



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية/كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تأثير الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك على التعبير الجيني للجينات المنظمة لإنتاج البنسلين في نوعين من البنسليوم

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم / جامعة القادسية

وهي من متطلبات نيل شهادة الماجستير

في علوم الحياة / أحياء مجهرية

من الطالب

علاء حسن صغبان عجلان

بكالوريوس علوم / علوم حياة

2012

إشراف

أ.د. نيران عبيد جاسم العامري

نيسان 2017 م

رجب 1438 هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿فَتَعَالَى اللَّهُ الْمَلِكُ الْحَقُّ وَلَا تَعْجَلْ بِالْقُرْآنِ مِنْ قَبْلِ أَنْ يُقْضَى إِلَيْكَ وَحْيُهُ وَقُلْ رَبِّ زِدْنِي عِلْمًا﴾

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيِّ الْعَظِيمِ
سورة طه / الآية: 114

الإهداء

إلى من وهبني الحياة..... ربي.

إلى من أنار دربي..... الرسول محمد (صلواته)

إلى الائمة الاطهار سيوف الحق وكلمة الصدق..... أمتي

إلى من أنار بصري بحبه وحنانه الكبير..... أبي

إلى منبع الحناء ومقال الضحية ومن سهر الليالي الاجلي..... أمتي

إلى فخرتي وقوتي ومنسرتي في كل حين..... أختي

إلى رفقة دربي وصدقتي..... زوجتي

إلى كل من أراد لسلي الخير..... أصدقائي

إليهم جميعا أهدى ما وفقني إليه ربي إخلاصا وحرمانا

شكر وتقدير

من يستحق الشكر هو الله سبحانه وتعالى . الذي يلهمنا ويعلمنا ..
(رب أوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت عليّ وعلى والديّ وأن أعمل صالحاً ترضاه
وادخلني برحمتك في عبادك الصالحين) والصلاة والسلام على سيدنا محمد وعلى اله وسلم
تسليماً كثيراً .

يطيب لي وأنا انهي رسالتي أن أشكر كل من شارك في تذليل الصعوبات التي واجهتها هذا
العمل، ومن أنار لي شمعة بددت وحشة الطريق، أو أوحى بفكرة فتحت أمامي الآفاق، أو أشار
برأي أضاف لبنة على البناء، أو كلمة سدّدت العزم للمضي على درب الطويل...

وأخصّ ابتداءً بكل مشاعر التقدير والاحترام والامتنان أستاذتي الفاضلة الأستاذة الدكتورة نيران
عبيد جاسم لاقتراحها موضوع البحث والإشراف على رسالتي ، ومنحها لي ما وسعها من غزارة
علم وسعة معرفة سائل الله عز وجل ان يمنّ عليها بالصحة والعافية. كما واتقدم بعظيم الامتنان
ومزيد العرفان إلى عميد كلية العلوم سابقاً الأستاذ المساعد الدكتور عبد الامير سمير، والأستاذ
الدكتور نبيل عبد عبد الرضا عميد كلية العلوم حالياً، ورئيس قسم علوم الحياة سابقاً الأستاذ
المساعد الدكتور جاسم حنون والأستاذ المساعد الدكتور حبيب وسيل رئيس قسم علوم الحياة حالياً
لما قدموه لي من مساعدة، وأتقدم بوافر الشكر والتقدير لكل أساتذة كلية العلوم.

ولا يسعني إلا أن أتقدم بجميل شكري، وعظيم امتناني الى كل من الدكتور حسن حاجم والدكتور
علي محمّد غازي في الطب البيطري وأشكر كل أخواني في الدراسة واصدقائي الذين هم سندي في
دراستي وعذراً لكل جهد مخلص فاتني ان اذكره بحسن نية، واسأل الله ان يوفقنا جميعاً لما يحبه
ويرضاه.

الطالب

الخلاصة

استهدفت الدراسة عزل وتشخيص الفطريات الانتهازية من العينات السريرية من المرضى المراجعين للعيادة الشعبية للأمراض الصدرية في محافظة ميسان للفترة من 2015 /10/1 الى 2016/4/1 وقد كان عدد عينات القشع المجموعة 193 عينة قشع سريرية لمرضى يعانون من امراض رئوية مستمرة وقد فحصت وشخصت العينات باستخدام الفحص المجهرى والأوساط الزرعية. كما تم اختبار تأثير الجزيئات النانوية بثلاثة تراكيز % (3,6,12) على عزلتين من فطر البنسليوم *Penicillium spp.* وكما شملت الدراسة اختبار تأثير الجزيئات النانوية على النمو الشعاعي للفطر وعلى الوزن الجاف اضافة الى دراسة تأثير هذه الجزيئات على الجينات المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين في الجنس المذكور أعلاه وباستخدام تقنية Real-Time PCR .

اظهرت نتائج الفحوصات المجهرية والزرعية ان 75 عينة مريض كانت تحوي اصابة فطرية وبنسبة %38.86 كما اظهرت نتائج التشخيص الزرعى والمجهرى عائلية 41 عزلة وبنسبة %54.66 للجنس *Aspergillus spp.* توزعت بين النوع *A. fumigatus* بعدد 19 عزلة وبنسبة %25.33 يليه النوع *A. niger* بعدد 14 عزلة وبنسبة %18.67 يليه النوع *A. flavus* بعدد 8 عزلات وبنسبة %10.67 وظهر الجنس *Candida albicans* بعدد 18 عزلة وبنسبة %24 يليه الجنس *Penicillium spp.* بعدد 14 عزلة وبنسبة %18.67 وتوزعت هذه العزلات بين النوع *P. chrysogenum* بعدد 12 عزلة وبنسبة %16 والنوع *P. citrinum* بعدد 2 عزلة وبنسبة %2.67.

اما الجنسان *Rhizopus Stolonifer* و *Alternaria alternata* فقد ظهرا بعزلة واحدة لكل منهما وبنسبة %1.33. اظهرت نتائج اختبار تأثير الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للجنس *Penicillium spp.* فروقات معنوية بين المعاملات وان التراكيز المستخدمة حفزت نمو الفطر وان التركيز %12 كان اكثر التراكيز تأثيراً في نمو الفطر بأنواعه المعزولة إذ بلغ قطر المستعمرة في حالة النوع *P. chrysogenum* (1) 2.63 سم مقارنةً مع معاملة السيطرة السالبة بقطر 2.13 سم ومعاملة السيطرة

