الدراسة الحالية , وأن هذا التباين لا يشير بالضرورة إلى انعدام المكونات الفعالة , فالمركبات الفعالة قد تكون موجودة بكميات غير كافية في المستخلص الخام لإظهار نتيجة موجبة للكشف أو قد ترجع إلى اختلاف النبات باختلاف الظروف البيئية أو اختلاف بطريقة تحضير المستخلص .

وبشكل عام فإنَّ المستخلصات النباتية هي عبارة عن خليط معقد من مختلف المركبات , لذا سيكون من الصعب توقع ماهية عمل المركبات الفعالة المسؤولة عن الفاعلية التثبيطية أو الآلية التي تعمل بها ومع ذلك فيمكن أن نتوصل إلى بعض الاستنتاجات فمثلاً المركبات الاساسية الموجودة في نبات *C. speciosus* هو Sesquiterpinoid هي مجموعة من المركبات التربينية (الصابونيات) أهمها Eremanthin و Costunolider ذات صيغ كيميائية متنوعة تتميز عن غيرها بأنها مركبات ذات مذاق شديد المرارة (حاد) وهي مضادة للأحياء المجهرية (Neerman , 2003) ومسكنة للآلام ومقوية (Winks and Schimmer,1999) , ويعزى اليهما النشاط المضاد للفطريات وهذا ما أكدته دراسة Veeramuthu *et al*., (2012) باستخدام طرائق الفصل الكروماتوكرافيا . كذلك يحتوي مركب (Diosgenin) الذي يعد ذو أهمية كبيرة من الناحية الطبية نظراً لفاعليته (Srivastava *et al*., 2011) المضادة للالتهابات فهو يعتبر المصدر التقليدي للبناء الكيميائي للأدوية الستيرويدية (Rastogi and Mehrotra , 2004) , وأشار Daniyan *et al*., (2010) إلى أن هذه المركبات لها فاعلية مضادة للفطريات حيث تمتاز بقدرتها على الاتحاد مع بروتينات الخلية الفطرية وترسيبها فتغير من طبيعتها وتعمل بوصفها مذيباً جيدا للمواد الدهنية , أي أنه يعمل على تغير نفاذية غشاء الخلية الفطرية , و ذكر Nandhakumar *et al*., (2007) احتواء نبات *C. speciosus* على الفينولات كالثايمول (Thymol) والكارفاكرول (Carvacrol) وهي من المركبات الأروماتية الحاوية على مجاميع هيدروكسيل (OH) حرة ومتعددة وأن القدرة التثبيطية لهذه المركبات تزداد بزيادة هذه المجاميع وذلك من خلال تكوين

أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل للمركب والجزء الفعال من الأنزيم وبذلك يؤدي إلى تغير حجوم هذه الانزيمات وكذلك تتغير خواصها وبالتالي لا تكون فعالة في الخلية الفطرية (Okigbo *et al*., 2009) . في حين بين Srivastava *et al*., (2011) أن فعالية نبات *C. speciosus* قد تعود إلى محتواه من مركبات (Monoterpen , Cineol , Ginerol) التي تعمل على الارتباط بالحامض النووي (DNA) للخلية الفطرية وبالتالي منع نمو الخلايا .

اما بالنسبة لاختبار السمية لمستخلصات نبات الاختبار فلم يظهر أي سمية تجاه كريات الدم الحمراء وهذا يتفق مع دراسات اخرى لنفس النبات منها دراسة Choudhury *et al*.,(2012) لم تظهر أي سمية عند التركيز (٥٠٠ ملغم /مل), ويعتبر هذا الاختبار جدا مهم لان من صفات العلاج الجديد ان يكون اكثر فاعلية واقل سمية (Ahmed *et al*., 1998) .

1.6.5. العلامات السريرية Clinical signs

أدت المعاملات (العلاج التجريبي) لمستخلص نبات *C. speciosus* الكحولية تركيز (75ملغم/كغم) لذكور الجرذان المختبرية إلى التقليل من الاضطرابات السلوكية التي عانتها حيوانات التجربة من جراء الإصابة بالعالق الجرثومي لفطر *A. fumigatus* , إذ كانت أكثر نشاطاً وحيوية مقارنة بمثيلاتها التي عوملت بالحقن داخل التجويف الأنفي (I.N) للعالق الجرثومي فقط , وهذه العلامات التي نتجت بفعل الخلل الوظيفي والاضطراب في اعضاء الجسم المختلفة , كفقدان الشهية (Loss of appetite) الذي يعود إلى زيادة المدورات الخلوية المفقدة للشهية (Anorotic cytokines) المتسببة عن السموم الفطرية للفطر *A.fumigatus* والتي تشمل كل من (Tumor necrosisα)TNFα factor- وIL-1 و IL-2 (Dixit *et al*., 2004) , إما قلة الحركة والخمول وضعف البنية (Lean mass) بصورة عامة فهو ناتج عن قلة الغذاء ونقصان في المواد الضرورية لبناء الجسم (Ross *et al*., 1992) , وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الفرطوسي وآخرون (2013) وناجي وآخرون (2006) من أن الجرذان المحقونة بعالق فطر *Aspergillus* spp. تظهر عليها أعراض الإصابة على هيئة فقدان الشهية والوزن والخمول واحتقان العينين , وأن التفاوت في معدلات الوزن يرجع إلى ضراوة الأنواع فكلما كان النوع ضارياً كلما ظهرت الاعراض أسرع ومن ثم نقص بالوزن بشكل أسرع , وهذا ما أكدته نتائج الدراسة الحالية حيث حدث انخفاض دون مستوى المعنوية في أوزان جسم جرذان المجموعة المعاملة بالعالق الجرثومي (T_1) مقارنة بمجموعة السيطرة (C) بفعل فقدان الشهية إضافة إلى دور الوسائط الالتهابية (Inflammatory mediators) أو العوامل الالتهابية والتي تشمل (LMIF) و(TNFα) و(MMIF) كونها عوامل مهدمة (Catabolic factor) , إذ تؤدي إلى هدم الكلوكوز

المخزون بالعضلات بعد التعرض للذيفان الفطري وحصول حالة (Endotoxemic) (Quist *et al*., 2000) , وأشارت دراسة Marin *et al*.,(2002) إلى حصول انخفاض في معدل الكسب الوزني في صغار الخنازير عند تجريعها فموياً بجرع مختلفة من مركبات الايض الثانوية للفطر *A.fumigatus* . بالمقابل , أدى تجريع حيوانات التجربة فموياً بمستخلص نبات *C. speciosus* الكحولية إلى كسب حيوانات مجموعة (T_2) وزناً اعلى من المجموعة المعاملة بالعالق الجرثومي فقط (T_1) وأن كان أقل من مجموعة السيطرة لكن هذا يعد مؤشراً ايجابياً لدور المستخلص الميثانولي فقد أدى إلى تحفيز خلايا الجسم لإصلاح الضرر الخلوي الحاصل بفعل الفطر *A. fumigatus* وذلك عن طريق زيادة معدل الانقسام الخلوي (Mitotic index) بفعل مكونات نبات *C. speciosus* ولاسيما لاحتوائها على مادة الصابونين والتي تعمل على خفض تركيز كلوكوز مصل الدم وبالتالي إلى زيادة بناء كلوكوز في الكبد وخزنه بشكل كلايكوجين ومن ثم زيادة الوزن (Panda *et al*.,1999 ; Platel *et al*.,1997 ; Petit *et al*.,1995)

.

2.6.5. اعراض المرض Symptoms

أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن الفحص العياني لرئات جميع الحيوانات المعاملة بالحقن بعالق فطر *A.fumigatus* تغيرات مرضية واضحة ومؤثرة عيانياً تمثلت بحصول احتقان شديد وهذه تتفق مع النتائج التي توصل إليها Pawlinski *et al*.,(2003) إلى أن الآفات المرضية الرئوية للفطر *A. fumigatus* في الأرانب البرية تظهر عيانياً كعقيدات بيضاء مختلفة الاحجام منتشرة على سطح الرئة , وقد يعزى سبب ذلك إلى حصول احتقان الاوعية الدموية بفعل محتوى العالق الجرثومي من الافرازات الفطرية والتي تسببت في حصول زيادة ضغط الدم ل (Microcirculation) وبالتالي إلى زيادة نفاذية الاوعية الشعرية والهيموغلوبين المتحرر من كريات الدم الحمر(Intravascular hemolysis) إضافة إلى تحفيز أنتاج (Iinflammatory mediators) مثل (TNF- α) والمسؤول عن حصول تحطم في معظم أعضاء الجسم (Rivera *et al*., 2003) وحصول حالة الأكسدة الفوقية للدهون وتجمع الخلايا العدلة في الأعضاء وبالتالي تحطمها (Yosikawa *et al*., 1994) , إذ أن (TNF- α) هي المسؤولة عن حصول التهابات في الجسم (Denis *et al*., 1994) , ويمكن مقارنة نتائج هذه الدراسة مع ما وجده Papiy (2005) من أن نواتج أيض الفطر *A. flavus* أدت إلى إحداث احتقان وعائي في اعضاء الاختبار الداخلية.