الموجبة(المضاد الفطري) بقطر 0.93 سم. والنوع (*P. chrysogenum* (2) فقد كان معدل قطر المستعمرة 2.23 سم اما النوع *P. citrinum* ، فكان قطر المستعمرة 1.4 سم مقارنةً مع معاملة السيطرة بقطر 1.23 سم . فيما يخص بتأثير الجزيئات النانوية على الوزن الجاف لأنواع الفطر فقد اكدت التأثير التحفيزي للجزيئات المستخدمة، وأظهرت النتائج وجود فروق معنوية بين المعاملات وان التركيز 12% كان اكثر التراكيز تأثيراً وان النوع (*P. chrysogenum* (2) كان اكثر الانواع تأثراً فقد بلغ معدل الوزن الجاف 0.463 غم مقارنةً مع السيطرة الموجبة (المضاد الفطري) بمعدل 0.208 غم، بينت نتائج اختبار تأثير جزيئات الزنك النانوية بتركيز 12% على التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن انتاج البنسلين أنّ أكثر الجينات تأثراً بوجود الجزيئات النانوية هي الموجودة في النوع (*P. chrysogenum* (2) إذ وجدت فروق معنوية بين معاملة التركيز 12% ومعاملة السيطرة فقد بلغ معدل التعبير الجيني للجينات الثلاثة (*pcbAB* , *pcbC* , *penDE*) في حالة التركيز 12% (7.495 ، 8.943 ، 6.723) على التوالي مقارنةً مع السيطرة (1.045 ، 1.029 ، 1.272) على التوالي. وأظهرت نتائج اختبار فعالية المضاد المفرز بوجود الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك ان راسح الفطر *P. chrysogenum* (2)النامي بوجود 12% من أوكسيد الزنك النانوي قد ثبت نمو البكتريا *Staphylococcus epidermidis* وبقطر تثبيط 19.66 ملم مقارنةً مع معاملة السيطرة (راسح الفطر بدون وجود الجزيئات النانوية) وبقطر تثبيط 12 ملم .

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع	الرقم
I		الخلاصة
7		قائمة المحتويات
IV		قائمة الجداول
VIII		قائمة الأشكال
X		قائمة المختصرات
1-2	الفصل الاول: المقدمة Introduction	1
3-20	الفصل الثاني: استعراض المراجع Literature review	2
3	البنسليوم	1-2
5	تصنيف البنسليوم	1-1-2
5	اهمية جنس البنسليوم	2-1-2
7	البنسلين	2-2
10	انواع البنسلين	1-2-2
10	البنسلينات الطبيعية	1
10	البنسلينات المقاومة لإنزيم البنسلينيز	2
11	البنسلينات واسعة الطيف	3

11	البنسلينات موسعة الطيف	4
11	الجينات المسؤولة عن انتاج البنسلين	2-2-2
12	التصنيع الحيوي للبنسلين	3-2-2
14	الجزئيات النانوية	3-2
17	اوكسيد الزنك النانوي	1-3-2
21-40	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and methods	3
21	الأجهزة والمعدات	1-3
21	الأجهزة	1-1-3
23	المواد	2-1-3
23	المواد الكيميائية	1
24	الصبغات	2
24	المضادات الحيوية	3
25	العُدَد	4
26	البادئات	5
27	طرائق العمل	2-3
27	الايوساط الزراعية	1-2-3
27	وسط سابروييد دكستروز أكار مع الكلورامفينيكول	1

27	وسط مرق السابروود	2
27	وسط الزابكس أكار	3
28	تحضير مضاد الكيتوكينازول	2-2-3
28	تحضير التراكيز المختلفة لأوكسيد الزنك النانوي	3-2-3
28	جمع العينات	4-2-3
29	الفحوصات المختبرية	1-4-2-3
29	الفحص المجهرى المباشر	1
29	زرع العينات	2
29	تشخيص الفطريات	2-4-2-3
29	حفظ العزلات	5-2-3
30	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي لفطر البنسليوم	6-2-3
31	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف لفطر البنسليوم	7-2-3
31	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على جينات انتاج البنسلين (<i>pcbAB, pcbC, penDE</i>)	8-2-3
32	فحص تفاعل سلسلة البلمره في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)	9-2-3
32	استخلاص الاحماض النووية الكلي	أ
33	قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوسومي الكلي	ب

34	المعاملة بأنزيم DNase I	ج
35	تصنيع شريط ال DNA المتمم	د
37	فحص (qPCR) Quantitative Real-Time PCR	هـ
38	طريقة تحليل بيانات Real-Time PCR data analysis	و
39	تأثير الراشح الفطري للنوع <i>P. chrysogenum</i> (2) المعامل بأوكسيد الزنك النانوي %12 بتركز على نمو بكتريا <i>Staphylococcus epidermidis</i>	10-2-3
40	التحليل الاحصائي	11-2-3
41-65	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة Results and Discussion	4
41	العزل	1-4
47	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي لفطريات البنسليوم	2-4
47	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع <i>P. chrysogenum</i> (1)	1-2-4
48	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع <i>p. chrysogenum</i> (2)	2-2-4

49	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع <i>p. citrinum</i>	3-2-4
51	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف لأنواع فطر البنسليوم	3-4
51	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف للنوع <i>P. chrysogenum (1)</i>	1-3-4
52	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف للنوع <i>p. chrysogenum (2)</i>	2-3-4
53	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف للنوع <i>p. citrinum</i>	3-3-4
55	تأثير اوكسيد الزنك على الجينات المسؤولة عن انتاج مضاد البنسلين (<i>pcbAB , pcbC , penDE</i>) في فطر البنسليوم	4-4
64	اختبار فعالية المضاد المنتج بوجود اوكسيد الزنك النانوي	5-4
66-67	الاستنتاجات والتوصيات: الفصل الخامس Conclusions and Recommendation	5
66	الاستنتاجات	1-5
67	التوصيات	2-5

68-83	References المصادر	
68	المصادر العربية	اولا
71	المصادر باللغة الإنكليزية	ثانيا

قائمة الجداول

الصفحة	عنوان الجدول	الرقم
21	الأجهزة المختبرية والادوات المختبرية التي استخدمت في الدراسة	1
23	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2
24	الصبغات المستخدمة في الدراسة	3
24	المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة	4
25	العُدد التي استخدمت في الدراسة	5
26	بادئات الدنا DNA	6
35	مكونات مزيج أنزيم DNase I	7
36	مكونات مزيج تصنيع الـ cDNA	8
36	الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA	9
37	مكونات مزيج تفاعل qPCR	10
38	الدورات الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل	11

	الجينات	
45	النسب المئوية لظهور الأنواع الفطرية المعزولة	12
48	تأثير اوكسيد الزنك النانوي والمضاد الفطري على النمو الشعاعي للنوع (1) <i>P. chrysogenum</i>	13
49	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع <i>p. chrysogenum</i> (2)	14
50	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع <i>p. citrinum</i>	15
51	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع <i>p. chrysogenum</i> (1)	16
52	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع (2) <i>p. chrysogenum</i>	17
54	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع <i>p.</i> <i>citrinu</i>	18

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	الرقم
10	التركيب العام للبنسلين	1
12	تسلسل جينات انتاج البنسلين	2
13	مراحل تصنيع البنسلين	3
16	مقارنة بين مقاييس أبعاد عدد من الاشياء المعروفة لنا مقدرة بوحداث قياس أطوال مختلفة ، المتر ، السننيمتر ، المليمتر ، الميكروميتر والنانوميتر	4
17	التركيب البلوري السداسي لأوكسيد الزنك النانوي	5
56	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع <i>penicillium chrysogenum</i> (1)	6
56	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>pcbAB</i> في النوع (1) <i>p. chrysogenum</i>	7
57	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>pcbC</i> في النوع (1) <i>p. chrysogenum</i>	8
57	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>penDE</i> في النوع (1) <i>p. chrysogenum</i>	9
59	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع <i>p. chrysogenum</i> (2)	10
60	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR	11

	والخاص بجين <i>pcbAB</i> في النوع (2) <i>p. chrysogenum</i>	
60	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>pcbC</i> في النوع (2) <i>p. chrysogenum</i>	12
61	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>penDE</i> في النوع (2) <i>p. chrysogenum</i>	13
62	تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع <i>p. citrinum</i>	14
62	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>pcbAB</i> في النوع <i>p. citrinum</i>	15
63	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>pcbC</i> في النوع <i>p. citrinum</i>	16
63	منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين <i>penDE</i> في النوع <i>p. citrinum</i>	17
65	تأثير راشح الفطر (2) <i>p. chrysogenum</i> المعامل بأوكسيد الزنك النانوي على بكتريا <i>Staph. epidermidis</i>	18

قائمة المختصرات

abbreviation	Key
ACV	L- α -aminoadipic acid, L-cysteine, and L-valine
CT	Threshold cycle
CNS	Central Nervous System
CZA	Czapeks Agar
DEPC	Di ethyl pyro carbonate
DNA	Deoxyribo Nucleic acid
EDTA	Ethylene Diaminetetra acetic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
LSD	Least Significant Deferences
NR	Natural Rubber
PH	power of hydrogen
P/ RG	percent inhibition of radial growth
Ref	Reference gene (Housekeeping gene)
RT-qPCR	Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR
SDAC	Sabouraud's Dextrose Agar with Chloramphenicol
SDB	Sabouraud's Dextrose-Broth

SBR	synthetic Rubbers (Styrene–butadiene)
TLC	Thin Layer Chromatography
ZnO NP	Zinc oxide Nanoparticles
Δ CT	Difference in threshold cycle number
$\Delta\Delta$ CT	Difference in CT of treatment group and control group

Introduction

المقدمة :

يعد جنس البنسليوم *Penicillium spp.* من الأجناس المنتشرة في جميع انحاء العالم تلعب أدواراً مختلفة في البيئة في تحليل المواد العضوية وتدمير وتعفن صناعة المواد الغذائية انتاج عدد كبير من السموم الفطرية mycotoxins والانزيمات، يضم 354 نوع مقبول بما في ذلك مجموعة عائدة الى الجنس *Aspergillus spp.* كالأنواع *Aspergillus crystallinus* *Aspergillus paradoxus* *Aspergillus malodoratus* and *Aspergillus paradoxus* (Visagie et al.,2014). يعتبر البنسليوم ملوثاً للبيئة وله أهمية كبيرة في حدوث أمراض الحساسية الرئوية وكذلك عدوى البنسليوم تكثر في الأشخاص المصابين بالربو (Lyratzopoulus et al.,2002).

ينتمي مضاد البنسلين الى مجموعة البييتالاكتام والتي تتألف من حلقة البييتالاكتام المندمجة مع حلقة thiazolidine مكونة نواة البنسلين وتتصل بها سلسلة جانبية (side chain) يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات البنسلين (Atlas,1984). ويعمل البنسلين على منع تكوين الجدار الخلوي للبكتريا عن طريق منع عملية تخليق الببتيدوغلايكان peptidoglycan حيث ترتبط البنسلينات بأنزيمات Transpeptidase و Carboxypeptidase (Todar,2002) ، وينتج هذا المضاد من قبل ثلاثة جينات هي: *pcbAB* , *pcbC* , *penDE* ويكون عملها بشكل متسلسل (Federico et al.,1998).

تعرف الجزيئات النانوية (Nanoparticles) على انها تلك الجزيئات التي يتراوح ابعادها (1-100) نانومتر ولصغر حجمها فإنها تتصف بصفات تختلف عن جزيئاتها عندما تكون بحجمها الكبير حيث تمتلك صفات مغناطيسية والكترونية وبصرية تجعلها تسلك سلوكاً مغايراً (Nowak,2010).

أصبحت التقنية النانوية في الآونة الاخيرة واحدة من العلوم المتطورة التي لها صلة وثيقة مع العلوم الاخرى مثل: الكيمياء، والاحياء، والهندسة، والفيزياء، وغيرها (الاسكندراني،2010). ومنها الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك من بين الجزيئات النانوية التي استخدمت بكثرة في مجالات عديدة وواسعة منها في مجال الطب خصوصاً

في علاج الاورام السرطانية إذ تم استخدامه ضد الخلايا السرطانية أذ يعمل على اختراق الخلية والارتباط بالحمض النووي DNA (Nel. et al.,2006) كما اشارت العديد من الدراسات على الدور الذي تلعبه الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك على المستوى الجيني(Sharma et al.,2012;Condello et al.,2016).

ولهذا جاءت دراستنا هذه لتبين تأثير جزيئات الزنك النانوية على واحد من الفطريات ذات الاهمية الطبية كمسبب مرضي انتهازى والصناعية وهو فطر البنسليوم *Penicillium spp.* ومدى هذا التأثير على المستوى الجيني وشملت الدراسة المحاور الأتية :

- 1- عزل الفطريات الانتهازية وتشخيصها من العينات السريرية وتنميتها على اوساط زرعية مختلفة.
- 2- دراسة تأثير الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك على النمو الشعاعي، والوزن الجاف لأنواع فطر البنسليوم *Penicillium spp.* وبتراكيز مختلفة.
- 3- دراسة تأثير الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك على مستوى التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين في أنواع فطر *Penicillium spp.* وباستخدام تقنية

.Real-Time PCR

- 4- اختبار فعالية المضاد المنتج من أنواع فطر البنسليوم *Penicillium spp.* بوجود أوكسيد الزنك النانوي على بكتريا *Staph. epidermidis* المعروفة بحساسيتها لمضاد البنسلين .

الفصل الثاني

2: استعراض المراجع : Literature review

1-2: البنسليوم : *Penicillium spp.*

ينتمي *Penicillium spp.* الى مجموعة الفطريات الكيسية Ascomycota ، فطر مترمم من اوسع الفطريات انتشارا في الطبيعة يوجد في كل مكان يبلغ عدد الأنواع التابعة لهذا الجنس 200 نوع يكون تركيب *cleistothecium* يقوم بدور كبير في تحليل المواد العضوية، ينمو على المواد الغذائية مثل: الخبز، والجبن، والخضروات، والفواكه، والحبلاتين، بسبب هذا الفطر أنواعا عديدة من الأعفان مثل العفن الازرق Blue Mold والعفن الاخضر Green Mold بحسب نوع الفطر المسبب للعفن، يتكون الغزل الفطري من خيوط فطرية متشابكة قد تكون سطحية، أو تتغلغل داخل الوسط الذي ينمو عليه الفطر، وقد تكون ملونة أو غير ملونة الحوامل الكونيدية مقسمة بجدران مستعرضة متفرعة عند اطرافها النهائية الى عدة افرع تدعى *Metulae* وتتفرع كل واحدة الى عدة افرع قصيرة ورقية الشكل أحادية تدعى *Phialides* او *Strigmata* (الرحمة، 2005). والبنسليوم مهم في البيئة كمحللات المادة العضوية، ونتاج الغذاء والدواء، ينتج البنسلين الذي يستخدم كمضاد حيوي ضد البكتريا حيث يستخدم في قتل، أو منع نموها داخل جسم الانسان (Tiwari *et al.*, 2011).