من جانب أخر, أظهرت نتائج الدراسة أن المعاملة بمستخلص نبات *C.speciosus* الميثانولي قد أسهم في التقليل من مظاهر التغيرات العيانية , إذ أصبحت التغيرات العيانية أقل شدة وربما أقرب إلى الطبيعة في المجموعة المصابة بالفطر *A. fumigatus* والمعالجة بمستخلص نبات *C. speciosus* , وهذا يقودنا إلى ان لمستخلص نبات الاختبار أثر إيجابي في تحسين أداء عملية التنفس للجرذان المصابة, ونعتقد أن مستخلص النبات يعمل على تثبيط الإصابة بسبب المركبات الموجودة فيه . ومما يدعم اعتقادنا بأن لنبات *C. speciosus* دوراً وقائياً معتبراً في التقليل من إضرار الإصابة الفطرية قد يترجمه النشاط المانع للتأكسد , حيث أكدت بعض البحوث الحديثة المثبتة علمياً (Habsah *et al*., 2007) مفادها امتلاك مستخلصات نبات *C. speciosus* فاعلية مضادة للتأكسد , باحتواء النبات على (Polyphenol) وامتلاك مستخلصاته نشاطاً مضاداً للتأكسد يتمثل في كثرة وجود جذور الهيدروكسيل التي تعمل كاسحة للجذور الحرة (Free Radical Scavenger), أي أنها تعمل على منع أكسدة المكونات الخلوية الأساسية نتيجة تراكم الجذور الحرة وتلف الأنسجة الناجم عن حقن عالق الفطر*A. fumigatus* , وبذلك فإنها تقوم بحماية الأغشية الخلوية وأغشية العضيات الأمر الذي يمنحها الحماية والقوة اللازمتين لأداء أفعالهما الحيوية بفاعلية كبيرة في الوقت ذاته الذي تعمل على تنشيط عدة أنزيمات مثل (Catalase , Superoxide Dismutase) التي تعمل بشكل متأزر Synergism مع مضادات الأكسدة الأخرى لحماية الخلايا في الجسم (Islam *et al*., 2010) , تتفق هذه النتائج مع ما ذكره (Vijayalakshmi and Sarada , 2008), إضافة إلى التقليل من الارتشاح في الخلايا العدلة ومنع تجمعها والتقليل من إفراز (Inflammator mediators) الناتجة بفعل الأفرازات الفطرية (Talamine and Levi,2002) على اعتبار أن الخلايا العدلة من مسببات الأضرار وتحطم الأنسجة أي أحد عوامل تقليل الاضطراب الحاصل في الأنسجة والمتسبب عن الفطر الممرض يتمثل بالتخلص من الخلايا العدلة ويقلل من هجرتها إلى الأعضاء (Croopman *et al*.,2003) .

ومن التغيرات التي لوحظت ضمن الدراسة الحالية وظهرت بشكل مؤثر هي التغيرات المرضية في نسيج الرئة للجرذان المحقونة داخل الأنف بعالق الفطر *A. fumigatus* , ففي بداية حدوث الإصابة حصل ارتشاح للعدلات (Neutrophil) والتهاب قيحي في مناطق مختلفة من الرئة وهذا يعني أن هناك استجابة سريعة من قبل الجسم تجاه الجراثيم المحقونة والذيفان الخاص بها علما بان الذيفانات المرافقة للمسببات المرضية هي عوامل جاذبة للعدلات Neutrophil chemotactic factors) (Islam *et al*., 2002. كما وان ارتشاح العدلات كان مصحوبا بتكون خراجات دقيقة (Microabscess) , فضلاً عن وجود الانتفاخ الرئوي بشكل واضح مع فرط تنسج شديد في الطبقة المبطنة للقصبات واحتقان دموي

(Congestion) وهذه الأمراض تتماشى وأعراض مرض ذات الرئة إن هذه التغيرات لوحظت من الباحثة (AL-Ameri , 2005) عند الإصابة بالـ *A. fumigatus* في الفئران وقد يعزى سبب ذلك إلى أن إفرازات الفطر *A. fumigatus* للسموم الفطرية مثل (Fumitoxin) بالإضافة إلى الانزيمات المحللة (Hydrolytic enzyme) والتي تعزز من قابلية الفطر المرضية وتكون على نوعين رئيسين هما إنزيم البروتينيز (Proteinase) الذي يحلل الأواصر الببتيدية (Peptid linkages) (Hube *et al*.,1998) وإنزيم الفوسفولايبيز (Phospholipases) الذي يحلل الاواصر الاستيرية (Ester linkages) في مركبات الدهون المفسفرة , حيث يعمل هذان الإنزيمان على تحطيم أغشية الخلايا وغزو أنسجة المضيف مؤدية إلى الخلل الوظيفي (Dysfunction) أو التحطيم الفيزيائي (Physical Disruption) الذي ينجم عنه خلل في الاستتباب الداخلي لجسم المضيف (Koul *et al.*, 1998) . ومن الجدير بالذكر أن عوامل الضراوة هذه متمثلة بجزء من التركيب الوراثي مسؤول عن الأمراضية بحجم (0.95 Kb) وتسمى (0.95 Kb positive strain) تتفاوت بين العزلات وهي المسؤولة عن أمراضية الفطر(Roeder *et al*., 2004) , وتعمل على تحفيز وإحداث الاستجابة الالتهابية من خلال تأثيرها في تحفيز إفراز عوامل الجذب الكيميائي (Chemotactic factor) الخاصة في بادئ الأمر بالعدلات والتي أظهرت فشلها بالقضاء على المسبب كلياً , نظراً لما يمتلكه الفطر من مقاومة للالتهام أو البلعمة من خلال تثبيط أو كبح الphagosome والأجسام الحالة Lysosome (Casadevall *et al*., 2003) .

وبصورة عامة , لوحظ من خلال نتائج الدراسة الحالية الفقدان الكبير للتركيب النمطي للرئة بسب التحلل النسيجي أو ظهور فرط التنسج الشديد (Hyperplasia) في الطبقة الطلائية المبطنة للقصبات او التثخن الحاصل ما بين الخلايا (Thicken of interstitial tissue) كنتيجة للوذمة (ارتشاح السوائل) والحاصلة كاستجابة التهابية للخلايا اللمفية بشكل واضح على القصيبات الهوائية وحولها مؤدية إلى فقدان بعض القصيبات الهوائية شكلها العام وتشوهها تمثل ذلك في تمددها وضمورها والتحامها وتحلل البطانة الداخلية لها . ونظراً لشدة الإصابة تعرضت رئة الجرذان لتغيرات مرضية تمثلت بوجود انتفاخ رئوي (Emphysema) والناتج عن تحلل جدران الأسناخ الرئوية نظراً لاحتواء الاسناخ على الدهون الفوسفاتية على الاجسام الرقائقيه , وقلة عدد القصيبات النهائية وتشوهها وتوسُف الخلايا العمادية الطويلة ذات القمم الحبيبية الافرازية والمعروفة بخلايا كلارا (Clara cells) المميزة للقصيبات النهائية , وأختلف التأثير من منطقة إلى أخرى في النسيج نفسه .

وعند فحص المقاطع النسجية للحويصلات الهوائية (Alveolus) وجدت مشوهة بشكل تام , وأصبحت ذات جدران سميكة وذات تجاويف ضيقة وهو ما يعرف بظاهرة الانفلاق (Colups) , ولم

تقتصر تلك التغيرات على العدد فقط بل تعدت إلى الخلايا البلعمية (Macrophages) التي تفاقم عددها في الجدار الحويصلي (Interalveolar Septum) مع ارتشاحها داخل الحويصلات بشكل يؤكد تلك الإصابة , فضلاً عن وجود مناطق كثيرة مغطاة بكميات كبيرة من النزف مع احتقان دموي دليلاً على امتلاك العامل المسبب للإصابة لإنزيم الهيمولايسين الذي يحلل كريات الدم الحمر وانسلالها خارج الوعاء الدموي خلال العملية الالتهابية بعملية يطلق عليها النضح (Exudation) محدثه حالة قصور تنفسي نتيجة لتلف الحويصلات الرئوية وينتج عن هذا القصور حصول نقص مزمن في الاوكسجين مما يؤدي إلى زيادة انتاج الأرثرويفرين فيسبب ذلك زيادة في أنتاج الخلايا الحمراء فوق الحدود الطبيعية (Erytholytosis) وفي حالة شبه ورمية للنسيج المكون . كما أوضح Lai *et al*., (2007) أن الدم المنتشر في الأوعية الدموية هو العامل الوحيد الذي تعزى إليه الوفيات الناتجة عن داء الاسبرجلوسز الرئوي المنتشر, تتفق هذه النتائج ونتائج ما توصلت إليه العديد من الدراسات منها (Crameri,1999) من أن فطر *Aspergillus* spp. ينمو في أنسجة الانسان أو خلال الفراغات التنفسية للجسم مثل القصبات أو التجويف الرئوي وهذا ما يسمى بالأمراض الفطرية الرئوية Aspergillosis . وأن مشاهدة مكونات العامل المسبب للإصابة داخل نسيج الرئة المصابة يعتبر دليلاً قاطعاً على الإصابة وهذه النتائج تتفق مع (AL-Ameri , 2005) إلى أن وجود خيوط الفطر *A.fumigatus* داخل أنسجة المضيف يعتبر دليلاً قطعيا على الإصابة بهذا الفطر, كما أشارت ناجي وآخرون (2006) إلى ظهور الخيوط الفطرية بأشكال مختلفة وتموضعها في مواقع مختلفة من نسيج الرئة دليلاً على وجود إصابة بالفطر *Aspergillus* spp. .

وعند التمعن بنتائج الفحص المجهري للتركيب النسجي لرئات الجرذان المصابة بالفطر *A. fumigatus* والمعاملة بمستخلص نبات *C. speciosus* الكحولي بجرعة (75 ملغم/كغم) لوحظ الأثر الإيجابي لنبات الاختبار وتوضح جلياً قدرة وكفاءة المستخلص المختبر يعلله تراجع معظم الآثار السلبية والتغيرات النسجية المرضية للإصابة واستعادة النسيج الحشوي الرئوي لتركيبه النمطي المعتاد تقريباً , فظهرت القصيبات الهوائية منتظمة تقريباً والطبقة الطلائية الداخلية فيها على شكل انثناءات واضحة حول تجويف منتظم إلى حد ما , وظهرت الأسناخ الرئوية ذات تركيب نسجي منتظم تقريباً وذلك عند مقارنتها بمثيلاتها في الجرذان المصابة , وظهرت الأوعية الدموية منتظمة الجدار وغير محتقنه إلى حد ما وتحتل موقعا مجاوراً للشعب الهوائية , وهذه النتائج تتوافق مع ما أكده العلياني وآخرون (2011) من الدور الفعال أثناء دراسة المقاطع النسجية والتركيبية الدقيقة لنبات *C. speciosus* في معالجة الجرذان المعاملة

بمعلق الفطر.*Aspergillus* sp مقارنة مع المضاد الفطري أمفوتراسين- ب والتي اكدت استمرارية الاضرار في معظم أجزاء نسيج الرئة بفعل المضاد .

أولاً: المصادر باللغة العربية :

ابراهيم , مصطفى رعد جواد (2013) . التحري عن بعض الجينات المسؤولة عن عوامل الضراوة والمقاومة للمضادات الحيوية في بكتريا المكورات العنقودية *Staphylococcus aureus* المعزولة من حالات سريرية مختلفة في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير. كلية العلوم ـ جامعة القادسية . ص:٩٩.

ابن القيم الجوزية , شمس الدين ابي عبد الله محمد بن أبي بكر الزرعي الدمشقي (2004) . شرح الطب النبوي . الجزء الأول ـ الناشر: المكتبة العصرية للطباعة والنشر ـ بيروت . ص :-149 143 .

ابو مجداد , نجوى محمد جميل علي (2007) .تقييم الفاعلية ضد المايكروبية للمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات السدر *Ziziphus spina-christi*(L)Desf. مجلة البصرة للعلوم, المجلد (25),العدد(1) ,١ - 16

ابو مجداد , نجوى محمد جميل علي (2009) . الفاعلية الضد مايكروبية لمستخلص الحنظل والسذاب والكركم مختبرياً . مجلة جامعة ذي قار , المجلد (4) , العدد (4) 59-66 .

إسماعيل , طارق (2008) . القسط الهندي جوهرة من الطب النبوي – الطبعة الأولى – الناشر :دار طيب الخضراء , ص: 5-30.

إسماعيل , فائز خليل (2010) . تقييم الفعالية التثبيطية لمستخلصات بعض النباتات في نمو الفيوزاريم . مجلة الانبار للعلوم الزراعية . 41 (2): ص: 165-172 .

إسماعيل , محمد طاهر ,عبير الكفري (2008).كتاب الطفيليات والفطور الطبية . منشورات جامعة دمشق ـ كلية الطب البشري . ص: 458 .

جلوب , فاطمة عبود (2004) . العلاقة بين التدرن والفطريات التي تصيب الرئة في محافظة الديوانية . رسالة ماجستير , كلية التقنيات الصحية والطبية – هيئة التعليم التقني . ص:١٠٢.

الجناحي , فرقد عبد الإله (2012) . تأثير مستخلصات نبات البنبر *Cordia myxa* في نمو الفطريات المعزولة من مرضى الأخماج الرئوية في مدينة الديوانية . رسالة ماجستير, كلية التربية – جامعة القادسية .ص:١١٤.

الحسن , سفانة كاظم جاسم (2006) . استخلاص مركبات بروتينية من القواقع *Tibia* sp. *Insula* Chorab – curta pomacea Mollusca : bridgesii diffusa Gastropoda . رسالة ماجستير – كلية العلوم – جامعة البصرة .

الحسيناوي , ميثاق ستار عبود (2006) . دراسة بعض الجوانب البايولوجية للفطريات والخمائر الانتهازية المعزولة من عينات سريرية مختلفة من مستشفى الناصرية العام. رسالة ماجستير , كلية التربية – جامعة ذي فار. ص:١٥٢.

الخالدي , بهيجة عبيس حمود (2010) . توصيف لبعض عزلات الفطر *Geotrichum* sp. والكشف عن تأثيرها المرضي في بعض معاير الدم الفسيولوجية والكيميوحيوية في ذكور الجرذان البيض . اطروحة دكتوراه –كلية العلوم – جامعة الكوفة.ص:٤٦ .

الخليل, عبد الله بن صالح.(٢٠٠٥).الاساس العملي للفطريات .كلية العلوم – جامعة الملك سعود.ص:٧٨.

الراوي , خاشع محمود وعبد العزيز محمد خلف الله (٢٠٠٠) . تصميم وتحليل التجارب الزراعية . مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر . جامعة الموصل , ص ٤٤٨.

الربيعي , أنعام محمود نجم (2001) . دراسة حول الفطريات المعزولة من القناة التنفسية لمرضى مركز التدرن والامراض الصدرية في البصرة . رسالة ماجستير , كلية العلوم - جامعة البصرة .

الربيعي , خيري جميل وحيد (2011) . عزل وتشخيص الاعفان والخمائر الملوثة للحليب الخام في محافظة واسط . رسالة ماجستير , كلية الطب البيطري – جامعة القادسية .

الرجبو, مها أكرم محمد علي (2004). دراسة تأثير مستخلصات نبات الزعتر.*Thymus* spp إلى بعض الفطريات . أطروحة دكتوراه - كلية العلوم– جامعة الموصل .ص: ٨٦ .

زكريا ورديف , حسين مروان وفوزي قطب (1981) . النباتات الطبية وزراعة مكوناتها . دار المريخ للنشر . الرياض – السعودية . ص: 230.

السامرائي , أكرم عباس عبود , أسيل إبراهيم العميد ومحمد قاسم فرج (٢٠٠٩) . دراسة في وبائية عفن الرشاشيات الدخناء *Aspergillus fumigatus* في الإنسان . المجلة العراقية لبحوث السوق وحماية المستهلك . المجلد (١) , عدد(١) .ص:٤٤-٤٠.

السامرائي , بثينه عبد الخالق عقيل (2009) . تأثير مستخلصات نبات الدفلة على نمو بعض الفطريات الجلدية المعزولة من مرضى مدينة سامراء . رسالة ماجستير , كلية التربية - جامعة تكريت .

السامرائي , خلود وهيب (1997) . المحتوى الفطري وسم السترنين في الذرة الصفراء المحلية وتأثيراته في الدواجن . أطروحة دكتوراه – كلية العلوم – جامعة بغداد .

السعيدي , عباس جبار عبد (2013).التوصيف المظهري والجزيئي لبعض الفطريات المرافقة لبذور وجذور نبات الحنطة وتأثير بعض المبيدات والاملاح الكيميائية في تلك الفطريات.رسالة ماجستير, كلية العلوم-جامعة القادسية

شاتو , ليون (2003) . بدائل المضادات الحيوية من الطبيعة – الطبعة الأولى – الناشر: مكتبة جرير, ص: 60-100.

الشبلي , ماجد كاظم عبود(2006) . تأثيرات العزلات السريرية لخميرة المبيضات *Candida albican* دراسة بايلوجية ونسيجية مرضية في محافظة الديوانية . أطروحة دكتوراه- جامعة القادسية . ص:٣٢.

شريف , فياض محمد (2012a) . أساسيات الفطريات - الفطريات الطبية . الذاكرة للنشر والتوزيع , بغداد , العراق , أكاديميا ,بيروت , لبنان . ص : 608.

شريف , فياض محمد (2012b) . أساسيات الفطريات - بيئة الفطريات . الذاكرة للنشر والتوزيع , بغداد , العراق , أكاديميا ,بيروت , لبنان . ص : 583.

شريف , فياض محمد (2012c) . أساسيات الفطريات - مدخل إلى وراثة الفطريات . الذاكرة للنشر والتوزيع , بغداد , العراق , أكاديميا ,بيروت , لبنان .ص: 250 .

شوفالية , أندرو (2005) . الطب البديل : التداوي بالأعشاب والنباتات الطبية . ترجمة : عمر الأيوبي , مراجعة وتحرير وأشراف : محمد دبس . أكاديميا انترناشيونال . بيروت - لبنان . ص:٣٢٠.

الشيخلي , محمد عبد الستار , عبد الجليل , فريال حسن العزاوي , حسن فياض (1993) . الكيمياء الحياتية العملي- الجامعة المستنصرية .

الصالحي , فاضل عبار عطية (2012) دراسة بعض التأثيرات النسيجية والفسلجية للدايازينون في ذكور الجرذان البيض . رسالة ماجستير . كلية التربية – جامعة القادسية .

العبيدي , مهند جميل (2000) . النباتات الطبية بين الطب الشعبي والبحث العلمي . دار الحكمة للطباعة والنشر- العراق , ص:26-29.

العلياني , رحمة علي , داليا مصطفى دمياطي وسناء أحمد خليفة (2011) . دراسة نسيجية وتركيبية دقيقة ومقارنة لتأثير نبات *Costus speciosus* وعقار أمفوتراسين (ب) على رئة ذكور الجرذان المصابة بفطر *Aspergillus niger* . المؤتمر العالمي العاشر للإعجاز العالمي في القران والسنة - كلية العلوم – جامعة الملك عبد العزيز .

الغالبي , حيدر حبيب حطيحط (2006). التأثيرات الخلطية لبعض المضادات الفطرية ومستخلصات نبات الثوم والأس تجاه بعض الفطريات الرئوية الأنتهازية . رسالة ماجستير, كلية التربية – جامعة القادسية .

الفرطوسي , خالد كاطع , محمد عجة , هدى عيسى (2013) . تأثير معلق الفطر *Aspergillus niger* في وزن الجسم لذكور وإناث الفئران المختبرية Mus musculus . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري ـ ملحق خاص ببحوث المؤتمر العلمي الثالث .

القطان , منال عثمان (2009) . تأثير القسط الهندي على فطر *Aspergillus niger* و *A. fumigatus* وخميرة *Candidia albicans* التي تصيب الجهاز التنفسي في الأنسان . المجلد : الأول – العدد الثاني – الناشر: جامعة أم القرى للعلوم التطبيقية.

القطان , منال عثمان و هدى الشيخ (2011) . تأثير المستخلص المائي للقسط الهندي أو البحري على بعض أنواع الفطريات الممرضة للجهاز التنفسي في الانسان لإظهار الاعجاز العلمي في السنة النبوية . المجلد :الاول – العدد 14 – الناشر جامعة الملك عبد العزيز .

كامل,مختارمحمد (داود الأنطاكي).تذكرة داوود للتداوي بالأعشاب والنباتات.الناشر: دار الروضة القاهرة:116- 118.

متعب , حيدر حميد (2008) . دراسة مصلية لتشخيص الإصابة بفطر *Aspergillus* spp. في الاشخاص المصابين بالامراض الرئوية المزمنة في محافظة المثنى . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري . المجلد (7) : العدد (2). ص: 73-76.

متولي , أحمد مصطفى (2005). الموسوعة الذهبية في إعجاز القران والسنة النبوية . دار ابن الجوزي, القاهرة , ص: 1070-1072 .

محمد , حنان عبد الرضا(2007) . دراسة الفطريات المعزولة من القناة التنفسية لمرضى السرطان واختبار حساسيتها الدوائية تجاه بعض الالدونايترونات المحضرة . رسالة ماجستير , كلية العلوم – جامعة البصرة .

محمود , إيهاب عبد السلام (2013) . تحليل البرنامج الإحصائي SPSS . الطبعة الأولى , دار صفاء للنشر والتوزيع . جامعة بابل . ص:249-205 .

محي الدين , محمد عمر ورقيباء علي جيجان (2013). إنتاج أنزيم POLGALACTYRONASE من عفن *Aspergillus niger* المتحمل للحرارة والمنتجة للأنزيم وتشخيص العزلة الأكثر إنتاجا. مجلة العلوم الزراعية العراقية – العدد1- المجلد 44–ص:97-105 .