وفطر البنسليوم شائع في المناطق المعتدلة الحرارة والمناطق شبة الاستوائية، يوجد في بيئة المنازل خصوصا المناطق الرطبة وعلى الأغذية المملحة نادرا ما تسبب الأمراض للإنسان ويكون مسبباً للحساسية لدى بعض الأشخاص في بيئة المنازل الداخلية وبالإضافة الى إنتاج البنسلين هناك نواتج ايض ثانوي للبنسليوم مثل: (roquefortine C, meleagrins, chrysogins, sorbicillin,

,sorrentanone, secalonic, xanthocillins and PR-toxin) (Ratnam *et al.*, 2014).

منذ عام 1809م قدم اسم البنسليوم والذي معناه الفرشاة وقد تم وصف ثلاثة اجناس هي:

P. candidum, *P. glaucum* and *P. expansum* ومنذ ذلك الوقت عرف 1000 اسم للفطر والعديد من هذه الاسماء لا يمكن تمييزه بسبب الوصف غير الكامل للفطر آنذاك فبعض هذه الاسماء غير صحيح والبعض الاخر مرادف لأسماء اخرى وقد تم مراجعة وصف كل الانواع وقبل 300 نوع (Thom, 1930), وفي دراسات لاحقة Raper and Thom, (1949) قبلا 137 نوع وبعد ذلك العالم Pitt,(1979) قبل 150 نوع, ثم تم قبول 250 نوع وشمل العدد انواعاً وصفت بانها *Eupenicillium* ومنذ ذلك الوقت عرفت الانواع مظهرها بالبنسليوم (Ramirez, 1982), وفي عام 1990م تم التعرف والوصف لتتابع ال (DNA) للبنسليوم تم قبول 223 نوع وتجاهلوا الاسماء غير المنشورة (Pitt and Samson, 1993), قام العالم Pitt *et al.*, (2000) بتحديث الانواع التابعة وقبل 250 نوع للبنسليوم.

البنسليوم هو جنس متنوع يحدث في جميع أنحاء العالم وانواع منه تلعب أدوارا مهمة في تحليل المواد العضوية وتسبب دمار الجذور النباتية حيث أنها تنتج مجموعة واسعة من السموم الفطرية ويعتبر من مسببات الحساسية يحتوي على 354 الأنواع المقبولة، بما في ذلك مجموعات تعود الى جنس الاسبرجلس مثل : *Aspergillus crystallinus*, *A. malodoratus* and *A. paradoxus* (Visagie *et al.*, 2014). وتم عزل فطر

البنسليوم من عينات الغبار الداخلي للمناطق

المختلفة من مدينة الموصل وشخص كلا من الحريثي و رمضان، (2009) الانواع التابعة لجنس *Penicillium* spp. المتواجد في الغبار الداخلي في الأبنية والمنشآت المختلفة وذلك للأهمية الكبيرة للفطر ولكونه يدخل في الصناعة الدوائية وكذلك يسبب العديد من الأمراض ومنها الحساسية. وقد قام (Hemath *et al.*, 2010) بعزل الفطر من التربة من حقول زراعية في الهند واستخدم في تصنيع دقائق الفضة النانوية. اثبت (Ahmet, 2004) ان البنسليوم وفطر الاسبرجلس هما أكثر الفطريات تواجد في تركيا . وقد عزل (Suhail *et al.*, 2006) الفطر من الأنهر.

2-1-1: تصنيف فطر. *Penicillium* spp. :

التصنيف تم على وفق ما جاء به (Frisvad and Samson , 2004).

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Subphylum : pezizomycotina

Class : Eurotiomycetes

Subclass : Eurotiomycetidae

Order : Eurotiales

Family : Eurotiaceae

Genus : *Penicillium*

2-1-2: أهمية جنس البنسليوم:

الاصابات الناتجة عن فطر البنسليوم *Penicillium* spp. هناك ثلاث حالات مرضية منتشرة الاولى كانت بسبب اضطراب الخلايا الحبيبية المزمنة (chronic granulomatous disorder) الناتجة عن الاصابة الفطرية بفطر *Penicillium* spp. والحالتان الثانية والثالثة غير مرتبطات بتنشيط المناعة immunocompromised والحالة الثانية مرض المخ الغير معروف المصدر بسبب فطر *P. chrysogenum* منذ عام 1951 الى الان حدثت الكثير من الاصابات الفطرية الناتجة عن فطر *Penicillium* spp. 31 حالة

مسجلة اصابات غازية 21 حالة اصابة رئوية 6 من حالات في اشخاص غير مثبطين مناعياً 4 من حالات التهاب الشغاف القلبي 6 من حالات اضطراب السمع 5 من حالات اصابة باطن العين وحالات فردية من اصابات المريء والتهابات القناة البولية العليا ومن التهابات داخل الجمجمة بسبب التعرض للجروح او الادوات الجراحية وكذلك يسبب البنسليوم *Penicillium spp.* اصابات خارجية مثل التهابات القرنية ، حساسية القصبات الهوائية (Lyratzopoulus *et al.*, 2002). وقد قام (Noritomi *et al.*, 2005) بوصف 34 حالة عدوى غازية، (13) حالة لخمج الرئتين ، وخمج الشغاف، والمسالك البولية، وخمج باطن المقلة، وخمج المريء، وخمج داخل الجمجمة، و(3) حالات عدوى الجهاز العصبي المركزي (CNS)، اثنان منها تحدث في المرضى الطبيعيين، كانت أولا حالات الإصابة داخل الجمجمة نتيجة لانتشار العدوى من الجيوب الأنفية ثم إلى العين مسبب تمدد الأوعية الدموية الدماغية، وزيادة الخلايا الحمضة (Esinophilis).

وذكر (Goh *et al.*, 2007) أن الفطريات يمكن أن تسبب مرضاً للإنسان من خلال مجموعة من الآليات البايولوجية مثل: العدوى الفطرية، رد الفعل المهيج، والسموم، لذلك التعرض إلى مستويات مرتفعة من أبواغ هذا الفطر يؤدي إلى خطر الإصابة بأمراض الحساسية المزمنة، صنف سابقاً بأنه فطر غير ممرض، يوجد في البيئة ومسؤول عن حالات التسمم الفطري الناتجة عن تناول الحنطة المصابة، أو الحاملة لأبواغ الفطر (Okhovvat and Zakeri, 2002). وحديثاً يسبب اصابات مختلفة لدى الأشخاص الطبيعيين والأشخاص ضعيفي المناعة مثل: التهاب القرنية

(Badenoch *et al.*, 2006) وداء الأظفار الفطري (Romano *et al.*, 2004)، والأمراض الجلدية لدى الأشخاص ضعيفي المناعة (Durán *et al.*, 2003). أن تواجد هذه الفطريات لفترات طويلة سوف يشكل عوامل خطورة للإصابة بأمراض الحساسية ومن أهم علاماتها مشكلات في الجهاز التنفسي ومن أكثر اعراضها رشح الأنف مثل: الإنفلونزا وتهيج واحمرار العيون، وسعال، وتفاقم وزيادة أعراض الربو، وضيق الصدر، وبطء التنفس (Dillon *et al.*, 2005).