الموسوي , منى عبد المطلب يحيى (2006) . الفعالية ضد الجرثومية لمستخلصات بعض النباتات البرية العراقية . رسالة ماجستير ـ كلية التربية ـ جامعة البصرة .

ناجي , وداد , محمد صبري وحسنين خليل (2006) . دراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبياً ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري . مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية . المجلد (12) , العدد (3) .

النوري , أحمد سمير, حسن آغا محمد عصام وهيفاء حواصلي (2009) . كتاب علم العقاقير التطبيقية (القسم العلمي) منشورات جامعة دمشق- كلية الصيدلة . ص: 248.

هميم , سعد سلمان . (2003). فعالية بعض المستخلصات النباتية ضد الممرضات الشائعة في أخماج الجلد الجرثومية . رسالة ماجستير – كلية التربية – جامعة البصرة . ص : 67 .

هيكل , محمد سيد وعمر , عبد الله عبد الرزاق (1998) . النباتات الطبية , كيميائيتها , انتاجها فوائدها , منشأة المعارف بالإسكندرية .

وادي , تماضر حامد (2000) . عزل الفطريات من القناة التنفسية وتشخيصها مع دراسة امراضية والاستجابة المناعية للفطر *Blastomyces dermatitidis* في الفئران المختبرية . رسالة ماجستير , كلية العلوم - جامعة البصرة .

ثانياً: المصادر باللغة الاجنبية :

Adedayo , O.; Anderson , W.; Young , M.; Sncickus , V.; Patil ,P. and Kolawole , D.(2001) . Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower . Pharmacut. Biol., 39:1-5.

Agbetile, J.; Fairs , A.; Desail , D.; Bourne , M.; Mutalithas , K.; Green , H.; Pavord , D.I.; Bradding, P. ; Wardiaw , A.J. and Pashley , C.H. (2012) . Isolation of filamentous fungi from sputum in asthma is associated with reduced post-bronchodilator FEV_1.Blackwell Publishing Ltd. PP:782-791.

Ahmed , I. ; Mehmood,Z . and Mohammad, F.(1998) . Screening of some Indian Medicinal plants for their anti-microbial properties. J. Ethnopharmacole.62: 183-193.

Ahmed , S.M. and Abdelgalei , S.M. (2005) . Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactone from *Costus speciosus* . Int. Agr. Biol., 7:638-642 .

AL-Abid , M.R.(1985). Zur zusammemsertrung der bascule B membrane in phoenix dactilyfra. Wurzburg University. Wurzburg, F.R. of Germany .

AL-Ameri, N.O.(2005). A study of taxonomy Epidemiolory of pulumonary mycotic infectionin Al-Qadisyia Province .Ph.D. Thesis. Cellage of Education-Al-Qadisyia Universi ty. P: 419.

Aledort , J . ; Laxminarayan,R . ; Howard , D . ; Seiguer , E . and Weldon , S . (2000). International Workshop on Antibiotic Resistant : Global Policies and Options . Center for international Development . Harvard University.p: 1 – 22.

Alexopules , C.G.; Mims ,C.W. and Blackwell, M. (1996) . Introductory mycology . 4th . ed. John Wiley & Sons , New York.p:127.

AL-Khazraji , S.M.(1991). Bio pharmacology study of *Artmisia herbaalba*. M.Sc. Thesis, College of Pharmacy. University of Baghdad.p:373.

Allison , L. A.(2008) . Anti. Quorum sensing Agents from south Florida Medicinal plants and their Altenuation of *Pseudomonas aernginosa* pathogenicity – Addissertation submitteo in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of philosophy in Biology . Florida international university Miami , Florida .p: 154 .

AL-Rubiaa , A,M. (2001) . Study of fungi that isolation from respiratory tract of patients attends TB centre & chest diseases in Basrah. Basrah/Iraq . MS.D.thesis .Collegeof Science-University of Basrah .p:163.

Al-saif, M. A. (2009). Beneficial Effects of Rutin and Vitamin C Coadministration in a Streptozotocin-Induced Diabetes Rat Model of Kidney Nephrotoxicity. *Pakistan J.Nutrition*, 8 (6): 745-754.

American Acardemy of Pediatrics. (1998) . Toxic effects of ilndoor Committee on Environmental Health. PEDIATRICS., 101 (4):712-714 .

Anonymous (2007) . The Wealth of India : First Supplement Series (Raw Materials), National Institute of Science Communication and Information Resources , CSIR , Vol2 pp.: 211 - 213 .

Aritharan , V.N.; Meena , V.; Rajakokhila , M. and Nagendra , P.(2012). Antibacterial activity of *Costus speciosus* rhizome extract on some pathogenic bacteria . Internal. J. Adv. Life Sci., Vol.4. pp.: 24-27.

Ashoor, A. and Abu-Baleer, Y. (2002) . Is the Classical Classification of aspergillosis paranasal sinuses to non-invasive and Inasive still valid or not? Bahrain Medical Bull. 24 pp.: 91-94.

Asolkar, L.V.; Kakkar, K. K. and Chakre, O. J. (1992) . Second Supplement to Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles . Part I (A-K). (1965-81). Publications and Informations Directorate (CSIR), New Delhi. 414.

AST , D.A.(2003) . Survey of mycotoxin effects animals , in an area of south west Germany . Mycopathol., 147(1) pp.:49-57 .

Atlas , R.M.(1995). Principles of Microbiology. 1st edition. Mosb-Year Book, Inc. p.:476.

Baddley , J.W.; Pappas , P.G.; Smith , A.C. and Maser , S.A.(2003) . Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. J. Clin. Microbiol., 41(12): 5525-5529.

Baddley, J.W.; Andes. D.R.; Marr, K.A.; Kontoyiannis, D.P. and Alexander, B.D. (2010). Factors associated with mortality in transplant patients with invasive aspergillosis. Clin. Infect. Dis. 50: 1559–1567.

Bancroft , J.D. and Stevens , A.(1982) . Theory and Practice of histological technique. Churchill Living stone , New York. P.:117.

Banerji, R.; Prakash, D.; Patnaik, G. K. and Nigam, S. K. (1982) . Indian Drugs, Indian. J. Pharm.**,** 20(2): pp.:51-4.

Batra, V.; Asmar, B. and Ang, J. Y. (2006). Aspergillosis. E Medicine D:/Medical Mycology/eMedicine-Aspergillosis article by Vandana Batra MD.htm.

Baughman , R.P.(1999) . The lungi and the immunocompromised patient . Infectious complication part 1. Respiration , 66:95-100 .

Bavara , J.H. and Narasimhacharya , A.V.R.L. (2008) . *Phytotherapy Research*. Journal of Med. plants Res., 22(5) pp.: 620-626 .

Bennett , J.E. and Kown-Chung , K.J. (1992) . Medical Mycology . Lea and Febiqer . 745 .

Benson,(2002). Microbiological Applications Lab. Manual. 8th ed., The McGraw-Hill companies, Inc. USA.22-105.

Bhattacharya, S. B.; Parikh, A. K.; Debnath, P. K.; Pandey, V. B and Neogy, N. C. (1972). Anticholinesterase activity of *Costus speciosus* (kemuka) alkaloids. *Jour. Res. Ind. Med*., **8** (1): 178-179.

Bhogaonkar , P.Y.; Devarkar, V.D. and Lande , S.K.(2012) . Physical characterization of Costus speciosus (Koenig Ex Retzi). Smith-A well Known Ayurvedic Drugplant published on : 1th Nov. ISSN: 2277-4297 .

Binny K. ; Sunil Kumar G. and Dennis Thomas (2010) . J. Basic and Cin. Pharm., 1(3) pp.: 177-181.

Binstock , M. (2007) . Molecular Biology techniques for identifying dermatophytes and their possible use in diagnosing onychomycosis in human toenail. J Am Podiatr Med Assoc , 97(2): 134-144.

Bommakant , A.S. and Waliyar , F.(2002) . *Aspergillus* and Aflatoxin in groundnuts , Carcinogen. J., 124 pp.: 535-545 .

Brillowska-Dabrowska , A.; Saunte , D.M. and Arendrup , M.C. (2007). Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol., 45(4): 1200-1204 .

Casadevall , A.J.; Steenberger Y. and Nosane chuk , D.J.(2003). Read made Virulence and dualuse virulence factors in pathogenic environmental fungi paradigom Curr. Opin. Microbiol. 16:332-337.

Chakraborty ,G.S.(2009) . Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. J. Med. plants Res., 43(1) pp.: 96-98 .

Cho, S.H.; Seo, S.C.; Schmechel, D.; A. Grinshpun, S. and Reponen, T. (2005) . Aerodynamic characteristics and respiratory deposition of fungal fragments Atmospheric Environment . J. Hosp. Infect., 39:5454-5465 .

Choudhury, N.; Kalita J.C. and Haque A.(2012) . Effect of *Costus speciosus* (Koen) on Reproduction organs of Female Albino Mice .Choudhury Najma .ISSN :2230-8407 .

Cooney, N.M. and Klein, B.S. (2008). Fungal adaptation to the mammalian host: it is a new world, after all. Curr. Opin. Microbiol., 11 . pp.: 511–516.

Crameri , R.(1999) . Epidemiology and molecular basis involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic disease contribution . Microbiol., pp. : 44-56 .

Croopman , A.M.; Stevan , M.A.; and Cole M.N. (2003) . A study about effect of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* in chiken . Journal. Med.5-12.

Cruz , G.L.(1965) . Liver verde das plantes medicinaise industriais do Brasil. Belo Horizonte. Velloso S.A.pp.:44-49.

Curtis, L.; Cali ,S.; Conroy, L.; Baker, K.; Hershow, R.; Norlock-Cruz, F. and Scheff ,P. (2005). *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital . J. Hosp. Infect. 59:188-196.

Daisy , P. ; Eliza , J. and Ignacimuthu , S.(2009) . Chemical-Biological Interactions . J. Med. plants Res.,182(1) : 67-72 .

Daniyan , S.Y.; Galadima , M.; Ijah , U.J.J.; Odama , L.E.; Yusuf , A.Y. and Abbas , Y.(2010) . In vitro antimicrobial screening of *Piliostigma thonningii* (shum).milne-red head leaves extracts aganst clinical isplation of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphyllococcus aureus.*International Journal of Pure and Applied Sciences . 4(1):88-94.