في حين تمكن Seydametova et al.,(2012) من انتاج اللوفاستاتين (Lovastatin) الذي يعتبر ناتجاً أيضاً ثانوياً فطرياً ينتج فطر البنسليوم هذا الانزيم الذي يشجع على تحديد مراحل التصنيع الحيوي للكوليسترول مما يسبب في انخفاض نسبة الكوليسترول في الدم .

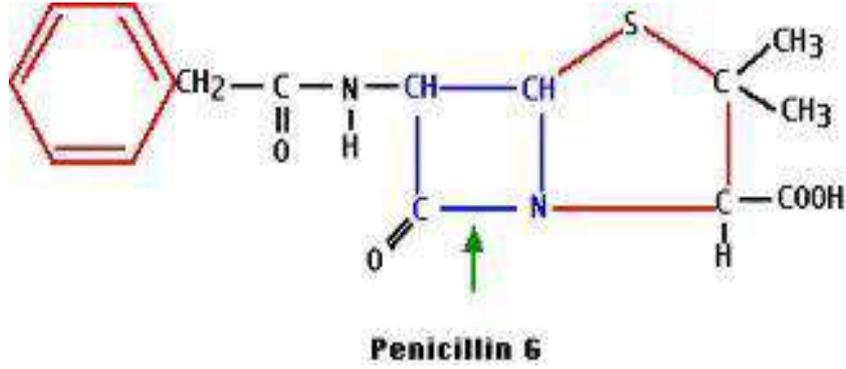
وكما تمكن الركابي واخرون،(2011) من انتاج مضادات الاكسدة من مجموعة من الفطريات من ضمنها البنسليوم. وكما استخدم Leitão, (2009) البنسليوم في المعالجة الحيوية للتخلص من الملوثات خصوصا الناتجة من النشاطات الصناعية من خلال تسريع عمليات تحويل المواد العضوية وغير العضوية في الغلاف الجوي من المواد الضارة احيائيا مثل المركبات الفينولية، ومتعدد الحلقة الاروماتية، والهيدروكربون، والمعادن الثقيلة، والتي حتى بتراكيز ضئيلة تكون سامة للإنسان فاستخدمت المعالجات الاحيائية للتخلص من الملوثات، أو اصلاحها والفطريات تلعب دوراً في المعالجة الاحيائية للمعادن والمركبات العطرية.

2-2: البنسلين: Penicillin

البنسلين اكتشف بواسطة الكسندر فلمنك 1928 وذلك عندما لاحظ ظاهرة غير طبيعية وهي غياب المستعمرات الكاملة النمو لبكتريا *Staphylococcus aureus* إذ كان هناك نمو لمستعمرة فطرية دائرية كبيرة من فطر *Penicillium notatum* على الأطباق القديمة البحوث اللاحقة بينت ان وجود مادة مجهولة افرزت من الفطر غير الضار للحيوانات لكنة قاتل للجراثيم الممرضة ثم اقترح استخدامه لعلاج الامراض المسببة بواسطة الجراثيم لكن اثبات قيمته كعلاج لم يعرف الا بعد اثنتا عشرة سنة إذ قام كل من العالمين الكيميائي إيرنست تشين (Ernst Chain) وعالم الأمراض (هاورد فلوري Howard Florey) باستخلاص المضاد الحيوي الذي ينتجه فطر *Penicillium notatum* والذي أطلق عليه اسم Penicillin. وقد حصل كلا من فليمينج و تشين و فلوري على جائزة نوبل عام 1945م (Hare,1982). وبما ان البكتريا تتكاثر بالانقسام فعند وجود البنسلين فان الجدار الخلوي الجديد سوف لن يتكون في حين أنّ البنسلين يكون غير مؤثر على البكتريا القديمة لكن يوقف تكوين الجدار الخلوي الجديد وبذلك البكتريا لن تتكاثر يقوم البنسلين بالارتباط بواسطة أواصر تساهمية مع انزيم transpeptidase وإعاقة فعاليتها والذي يعتبر مهماً في عملية تخليق طبقة الببتايدوكلايكان (Peptidoglycan) المهمة في تكوين الجدار الخلوي وبالنتيجة الجدار الخلوي سوف يكون ضعيفاً في بعض الاماكن لذلك تنفجر الخلايا بفعل الماء (Pandey et al.,2014). بالإضافة الى البنسليوم ينتج مضاد البنسلين من بعض أنواع فطر

Aspergillus مثل؛ *A. janus*, *A. flavus*, *A. nodulans* وكذلك من فطر *Fusarium* ينتج أيضاً مضادات البنسلين، وكذلك بعض انواع البكتريا والاكثينومايسس *Actinomycetes* تنتج مضادات البنسلين ، ويحضر حالياً" مضاد البنسلين من الفطر *Penicillium chrysogenum* بشكل طبيعي. والبنسلين المنتج طبيعياً" يكون غير مستقر من الناحية الكيمياوية لذلك يضاف الى المضاد أملاح الصوديوم، او البوتاسيوم، حتى يكون مستقراً من الناحية الكيمياوية. وعلى الرغم من ذلك هناك عدة عوامل كيمياوية وبايولوجية تسبب عدم استقرارية أملاح البنسلين مثل: الحوامض حيث يتأثر البنسلين بالحوامض بما فيها الحوامض المعوية لذلك فان البنسلين لا يعطى عن طريق الفم لظهور بعض حالات التحسس للمضاد لدى بعض الاشخاص. درجة الحرارة وفترة الخزن تعدّ من العوامل الرئيسية التي تؤثر على فعالية البنسلين ومن أسباب استخدام البنسلين هي: قلة السمية، وقلة التأثيرات الجانبية، وسرعة امتصاص البنسلين، ووصوله الى سوائل الجسم بتراكيز مؤثرة، فترة بقاء البنسلين ومشتقاته بعد الجرعة قصيرة حيث يصل الى قمته في سوائل الجسم ثم يطرح عن طريق البول خلال الكلية لذا يجب أن تعطى جرعات متعددة خلال الفترة العلاجية للوصول الى تراكيز ثابتة في سوائل الجسم (الريبيعي، 2011).

ويتألف البنسلين من حلقة البيتالاكتام (β - lactam ring) المندمجة مع حلقة (thiazolidine) مكونة نواة البنسلين يتصل بالنواة بسلسلة جانبية (side chain) يضاف لها جذور مختلفة للحصول على مشتقات مختلفة من البنسلينات، وكل البنسلينات مشتقة من 6-Aminopenicillanic acid (Atlas, 1984). يقوم البنسلين بمنع تكوين الجدار الخلوي للبكتريا من خلال تشابه مضادات هذه المجموعة مع (D-alanine) من الناحية الكيمياوية والذي يعد ركيزة (Substrate) للخطوة الأخيرة في عملية تخليق طبقة الببتايدوكلايكان (Peptidoglycan) والذي يمثل الارتباط العرضي (Cross-linking) النهائي بين السلاسل الجانبية الببتيدية إذ ترتبط البنسلينات بأنزيمات الترانسببتايديز (Transpeptidase) والكاربوكسي ببتايديز (Carboxy Peptidase) وتثبيط عملها والتي يتطلب وجودهما تخليق الببتايدوكلايكان (Baron et al., 1994; Todar, 2002).