Das , K.; Tiwari , R.K.S. and Shrivastava , D.K.(2010) . Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research . 4(2):104-111.

Das Anudwipa , D ;Zaman , K; and singh , V. A. (2008) . Potential of Ethanolic extract of *Callistemon linearis* Dc leaf : Pharmacology, 1 : 15 – 21.

De-Hoog , G.S.; Guarro , J. and Figueras ,M.J.(2000) .Atlas of clinical fungi 2nd ed. Vol. 1. Centraalbureau voor Schimmel cultures . Utrecht. The Netherlands .

Denis , M.; Gujian , L.; Widmer and Contin , A.(1994) . Amouse mold of lung injury induced by microbial product : Implication of tumor necrosis factor . Am. J. Res. Cell Mol. Biol., 10: 658-664.

Denning , D.; Odriscoll , B.; Hoga-boam , C.; Bowyer , P. and Niven , R.(2006) . The link between fungi and severe asthma : a summary of the evidence . Eur Respir. J. 27: 615-626.

Denning , D.W.(2001) . Chronic forms of pulmony aspergillosis . Clin. Microbiol. Infect. 7(2):25-31.

Denning , D.W.(2003). Echinocandin antifungal drugs . Lancet, 362: 1142-51.

Devi, V. and Urooj, A. (2010). Nutritive profile and antioxidant components of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. and *Costus igneus* Nak. *Ind. J. Nat. Prod. Resour.*, 1: 116-118.

Diaz , C.S. and Lopez , A.V.(2004) . Pulmonary Aspergillosis .Arch. Bronconeumol., 40:114 – 122.

Diba, K.; Kordbacheh, P.; Mirhendi, S.H.; Rezaie, S. and Mahmoudi, M. (2007) . Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pak. J. Med. Sci., 23(6): 867-872.

Dixit , V.; Schaff , E; Pyle , R.; Collins , G.; Saktivel , S.; Palaniappan . R.; Lillard , J. and Taub , D.(2004) . Ghrelin inhibits leptin and activation induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cell . J. Clin Invest., 114 (1): 54-66.

Dominguez , M. H. and Gaytan , G.S. (2001) . Hepatocellular carcinoma : an update. Ultrastruct. Pathol. 25: 497 .

Dutt, N.K.; Sastry, M.S. and Tamhane, R.G., (1960): Pharmacological actions of an alkaloidal fraction isolated from *Saussurea lappa* (Clarke) Indian. J. pharm.,P:22:6-7.

Ellis , D.(2007) . An introduction to medical mycology . Mycology Unit, Womens and Chidrens Hospital, Adelaide .

Ellis , D.; Davis , S.; Alexiou, H.; Hondke , R. and Bartley , R. (2007). DESCRIPTIONS OF MEDICAL FUNGI second edition . University of Adelaide . AUSTALIA:p. 204.

Ellis , D.H. (1994). Clinical Mycology : The human opportunistic mycosis. Gillingham . Printers pty. Ltd . Australia . p.166.

EL-Mehalawy , A.A. (2006). Effect of antifungal on physiology activity of some plant pathogenic fungi . The Internet Journal of Microbiology.

Engelhart , S.; Loock , A.; Skutlarek , D.; Sagunski , H.; Lommel . A.; Farber , H. and Exer , M.(2002) . Occurrence of Toxigenic *Aspergillus versicolor* Isolates and Sterigmatocystin in Carpet Dust from Damp Indoor Environments. Applied and Environ. Microbiol., 68(8): 3886 – 3890 .

Erjavec, Z.; Kluin-Nelemans, H. and Verweij, P.E.(2009).Trends in invasive fungal infections, with emphasis on invasive aspergillosis. Clin Microbiol Infect 15:625–633.

Espinel – Ingroff ,A.;Bartlett ,M.; Bowden, R.;Chen, N.X.; Cooper,C. ;Fothergill, A.; Mcginninnis ,M. R. ; Menezes , P.; Messer, S.A. ;Nelson ,P.W. ;Odds ,F.C.; Pasarell,L.; Peter, J.; Paflller,M.A.; Rex,J.H.; Rinaldi ,M.G.; Shanklad ,G.S.; Walsh,T.J. and Weitzman ,I. (1997) Spectrophotometric method of inoculum preparation .*American Society for Microbio Microbiology*.

Finegold , S.M. and Martin , W.J.(1982) . Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 6th ed. The C.V. Mosby Company, U.S.A.

Follett, S.A. ; Moody, A. and Denning , D.W. (2011) . Detection of Aspergillus in lung and other tissus samples using the MycAssay Aspergillus real-time PCR kit. Can. J. Microbiol. 57:765-768.

Franquet, T.; Muller , N.L.; Gimenez , A.; Domingo , P.; Plaza , V. and Bordes , R. (2000) . Semi invasive pulmonary aspergillus in chronic obstructive pulmonary disease : radiologic and pathologic finding in nine patients. A.J.R. Am. J. Roentgenol., 174:51.

Garbino,J.(2005).Aspergillosis .Pha.net.patho.GB.UK.

Gayatri , N. and Rajani , K.(2011) . Free Radical Scavenging Activity of rhizome of *Costus speciosus* (Koen) .ISSN:2249-6807 .

Gazzoni , F.F.; Hochhegger , B.; Severo , G. and Camargo , J.J.(2013). *Aspergillus fumigatus* fungus ball in the native lung after single lung transplantation. J. bras. pneumol. vol.39 no.(3): 1806-3713.

Geiser, D.; Klich, M.; Frisvad, J.; Peterson, S.; Varga, J., and Samson, R. (2007) . The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59: 1-10.

Goodman , H. and Gilman`s , D.(2001): The Pharmacological Basis of Therapeutics.10th ed. Joel, G.; Hardman LEE E. Limbered, New york,P:1295-1299.

Gorny , R.L.; Reponen , T.; Willeke , K.; Schmechel , D.; Robine , E.; Boissier , M. and Grinshpun, A.S.(2002) . Fungal fragments as indoor air bio contaminants . Appl. and Enviroal. Microbiol. , 68(7) : 3522-3531 .

Green, W. D.; Slack, R. C. B. and Peather, J. F. (2002) Medical microbiology. Edition12th, Churchill living stone. 60 :568-588.

Greenberger ,P.A.(2002). Allergic bronchopul-monary aspergillosis. J Allergy Clin. Immunol.92: 110-685.

Gupta , R.K.(2010) . Medicinal and Aromatic Plants , CBS Publishers and Distributors , Journal of Medicinal plants Research .p 234-499 .

Guthrie, D. W. and Guthrie, R. A. (2009)." Management of Diabetes Mellitus". 6 th . Springer Publishing Company, New York . 524.

Habsah, M.; Amran, M.; Mackeen, M.M.; Lajis, N.H.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N.; Rahman, A.A.; Ghafar, and Ali, A.M., (2007): Screening of Zingiberaceae extracts for antimicrobial and antioxidant activities. J.Ethnopharmacology,72:403-410.

Handa , S.S. ; Khanuja , S.P. ; Longo , G. and Rakesh , D.D. (2008) . Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants . International centre for science and high technology , Trieste : 21-25.

Harborne, J.B. (1984). Textbook of Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis, 2nd ed. p. 196-197. Chapman and Hall, London, New York.

Hmawndi, Nahla Jawhar Kareem. (2006). Antifungal activities of extracts of some plants grown naturally in Kurdistan. Thesis of agriculture science . University of Sulaimania

Houbraken, J.; Varga, J.; Rico-Munoz, E.; Johnson, S.; and Samson, R. (2008). Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssochlamy spectabilis* (anamorph: *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1613-1619.

Howard , B.J.; Keiser , J.F. and Weissfeld , A.S. (1994) . Clinical & Pathogenic microbiology. 2nd ed. St. Louis, Mosby-year book, Inc.

Huang , S.W. (2007) . Mold allergy . eMedicine .

Hube ,B.; Monod ,M.; Sanglard , D. and Odds ,F. (1998). Functional aspects of secreted *Candida* proteinase . *M.N.G. James*., P: 339-344.

Ines , F.M.; Almedia , H.M.; Lourdesdes , M.; Sara, M.O.; Santos , M.S.; Freitas , J.M. and Fernanado , M.A. (2011). Mycobiota and aflatoxin BI in feed for framed sea Bass (*Bicentraarechns Labrax*) .

Infer , G.O.(2000) . Lymphocyte membrane protein glycosylation : apossible cause of lowered immune competence in diabetic subject . Diab. Inter. 10:14-15.

Islam , A.; Jfa . M.K.;Alam , M.B. and Hossain, M.S.(2010) . In vitro Antioxidant and Cytotoxic potential of Costus speciosus (Koen.) smith rhizome . IJPSR. Vol. 1(10):138-144.

Islam, L.; Nabi, A.; Ahmed, K. and Sultana, N.(2002). Endotoxins of enteric pathogens are chemotactic factor of human neutrophils. J. Biochem. Mol. Biol., 35 (5): 482-487.

Jaffar, W.N (1998). Pulmonary mycotic infection in Babylon province. Ph.D. thesis. Babylon Univ., Collage of science .

Jaffer , H. J. ; Mahumd, M.J.; Jawed , A.M.; Naji , A. & AL-Naib,A. (1983). Phytochemical & Biological screening of some Iraqi plants . fitoterapia, LIX. p: 229.

Jinantana, J. and Sariah. M. (1997). Antagonistic effect of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* or *Sclerotium rolfsii* . pertanika ,J. Tropical Agriculture science. 20: 38-41.

Joji, R. and Benna, J.(2010). *Evaluation of antibacterial activity of the leaf essential oil of costus pictus d. Don.* From south india. Int J Curr Pharm Res. 2, 68-70.

Jombo, G. T. ; Banwat, E. B. and Gyoh, S. K.(2010). Pulmonary and extra pulmonary manifestations of aspergillosis in clinical practice and potential challenges in management: An analysis of literature review. Journal of Clinical Medicine and Research Vol. 2(11): 185-193.

Kato , T.; Ikuji, U.; Hiroki, M,; Mashiro, G.; Masayoshi, H. and Atsushi , N.(2002) . Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in pneumoconiosis. Clinical and radiologic findings in 10 patients. Chest, 121: 118-127 .

Kawamura, S.; Macsaki , S.; Tomono, K.; Tashiro , T. and Kohno, S. (2000). Clinical evaluation of patients with Aspergilloma, Int. Med. 39:209-212.