شكل (1) التركيب العام للبنسلين (Pandey *et al.*, 2014)

1-2-2: انواع البنسلين:

تصنف البنسلينات اعتماداً على مدى التأثير او الفعالية ضد الميكروبية الى اربع مجاميع

(Hodgson and Kizior, 2003):

1: البنسلينات الطبيعية: Natural penicillins

وهي مضادات فعالة جداً تجاه المكورات الموجبة لصبغة جرام (Gram positive cocci) لكنها غير مؤثرة تجاه

اغلب المكورات العنقودية الذهبية *Staph. aureus* وعدم الفعالية نتيجة لامتلاكها أنزيم Penicillinase

وتشمل كلا من بنسلين G وبنسلين V (Mandell *et al.*, 1995; Craig and Stitzel, 1997;

Edmunds, 2000)

2: البنسلينات المقاومة لإنزيم البنسلينيز: Penicillins resistant to Penicillinase

هذه المجموعة ذات تأثير فعال تجاه بكتريا *Staph. aureus* التي تنتج انزيم البنسلينيز وتكون اقل تأثيراً من

البنسلينات الطبيعية تجاه المكورات الموجبة لصبغة جرام وتشمل كلا من : Methicillin Dicloxacillin,

Oxacillin (Craig and Stitzel, 1997) (Laurence *et al.*, 1997) Cloxacillin, Flucoxacillin
.Nafcillin

3: البنسلينات واسعة الطيف: Broad- spectrum penicillins

تمتاز بفعاليتها ضد المكورات الموجبة لصبغة جرام وبعض البكتريا السالبة لصبغة جرام

(Gram positive cocci) مثل: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Hemophilus influenzae* (Neal,

2002) وتشمل Ampicillin و Amoxicillin و Ampicillin/Sulbactin (Augmentin)

و Amoxicillin/Clavulanate (Edmunds, 2000) Bacampicillin

4: البنسلينات موسعة الطيف: Extended – spectrum Penicillins

تكون هذه المجموعة ذات فعالية تجاه بكتريا *Proteus sp.*, *Klebsiella*, *Ps. aeruginosa*,

Enterobacter وبعض البكتريا السالبة لصبغة جرام الأخرى وتشمل هذه المجموعة كلا من:

Ticarcillin و Ticarcillin / Clavulante (Laurence *et al.*, 1997)

Piperacillin و Piperacillin/Tazobactam (Craig and Stitzel, Mezlocillin 1997;Edmunds, و

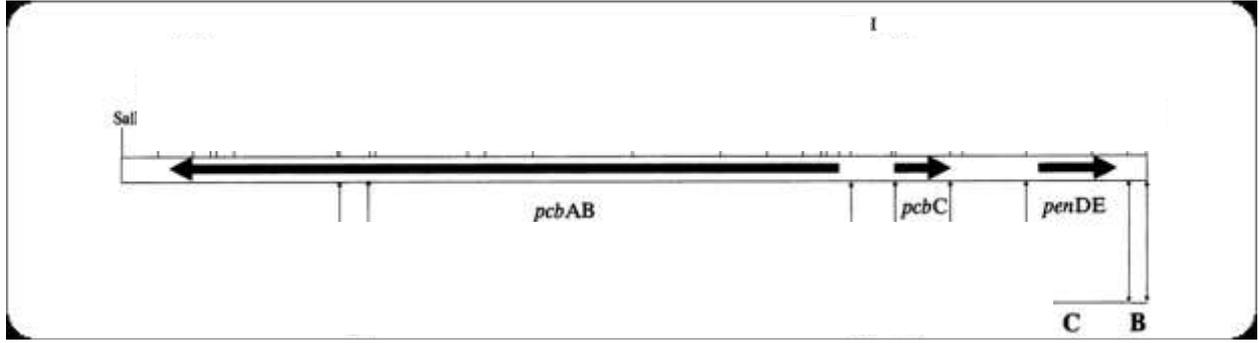
2000)

2-2-2: الجينات المسؤولة عن إنتاج البنسلين:

الجينات المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين هي، (*pcbAB*، *pcbC* and *penDE* genes)

على التوالي أذ تعمل هذه الجينات الثلاثة بشكل تآزري في *gene cluster* في التصنيع الحيوي لمضاد البنسلين .

(Laich *et al.*, 1999).



شكل (2) تسلسل جينات انتاج البنسلين (Fernández *et al.*, 1994)

3-2-2: التصنيع الحيوي للبنسلين: Biosynthesis of Penicillin

تبدأ مرحلة التصنيع الحيوي للبنسلين بتكثيف ثلاثة حوامض امينية هي I- α -aminoadipic acid, I-cysteine, and I-valine tripeptide δ -(I- α -aminoadipyl)-I-cysteinyl -d-valine (LLD- الى ACV) هذه الخطوة يتم تحفزها بواسطة انزيم يدعى I- δ -nonribosomal peptide synthetase (ACVS) هذه الحوامض تشفر بواسطة الجين *pcbAB* gene بعدها يتم تكون

β -lactam ring بواسطة isopenicillin N synthase (IPNS) و الذي يشفر بواسطة

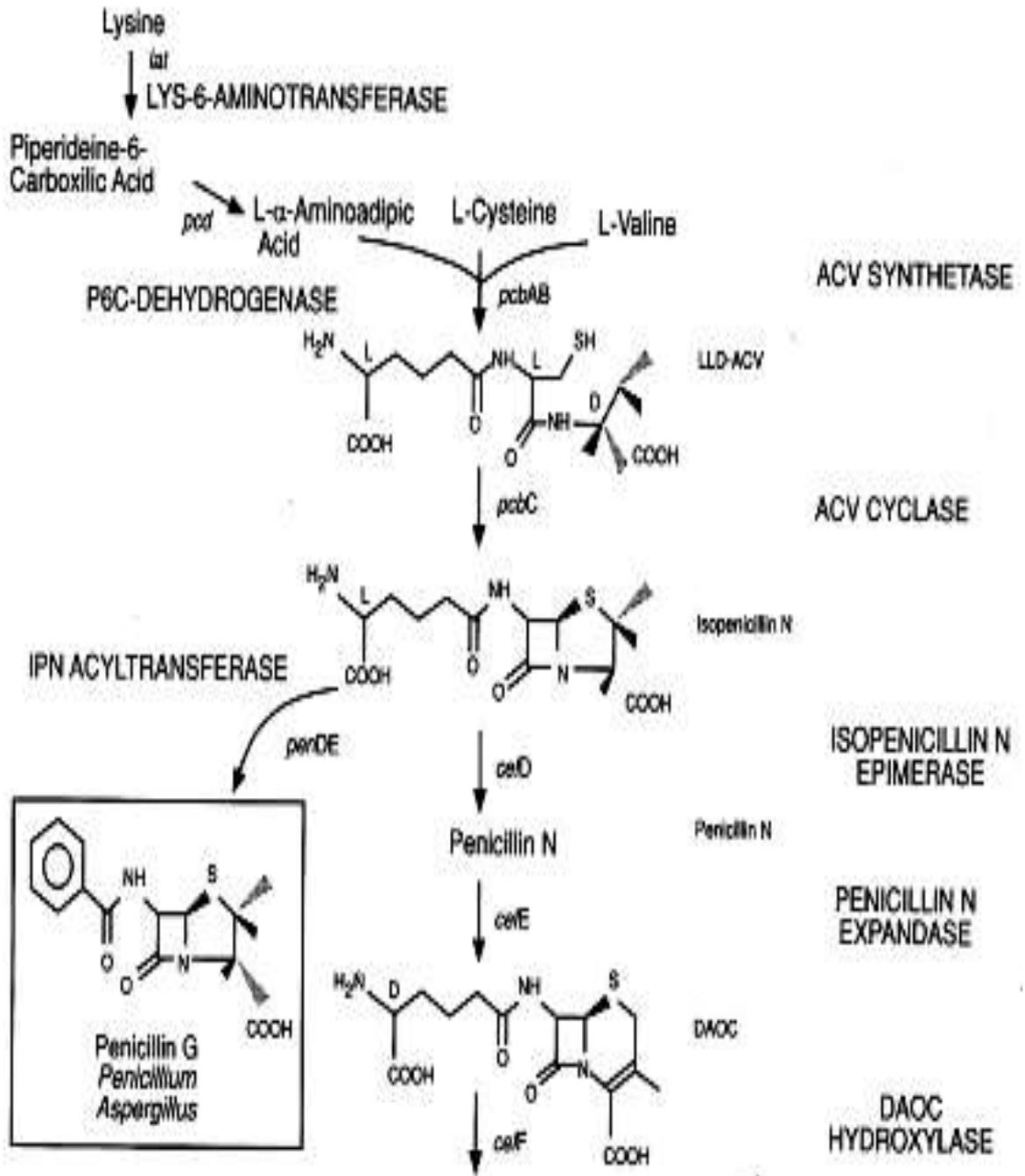
الجين *pcbC* gene يدخل بعدها isopenicillin N الى Microbody ثم يتم

استبدال السلسلة الجانبية I- α -aminoadipic side chain بواسطة مجموعة جانبية

activated phenyl- or phenoxyacetyl للحصول على penicillin G or V

وهذا التحويل يتم تحفزه بواسطة انزيم isopenicillin N acyltransferase : acyl-coenzyme A

(IAT) الذي يشفر بواسطة جين *penDE* (Muñiz, 2007).



شكل (3) مراحل تصنيع البنسلين (Liras *et al.*, 1998)

درس (Gutiérrez *et al.*, 1999) تأثير الكلوكوز على استنساخ جينات انتاج البنسلين , *pcbAB*, *pcbC* , *penDE* فوجد ان الكلوكوز يكبح الاستنساخ لهذه الجينات عند إضافته خلال مرحلة تلقيح الوسط في العينة الفطرية لكن تأثيره يقل عند الاضافة بعد 12 ساعة من الزرع في حين لا يوجد تأثير عند الاضافة بعد 24 او 36 ساعة من الزرع وذلك لان زيادة تركيز الكلوكوز تثبط عملية التصنيع الحيوي للبنسلين من خلال منع تكوين (ACV) I- α -aminoadipic acid, I-cysteine, and I-valine الذي يعدّ المادة الوسطية الاولى للتصنيع الحيوي خلال الفترة الأولى للنمو.

وتناول (Asnaashari *et al.*, 2012) وذلك للأهمية الطبية للفطر *P. chrysogenum* الظروف المثلى لإنتاج البنسلين من هذا الفطر باستخدام تقنيات كروماتوجرافيا الطبقة الرقيقة والتحليل الكروماتوجرافي السائل TLC and HPLC وجدت أعلى نسبة إنتاج للبنسلين هي من 6-8 يوم من بداية الزرع والظروف المثلى للإنتاج هي بعد اضافة 3 غرام من خلاصة الخميرة و 21 غرام من السكر، و درجة الحرارة المثلى كانت 25-28C° و 120 دورة من المزج.

وقامت (Martín, 2000) بدراسة تأثير عدة عوامل على انتاج البنسلين منها: الاس الهيدروجيني PH ، وتأثير اضافة الكلوكوز، والنيتروجين، فلاحظ هناك علاقة بين هذه العوامل والانتاجية حيث القاعدية تؤدي الى زيادة في التعبير الجيني للتصنيع الحيوي للبنسلين خصوصا الجينات

. *pcbC* , *penDE* genes

3-2: الجزيئات النانوية: Nanoparticles

"النانو" هي كلمة مشتقة من اللغة اليونانية وتعني عالم الأقزام الخرافي المتناهي الصغر، ومصطلح "نانو" تكنولوجي " أو تقنية النانو معناها التقنيات التي تصنع من مقياس النانومتر، وهي وحدة قياس مترية متناهية في الصغر، وتعادل واحداً من ألف مليون متر، أي واحد مليار من المتر، أو واحد من مليون من المليمتر، ويمثل

ذلك المقياس واحداً على ثمانين ألفاً من قطر واحدة من شعر الإنسان ويتضح من ذلك أنه مقدار شديد الصغر، حيث يمكن ترتيب حوالى ثمانى ذرات بجانب بعضها البعض في نانومتر واحد، ويهتم هذا العلم بتصنيع الآلات، والأدوات، والمواد إلى الدرجة النانوية "المتناهية الصغر، ولا يمكن رؤيتها بالعين المجردة، ويمكن مقارنة حجم الجسم" النانوي "بالنسبة للأجسام الصغيرة المرئية بالعين المجردة مثل النسبة بين حجم كرة القدم وحجم الكرة الأرضية (عميش، 2011). وتتمثل قاعدة التقنيات النانوية العلمية في مسالتين هما:

1- بناء المواد بدقة من لبنات صغيرة والحرص على مرحلة الصغر يؤدي الى مادة خالية من الشوائب ومستوى عالٍ من الجودة

2- إن خصائص المواد قد تتغير بصورة مدهشة عندما تتجزأ الى قطع أصغر وأصغر وخصوصا عند الوصول الى مقياس النانو أو أقل عندها قد تبدأ الحبيبات النانوية في إظهار خصائص غير متوقعة ولم تعرف من قبل اي غير موجودة في خصائص المادة الام فمثلا الماس ناتج عن تحول طبيعي للفحم الحجري يتمثل الماس، والفحم الحجري في التركيب الجزيئي، والنزري والفارق الوحيد هو في تغيير موضع الجزيئات والذرات والذي يحدث في الطبيعة عبر ملايين السنين تحت ظروف خاصة من درجة حرارة وضغط ، فاصل الماس هو الفحم الحجري الذي تعرض لظروف التحول وفي عالم النانوتكنولوجي فان هذا يحدث بالضبط من اعادة هيكلة الذرات والجزيئات داخل المادة أو اضافة أو حذف بحيث يكون متوافقا مع قوانين الفيزياء، والكيمياء، فيمكن تحويل الفحم الحجري الى الماس بسهولة ويسر ويمكن ان نحصل على مواد انظف واقيى وأكثر دقة في الأداء وأخف في الوزن ، ترجع البداية الاولى لعلم النانوتكنولوجي الى عالم الفيزياء الامريكي ريتشارد فينمان (1918-1988) Richard Feynmam الذي يعد من ابرز علماء الفيزياء تنبأ فينمان بأن العلماء سوف يتمكنون يوماً ما من صناعة ادوات متناهية الصغر في حجم ذرات التراب ثم يستخدمونها في صنع معدات أصغر، ولقد استخدم مصطلح النانوتكنولوجي لأول مرة في عام 1974 على يد الباحث الياباني نوريو تانيغوتشي Norio Taniguchi ليصف طرائق ووسائل وتصنيع وعمليات تشغيل عناصر ميكانيكية وكهربائية متناهية الصغر(نايفة، 2009).