Kelmanson , J.E.,Jager , A.K. and Staden , J.V. Zulu(2000) . Medicinal plants with antibacterial activity . J.Ethnopharmcol. 69 : 241-246.

Khurana , S.(2002) . Pulmonary Aspergillosis , Part 1: Allergic disease and mycetomas . The IEQ Review , 2 (53) .

Kim,D.H.; Kim,S.H.; Kim,S.O.; Kim, S.J. and Hong, S.B. (2009). Re identification of *Aspergillus* spp. isolated from clinical specimens of

patients suspected as pulmonary aspergillosis in korea. Korean J. Med. Mycol. 14(3): 133-144.

Kirtikar, K. R. and Basu, B.D. (1987) . Indian Medicinal Plants. Internat. Book Distributors, Dehra Dun. 2444-2449.

Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. 1st ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.

Knutsen , A.P.; Noyes, B. and Warrier, M.R. (2005). Allergic bronchopulmonary aspergillosis in a patient with cystic fibrosis: diagnostic criteria when the IgE level is less than 500 IU/mL. Ann Allergy Asthma Immunol;95(5):488–93.

Koul ,A. C.; Jessup ,J.; Deluca ,D.J.; Elnicky ,C.J.; Nunez ,M.; Washburn ,R.G. and Ghannoum ,M.A.(1998).Ability of eight strains of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* to produce phospholipase .*Am.Soc.Microbiol.*,4: 78-83.

Kousha, M. ; Tadi, R. and Soubani, A.O.(2011). Pulmonary aspergillosis: a clinical review. Eur. Respir. Rev. 20(121):156-74.

Krebs, C.J. (1978). Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance. Harper and Row Publisher, New York.

Kurhade , A.M; Deshmukh , J.M.; Fule , R. P.; Chade , C. and Akulwar , S.(2002) . Mycology and Serological study of Pulmonary Aspergillosis in central India. Indian Journal of Medical Micrology.20(3): 141-144.

Lai, C.; Liaw,S.; Lee,L.; Hsiao,C.; Yu,C.; Hsueh,P., (2007): Invasive pulmonary aspergillosis: high incidence of disseminated intravascular coagulation in fatal cases, Infection and Immunity,P:141-147.

Larone , D.H.(1995) . Medically Important Fungi – A Guide to Identification . 3rd ed. ASM Press, Washington , D.C.

Larone , D.H.(2002) . Medically Important Fungi – A Guide to Identification , 4th ed . ASM.Washington , D.C.

Latge , Jean-Paul . (1999) . *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis . Clinical microbiology reviews . 310 – 350 .

Lei , G.; Dan, H.; Jinhua , L.; Wei , Y. ; Song, G. and Li , W.(2011) . Berberine and Itraconazole Are not Synergistic in Vitro against Aspergillus fumigatus Isolatin from Clinical Patients. Molecules, doi. 10(16):9218-9233.

Leipner, J. and Saller, R. (2000).Systemic enzyme therapy in oncology:effect and mode of action.drugs 59,no.4:769-780.

Leonar, R.E. C.& Rocio, O. (2011). Malaurtiration and Gastrointestestional and Respiratory Infection in children : Apublic healthy problem. 1174-1205.

Lerner , P.I. (1996) . Nocardiosis . Clin. Infect. Dis., 22 : 891-905 .

Leroux , P. ; Chapeland , F. ; Desbrosses , D. and Gredt , M.(1999) . Patterns of cross- resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* isolation from French vineyards. Crop protect., Journal of Medicinal plants Research .18, 10:687-697.

Logothetic ,M.; Tseleni, A.; Arseenis, G. and Legakis , N. (2009). Multiplex PCR for the discriminatioation of *A. fumigatus* , *A. flavus* ,*A. niger* and *A. terreus*. Journal of Micobiologgical methods . 79;209-211.

Majumder , L.; Khalil , I.; Alam , K. and Munshi , M.K. (2010). Citric Acid Production by *Aspergillus niger* Using Molasses and Pumpkin as Substrates. European Journal of Biological Sciences. 2 (1): 01-08.

Manorama, S.; Srikanth1, V. S. and Sindhu S.(2013). Antimicrobial activity and optimization of callus induction of *Costus speciosus* liebm. . AN INSULIN PLANT . ISSN ;Volume. 2, Issue 2, 650-657.

Marin , D.E.; Taranu , I.; Bunaciu , P.R.; Pascale , F.; Tudor , D.S.; Avram , N.; Sarca , M.; Cureu, I.;Criste , R.D.;Suta,V. and Oswald , I.P.(2002). Changes in performance , blood parameters , human and cellular

immune response in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin .J. Anim.Sci.80:1250-1257.

McGinnis , M.R. (1980) . Laboratory Hand book of Medical Mycology. Academic press , New York , 661 .

Meletiadis , J.; Meis, J.F.; Mouton , J.W.; Rodriquez-Tudela , J.L.; Verweij , P.E and Donnelly , J.P.(2002) . In vitro activities of new and conventional antifungal agents clinical *Scedosporiumi* Isolates . *Antimicrob. Agents. Chemotherapy*., 49:62-68 .

Messer, S.A.; Jones, R.N.; Moet, G.J.; Kirby, J.T. and Castanheira, M.(2008).Potency of anidulafungin compared to nine other antifungal agents tested against *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.: results from the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Journal of clinical microbiology;48(8):2984-7.

Meyer,E. and Walther,A.(1988).Methods for the estimation of protein,Lipid , carbohydrate and chitin in fresh water invertebrates. J. Arch. Hydrobiology.13:161-177.

Miorin , P.L.; Junior, N.C.; Custodia, A.R.; Brezt, W.A. and Marcucci , M.C.(2002) . Antibacterial activity of honey and porpoise from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustulu* against *Staphylococcus aureus*. J. App. Microbial., 95:112-114.

Mitcher , L.A.; Leu , R.; Bathala , M.S.; Wu, W.N. ; Beal, J.L. and White , R.(1972) . Antimicrobials agents from higher plants1 lioydia. J. Anim.Sci. 35: 157-166.

Mondon , P.; Dechamps , C. Dodille ,A. and Grillot , R.(1996) . Variation in virulence of invasive pulomonary Aspergillosis. Journal of Medical Micrology.45:186-91.

Moreira , I.C.; Lago , H.G.; Young , M.C.M. and Roque , N.F.(2003) . Antifungal Aromadendrane Sesqiuterpenoids from the Leaves of *Costus speciosus*. J. Braz Soc. 14:828-831.

Moreno , A.; Perez-Elias , M.; Casado , J.; Navas , E.; Pintado , V.; Fortun , J. and Querrero , A. (2000) . Areole of antiretroviral therapy in long-term survival of patients with AID-related pulmonary Aspergillosis Eur.J.Clin.Microbiol. Infect. Dis. 19(9):688-693.

Moris , D.V.; Melhem , M.S.; Martins , M.A. and Mendes , R.(2008). Oral *Candidia* spp. Colonization in human immunodeficiency virus-infection individuals J. Venom. Anim. Toxins. Inf. Trop. Dis., 14:1678-1999.

Mostert , L.; Denman , S. and Crous, P. (2000) . In vitro screening of fungicides against *Phompsis viticola* and *Diaporthe perjuncta* South African .J. of Ecology and Viticulture, 21,2 , 62-65.

Nandhakumar, J.; Sethumati P. P.; Malini, A.; Sengottuvelu, S.; Duraisamy, R.; Karthikevan , D. and Sivakumar, T. (2007). Anti- diabetic Activity of Methanol Leaf Extract of Costus pictus D.DON in Alloxan – induced Diabetic Rats, Journal of health Sciece . 53,6: 655-663 .

Ncube , N.S.; Afolayan , A.J. and Okoh, A.I.(2008) . Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends . African Journal of Biotechnology. 7(12): 1797-1809.

Neerman , M.F.(2003) . Sesquiterpene lactones : adiverse class of compounds founds in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties.13:114-120.

Neeta, A. and Abhishek, T. (2006). Fungi toxicity of the essential oil of Citrus sinensis on post-harvest pathogens. Nickel accumulation and nickel oxalate precipitation by Aspergillus niger. Appl Microbiol Biotechnol 59 : 583-588

Nikhal , S.B.; Dambe , P.A.; Ghongade , D.B. and Goupale ,D.C. (2010). Hydroalcohlic extraction of Mangifera indica by Soxhletion . Internation Journal of Pharmaceutical Sciences ; 2(1):30-32.

Nitin, V. and Khosa ,R.L.(2012) . Development of standardization parameters of *Costus speciosus* rhizomes with special reference to its pharmacognostical and HPTLC studies. APJTB ;250-103.

Okigbo , R.N.; Anuagasi , C.L. and Amadi , J.E.(2009) . Andvances in selected medicinal and aromatic plants indigenous to Africa . Journal of Medicinal plants Research . 3(2):86-95 .

Olempska-Beer , Z.S.; Merker , R.I.; Ditto , M.D. and Dinovi, M.J. (2006) . Food – processing enzymes from recombinant microorganisms- a review . Regul. Toxicol. Pharmacol. 45: 144-158.

Otrero, R.; Nunez, V.; Jimenez, S.L.; Fonnegra, R.; Osorio, R.G.; Carcia, M.E. and Diaz, A., (2000): Snakebites and ethno botany in the northwest region of Colombia, Part Neutralization of lethal and enzymatic effects of Bothrops atrox venom. J.Ethnopharmacology,71:505-511.

Pabuccuoglu,G.(2005).Oxalosis associated with aspergillosis .Patho.Respract .201(5): 363-8.Turkey.

Panda , T.; Panda, P. and MISHRA , N.(2009). Seasonal incidence of airborne fungi in coastal belt of Orissa .*J.Hum. Ecol.,* 26(30): 205-207.

Panda, S.; Tahiliani, P. and Ker, A. (1999). Inhibition of triiodothyronine production by Fenugreek seed extract in mice and rats. Pharmacol. Res. 40: 405-409. Abstract.

Paoletti , M. and Saupe , S.J. (2008) . The genome sequence of *Podospora anserine* , a classical model fungus . Genome Biology, 9:223 doi: 10.1186/gb-2008-9-5-223.

Papiy , M. (2005) . Pharmacological and toxicological studies of some mycotoxins in animals . J. Med. Vol. 44, No.78 .

Parekh, J. and Chanda, S. (2008). In vitro antifungal activity of methanol extracts of some Indian medicinal plants against pathogenic yeast and molds., J. Biotechnology, 23:4349 – 4353.

Patterson , T. F. (2003). Aspergillosis Chapter 14 In: Clinical Mycology . Ed. W.E. Dismukes, P.G. Pappas and J.D.Sobel. Exford University Press. PP.519.

Pawlinski , R.; Pederson , B. and Mackman , N. (2003) . Role of the tissue factor thrombin pathway in endotoxemia. J. Thrombosis Heamostasis , 1:116-127.

Perfect, J. R.; Cox, G.M.;Lee,J. Y.; Kauffman, C. A.;De Repentigny , L.; Chapman , S.W.; Morrison , V.A.; Pappas , P.; Hiemenz , J.W. and Stevens , D.A. (2001) . The impact of culture isolation of Aspergillus species : A hospital-based survey of Aspergillosis . Clin. Infect. Dis. 33: 1824-1833.

Petit, P.; Sauvaire, Y.; Hillaire-buys, D.; Leconte, O.M.; Baissac, Y.; Ponsin, G. and Ribes, G. (1995). Steroid saponins from fenugreek seeds Extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. Steroids. 60: 674-680.

Pinto, M. M. ; Gencale, E.; Rossi, M. H.; Felicio, J. D.; Medina, C. S.; Fernandes , M. J. B. and, Simoni, I. C. (2001). Study of some plant oils effect on *Aspergillus flavus* L. growth on corn. Brazilian Journal of Microbiology. 32 - 127.

Pitt , J.I. and Hocking, A.D. (1997) . Fungi and food Spoilage. Blackie Academic professional. 366-368.

Platel, K.; Srinivasan, K. and Platel, K.(1997). Plant Foods in the management of Diabetes Mellitus vegetables as potential hypoglycamia agents. Nahrung. 41(2): 68-76.

Prescott, C.M.; Harley, J.P. and Klein ,D.A.(2005). Micobiology . 6th edn ., Mcgraw-Hill Companies., U.S.A. 924.

Pryor , B.M. and Michailides , T.J.(2002) .Morphological , pathogenic and molecular characterization of *Alternaria* islation associated with *Alternaria* late blight of Pistachio . Phytopathology. 92(4): 406-416.

Quinn, P.J.; Carter . M.G.; markey , B. and Carter , G.R.(2002). Clinical Veterinary. Microbiology, M. Wlof, London .

Quist , C.F.; BounousD.I.;Kilburn , J.V.; Nettles , V.F. and Wyatt R.D. (2000). The effect of dietary aflatoxin on wiid turkey poults. J. Wildlife Dis., 36(3):436-444.

Ramzi , S.S. ;Vinay , K. and Tucher , C. (1999) . Pathologic bases of disease . Sixth edition , Vol. 1.

Rastogi , R.P. and Medrotra B.N. (2004) . Compendium of Indian Medicinal plants , Central Drug Research Institute , Lucknow and National Institute of Science Communication and Information Researces , New Delhi , Vol 4 , p224-225 .

Rath, S.T.; Mishra, R. and Das, B.K.(1999).Management of Raktavata vis-à-vis arterial hypertension with Brahmyadi Ghana vati. J.Research in Ayurveda and Siddha,20:29-46.

Ravinder, R.; Rao, L. V. and Ravindra, P. (2003): Studies *Aspergillus oryzae* mutants for the production of single cell proteins from deviled rice bran. Food Technol. Biotechnol., 41(3) : 243-246

Rivera , C.;Tcharmatchi, M.; Mendoza,L. and Smith , C. (2003). Endotoxemia and hepatic injury in arodant model of hindlimb unloading.J. App. Physiol.,95:1656-1663.

Roeder ,A.C.;Kirching , R.A.Q.; Pupec , M.; Schaller and Korting H.C.(2004). Toll-Like receptors and innate antifungal respone trends

microbial , 12: 44-49 , Eukaryotic cell. J.Am.S. Microbiology , 3(5): 1097-1075 .

Ross R; Yuan J.M. and Y, U. M. (1992). urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatoculllarur carcinoma lancet; 339: 943-6.

Salvo, A.(2004) . Course: Medical Microbiology(MBIM 650/720)- Fall 2004 Lectures 74-78 Topic: Mycology.Faculty:Dr. Arthur Di Salvo .:142-155.

Sambrook, J.; Fritsh, E.F., and Maniatis, (1989) . Molecular cloning, laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.

Samson , R.A. and Pitt , J.I. (1990) . Systematics *Penicillium* and *Aspergillus* past present and her. In Modern Concepts in *Penicillum* and *Aspergillus* Classification , eds R.A. Samson and J.I. New York: Plenum Plress.3-13.

Samson, R.A.(1994). Current systematics of the genus *Aspergillus.*In the genus *Aspergillus* . From Taxonomy and to industrial Application . Plenum press, London ; 261-279.

Saraf , A. (2010) . Phytochemical and Antimicrobial Studies of Medicinal Plant *Costus speciosus* (Koen) . ISSN:0973-4945;CODEN ECJHAO. 7:405-413.

Sastry, M.S. and Dutta, N.K. (1961): A method for preparing tincture Saussurea.Indian Journal of Pharmacy 23:247–249.

Scheuer , P. and Chalk , B.(1986) . Clinical tests Histopathology . Wolf medical publication. Ltd. The Netherlands .

Seltzer . J. and Fedoruk , M.(2007) . Health effects of mold in children . Pediater. Clin. North Am. 54(2) : 309-333.

Shatha , A.S. and Akbal , K.J.(2010) . Histopathological and enzymatic study on the effect of *Aspergillus fumigatus* in mice .Fac Med Baghdad , Vol. 52(4): 480-483.

Shekawat , P.S. and Prasada ,R . (1971) . Antifungal properties of some plant extracts .Inhibition of spore germination.,J. Indian phytopathol., 24: 800-803.

Shihata , I.M.(1951) . A pharmacological study of *Anagallis arvensis* M.D. Vet Thesis Cairo University (cited by Al-tamimi , 1998 in Arabic).

Shuster , E.; Dunn-Coleman , N.; Frisvad , J.C. and Van Dijck , P.W.M.,(2002) . One the safety of *Aspergillus niger* a review . Applied Microbiology and Biotechnology . 59(4-5) , 426-435.

Singh , U.B.; Srivastava , B.P.; Singh , K.P. and Pandey , V.B.(1992) . Naturalia(Sao Paulo) . Journal of Medicinal plants Research. 17,71-77 .

Sivarajan, V. V. and Balachandran, I. (1994). Ayurvedic drugs and their Plant Sources. Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. 570.

Soubain , A.O. and Chandrasekar , P.H.(2002).The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis .Chest, 121:1966-99 .

Srivastava , S. ; Singh , P.; Mishra , G.; Jha K.K. and Khosa R.L. (2011) . *Costus speciosus* (Keukand) :A review .Pelagia Research Library, ISSN:0976-8688.

Srivastava , S. and Kediyal , U.K.(1984).Effect of fen extracts on conidial germination and germ tube growth of tow pathogenic fungi . Indian phytopathology.,137: 561-563.

Steinbach ,W.J. and Stevens, D.A.(2003). Review of newer antifungal and immunomodulatory strategies for invasive aspergillosis. Clin Infect Dis.37(Suppl 3): S157–S187.

Suhonen , R.E.; Dawber , R.B. and Ellis , D.H.(1999). Fungal in infection of the Skin and Nails. Martin Dunitt Ltd. London:1082.

Talamine , R. and Levi , F.(2002) . Fried food : a risk factor for laryngeal Cancer, Medical Hypothesis , 9(87):1230-1302.

Tekaia, F. and Latge, J.P. (2005), "*Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen?" *Curr. Opi. Microbio,* Vol. 8: 385–392.

Tewari, P. V. ; Chaturvedi, C. and Pandey, V. B. (1973) . Compendium of Indian Medicinal plants. Indian Journal of Pharmacy, , 35(1): 35-6.

Thakare , M.(2004). Pharmacological Screening of Some Medicinal plants As Antimicrobial And Feed Additive . Virginia Polytechnic Institute and state University. Blacksbury , Virginia U.S.A.:1-14.

Thobunluepop , P.; Jatistiener, C.; Jatistutienr, A.; Pawelzik ,E. and Verasilp, S. (2007) In Vitro screening of the antifungal activity of extract as fungicides against pathogenic seedborn fungi . Tropentag, October 9-11. Witzenhausen, (C.F. www.tropentag de 2007 / adstracttsk Links) .

Thrusfield, M.(1986). Veterinary epidemiology, Butterworth & Co.Ltd, London . Journal of Medicinal plants Research. 7(3):343-345 .

Torres , A.; Ewig , S. and Insausti , J.(2000) . Etiology and microbial patterns of pulmonary infiltrates in patients with orthotropic liver transplantation . Chest, 117 : 494-502 .

Tortora,G.J.;Funke,B.R.&Case,Ch.L.(2002).Microbiology AnIntroduction.7th ed., Benjamin Cummings,Sanfrancisco.Boston New york.

Vacca , L. (1985). Laboratory manual of Histochemistry. Raven PRESS. New York.328p.

Vaidya , A.B. and Antarkar , V.D.S.(1994) . New drugs from medicinal plants Opportunities and approaches. J. Assoc. Physicians India. Vol. 42:221-8.

Vazques , J.A. and Sobel , J.D.(2004) . Mucosal Aspergillosis . Infect. Dis. Clin. N. Am. 16: 793-820 .

Veeramuthu, D.; Naif A.; Savarimuthu L. and Chinnasamy M. (2012) . Antimicrobial activity of sesquiterpene lactones isolation from traditional medicinal plant, *Costus speciosus* (Koen) . 1472-6882 .

Verma , N. and Khosa , R.L. (2009) . Effect of *Costus speciosus and Wedelia chinensis* on Brain Neurotransmitters and Enzyme Monoamine Oxidase Following Cold Immobilization StressJournal of Pharmaceutical Sciences and Research .1(2) , 22-25 .

Vigayalakshim, M.A. and Sarada, N.C., (2008): Screening of *Costus speciosus* extracts for antioxidant activity. Fitoterapia 79:197–198.

Vijayalakshmi , A. and Sarada , N.C.(2008) . *Fitoterapia* . Journal of Medicinal plants Research . 79 (3):197-198 .

Vishalakshi , D. and Asna , U.(2010) . Nutrient profile and antioxidant components of *Costus speciosus* Sm. and *Costus igneus* Nak. Indian Journal of Natural Products and Resources. Vol.1(1):116-118.

Warrier, P. K.; Nambiar, V. P. K. and Ramankutty, C. (1994) . Indian Medicinal Plants. Vol.1-5. Orient Longman Ltd., Madras.

Winks , M. and Schimmer , O.(1999) . Modes of action of defensive secondary metabolites . Function of plant secondary Metabolites SMs and their exploithation in biotechnology. Annual Plant Reviews . 17-133. Sheffield Academic press , Sheffield

Woldmichael ,G.M.;Wachter, G.;Singh, M.P.; Maiese, W.M. and Timmerman, B.N.(2003) .Antibacterial diterpenes from Calceolaria pin folia. J. Nat. Pro. 66: 242-246.

Woynarowski , J.M.; Napier , C.; Koester, S.; Chen, S.F.; Troyer, D.; Chapmen , W. and Macdonald, J.R.(1997) . Effects on DNA integrity and apoptosis induction by a novel antitumor sesquiterpepe drug, 6-hydroxymrthylacyfulvene (HMAF , MGI 114). Biochem Pharmacol , 54:1181-1193.

Xian-guo , H. and Urasella , M.(1994) . Antifungal compound from *Solanum nigrum* . Journal of Ethnopharm. 43: 173-177.

Yosikawa , T.; Murakami , M.;Seto, O.; Kakimi, Y.; Takemura , T. ; Tanigawa , H. and Kondo, M.(1994) . Change in tissue antioxidant enzyme activites and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure. Circ. Shock, 42:53-58.

Yuan, G.F.; Liu, C.S. and Chen, C.C.(1995) . Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplificationof polymorphic DNA. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2384-2387.

الملحق (1) : العدة المستعملة في استخلاص الحمض النووي DNA

اسم العدة	المكونات	الشركة وبلد المنشأ
عدة استخلاص الحمض النووي EZ-10 Spin Colum Fungal Genomic DNA Mini-Preps Kit	Universal Digestion Buffer 12 ml	BIO BASIC INC. (South Korea)
	Universal Buffer PE 6 ml	
	Universal Buffer BD 12 ml	
	Universal PW Solution (concentrate) 18 ml	
	Universal Wash Solution (concentrate) 7.5 ml	
	TE Buffer 10 ml	
	Proteinase K (10mg/ml) 1.2 ml	
	2.0 ml Collection Tube 50 pcs	
	EZ-10 Column 50 pcs	

الملحق (2) العدة المستعملة في تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المفرد (Monoplex Single PCR)

اسم العدة	المكونات	الشركة وبلد المنشأ
عدة مزيج تفاعل إنزيم البلمرة AccuPower® PCR PreMix	Taq DNA polymerase 0.05 U	Bioneer (South Korea)
	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) each: 0.4µM	
	Tris-HCl (pH 8) 30mM	

	MgCl2 4 mM	
	Stabilizer &tracking dye	
	Stander 96 PCR tubes	

الملحق (3) : أعداد الفطريات المعزولة من قشع مرضى الاخماج الرئوية ونسبة ظهورها .

الاجناس الفطرية	عدد العزلات	النسبة المئوية للتردد (%)
Candidia spp.	109	%28.60
Aspergillus spp.	107	%28.08
Penicillium spp.	98	%25.70
Rhizopus spp	13	%3.41
Paracoccidioides sp.	8	%2.09
Geotricum sp.	7	%1.83
Fusarium spp.	5	%1.31
Mucor spp.	6	%1.60
Alternaria spp..	5	%1.31
Cladosporium sp.	2	%0.52
Yeasts spp.	11	%2.89
Molds spp.	8	%2.09
المجموع الكلي لعزلات الفطرية	381	%100.0

قيمة مربع كاي =(23.89)

ملحق(٤) : الصفات الزرعية والمجهرية لأنواع جنس *Aspergillus* المعزولة على الاوساط التفريقية .

الأنواع	الصفات المظهرية كما تبدو على وسط CZA & MEA	الصفات المجهرية كما تبدو تحت المجهر

Aspergillus fumigatus	ظهرت المستعمرات النامية على وسط CZA بلون أخضر مزرق غامق وقوام زغبي - قذيفي يشبه سطحها الجلد اوالقماش المزأبر, بقطر90 ملم . بينما على وسط MEA تشبه تلك المستعمرات النامية على وسط CZA لكن بشكل أقل كثافة وبلون باهت . سطح السفلي للطبق يبدو رمادي باهت .	الحوامل الكونيدية قصيرة ناعمة الجدران تنتهي بحويصلة مخروطية الشكل وتترتب عليها الفياليدات Strigmata بشكل نصف دائري . الكونيدات تنتج بتعاقب قاعدي مكونة سلاسل طويلة من الكونيدات الكروية ذات قطر 3-2.5 مايكرون .
Aspergillus niger	ظهرت المستعمرات النامية على وسط CZA بيضاء اللون بالبداية وبتقدم عمر المستعمرة ظهرت مستعمرات دائرية بحواف متعرجة سوداء اللون الى رمادية اللون ذو سطح يشبه حبات الرمل وعلى وسط MEA وصل النمو إلى حافة الطبق بعد مرور أسبوع واحد من حضنها بدرجة 28 ± 2 مْ . ظهر الطبق يبدو اصفر باهت مجعد.	مجهرياً ظهر الغزل الفطري مقسم , وتنشأ منه حوامل كونيدية شفافه ذات جدران سميكة وتنتهي بحويصلة كروية يغطي سطحها بالكامل صف واحد من الفياليدات والتي تحمل قمتها سلاسل من الكونيدات الكروية السوداء اللون .
Aspergillus flavus	ظهرت المستعمرات النامية على وسط CZA بلون أخضر مصفر داكن الى ساطع,ذات سطح مستوية محبب مع أخاديد شعاعية . بينما على وسط MEA مخملية أو ملساء بقطر 70-60 ملم متمنطقة الرؤوس الكونيدية شعاعية او عمودية . ظهر الطبق يبدو اصفر باهت .	مجهرياً الرؤوس الكونيدية شعاعية بشكل نموذجي الحوامل الكونيدية مستدقة سميكة الجدران تعلوها الحوصلة التي تغطي الفياليدات سطحها بالكامل .الكونيدات كبيرة 3-6 مايكرون كروية او شبه كروية خضراء شاحبة مشوكة .
Aspergillus terreus	تبدو المستعمرة على وسط CZA ذات سطح ناعم وتحتوي على تراكيب عنقودية بشكل إنتفاخات تبرز من سطح المستعمرة ولون المستعمرة بني فاتح (بلون شاي الدارسين) . ظهر الطبق يبدو أصفر مشرق	مجهرياً تبدو الرؤوس الكونيدية شبه كروية تعلو ثلاث ارباع نصفها العلوي الفياليدات والكونيدات تبدو ملساء الجدران .
Aspergillus nidulans	تبدو المستعمرات على وسط CZA بلون أخضر مصفر مائلة الى البني بطيات زيتونية اللون . ظاهر الطبق يبدو أحمر باهت .	مجهرياً الرؤوس الكونيدية عمودي قصير ابعاده (30×70) مايكرون الكونيدات كروية الشكل بقطر(3-3.5) مايكرون ذات جدران خشنة .
Aspergillus ochraceus	تبدو مستعمرات على وسط CZA أخضر براق ذات سطح مخملي أو مثألم بقطر 30 ملم . بينما على سطح MEA تبدو مماثلة من حيت الشكل واللون لكن بأقل كثافة . ظهر الطبق يبدو ذو لون اصفر باهت	مجهرياً الرؤوس الكونيدية شعاعية بشكل نموذجي حيث تغطي الفياليدات سطحها بالكامل .الحوامل الكونيدية شفافة بقطر 1ملم . كونيداتها ملساء .
Aspergillus parasiticus	تبدو المستعمرات على وسط CZA بنمو كثيف نوعاً ما سطح مخملي أخضر داكن مائل إلى الأصفرار وتظهر المستعمرات على وسط MEA اقل كثافة . ظهر الطبق يبدو أخضر باهت .	مجهرياً تبدو الرؤوس الكونيدية شعاعية تتصل الكونيدات بشكل سلاسل في الفياليدات ,الحوامل تبدو سميكة عديمة اللون . الكونيدات تبدو مشوكة الجدران .

Aspergillus penicillioides	**تبدو المستعمرات على وسط CZA صغيرة بقطر (10.3)ملم وعلى وسط MEA بقطر (4.5)ملم ذو لون ازرق غامق عند الحواف بينما مركز المستعمرة تظهر بلون رمادي غامق . المستعمرة مرتفعة . وظهر الطبق عديم اللون .**	**مجهرياً الرؤوس الكونيدية صغيرة جداً تبدو بشكل صولجانية تغطيها الفياليدات بالنصف العلوي فقط وكونيداتها جدا صغيرة مشوكة .**
Aspergill us ustus	**تبدو المستعمرات على وسط CZA بقطر 40- 30 ملم بلون ابيض مائل إلى اخضرار المستعمرة مخملية نتيجة ارتفاع الكونيدات ذات اللون الابيض الباهت , على وسط MEA اقل قطراً وكثافة , ظهر الطبق ابيض باهت .**	**تغطي الفياليدات ثلاث ارباع الحوصلة الكروية الشكل الكونيدات صغيرة جدا ملساء .**

الملحق (5) : قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي DNA بجهاز Nanodrop .

No.	Concentration (ng/lµ)	Purity
AS_1	6.7	1.58
AS_2	10.3	1.79
AS_3	5.4	2.07
AS_4	13.0	1.88
AS_5	11.8	2.00
AS_6	6.6	2.11
AS_7	14.1	1.91
AS_8	9.7	1.48
AS_9	17.8	2.12
AS_{10}	8.2	2.09
AS_{11}	8.6	1.98

AS_{12}	7.3	1.86
AS_{13}	13.8	1.15
AS_{14}	9.0	1.71
AS_{15}	8.5	2.02
AS_{16}	10.2	2.08
AS_{17}	12.9	1.55
AS_{18}	11.7	1.87
AS_{19}	19.4	1.90
AS_{20}	10.8	1.67

حيث أن :

$AS_{(1,2.3.4.5)}$: *A. niger* , $AS_{(6,7,8,9,10)}$: *A. fumigatus* , $AS_{(11,12,13,14,15)}$: *A. flavus* and $AS_{(16,17,18,19,20)}$: *A.terreus*