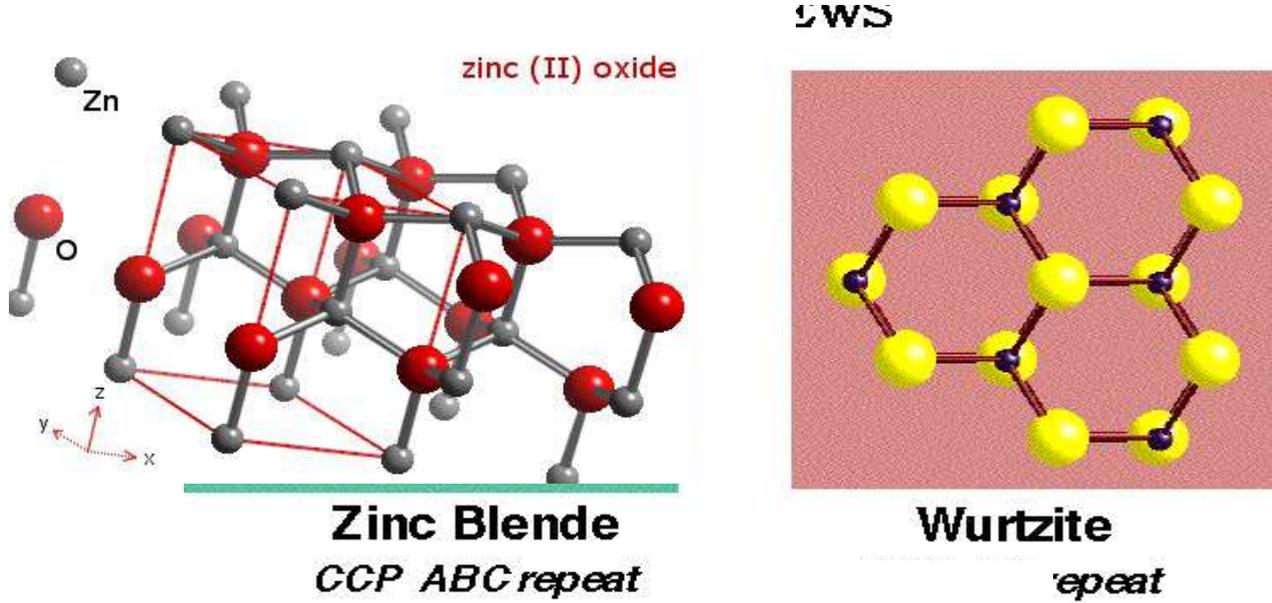
شكل (4) مقارنة بين مقاييس أبعاد عدد من الأشياء المعروفة لنا مقدرة بوحدات قياس أطوال مختلفة ، المتر ،

السنتيمتر ، المليمتر ، الميكرومتر والنانومتر (الاسكندراني ، 2010) .

1-3-2: أوكسيد الزنك النانوي : zinc oxide nanoparticles

أوكسيد الزنك النقي مركب صلب ابيض اللون، يصفر عند التسخين بسبب التشوهات الشبكية، وهو مادة غير سامة(أمن) ، لا يذوب في الماء أو الكحول بل يذوب في حامض الخليك والحوامض المعدنية والامونيا وكاربونات الامونيوم والهيدروكسيدات القلوية ،لذا فهو أوكسيد امفوتيري. تعتمد المختبرات في تحضير أوكسيد الزنك كيميائياً على حرق عنصر الزنك في الهواء او بواسطة التهشم الحراري لكاربوناته أو نتراتة، التركيب

البلوري لأوكسيد الزنك يشبه التركيب البلوري للمجموعة (الثانية - السادسة) أي التركيب السداسي المتراس (Wurtzite) (الدليمي، 2013).



شكل (5) التركيب البلوري السداسي لأوكسيد الزنك النانوي (Hartnagel *et al.*, 1995)

وقام الباحثان سعيد وعبد الله (2009) بتحضير أغشية رقيقة من أوكسيد الزنك المتعدد التبلور على أرضية زجاجية بدرجة حرارة أساس 400 C° وذلك باستعمال تقنية الرش الكيماوي الحراري، تم تحضير محلول الرش من كلوريد الزنك بمولارية مقداره 0.1 M/L . وتم دراسة ومناقشة خواص وتركيب الأغشية المحضرة بحيث تم فحص الأغشية المحضرة بواسطة حيود الأشعة السينية إذ أنّ أوكسيد الزنك (ZnO) نموذج من إحدى أشباه الموصلات ضمن المجموعة II-VI والتي لها مدى واسع في التركيب النانومتري (Nanostructures). وتمكن (Slman, 2012) من الربط بين الفعالية الحيوية للمضادات سيفترايكزون، وكلورامفينكول، والبنسلين ، واموكسيسيلين) على بعض انواع البكتريا السالبة والموجبة لصبغة جرام خلطت الاجسام النانوية لاوكسيد الزنك مع المضادات استخدمت طريقة (الانتشار بواسطة الاقراص). النتائج اوضحت التأثير الايجابي بين كل من الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك والاموكسيسيلين، والبنسلين لأغلب العزلات الموجبة لصبغة جرام وبين الجسيمات النانوية وكل من سيفترايكزون و كلورامفينكول لأغلب العزلات السالبة لصبغة جرام في حين لم يظهر

اي تأثير او تثبيط بين الجسيمات النانوية لأوكسيد الزنك وكل من سيفترايكزون وكلورامفينكول للعزلات الموجبة لصبغة جرام والجسيمات النانوية وكل من البنسلين واموكسيسيلين مع العزلات السالبة لصبغة جرام.

وتمكن (2015) *Tawfeeq et al.* من استخدام أوكسيد الزنك النانوي على خلايا سرطان الغدة البنية للفأر في الزجاج، عوملت خلايا سرطان الغدة البنية للفأر بتركيز مختلفة من معلق أوكسيد الزنك النانوي المصنع لدراسة السمية الخلوية لهذا المعلق على هذه الخلايا وكانت التراكيز المستخدمة بمقدار 25 و 50 و 100 جزء بالمليون، اظهرت نتائج جيدة وقابلة عالية على قتل الخلايا السرطانية، كلما كان تركيز اوكسيد الزنك النانوي عاليا كلما ارتفعت نسبة السمية الخلوية. ودرس (2014) *Al-Ugaili et al.* تأثير إضافة أوكسيد الزنك والمستخلص الخام لأوراق الزيتون الى المضاد الأوكساسيلين المستخدم ضد بكتريا المكورات العنقودية الذهبية المقاومة لمضاد الأوكساسيلين بالاعتماد على قياس قطر التثبيط لوحظ ان مستخلص أوراق الزيتون وبالتراكيز (2.25-9 ملغم/ قرص) لم يكن له اي تأثير مثبت على البكتريا في حال استخدامه بدون أي إضافة ولم يكن له أي تأثير محفز للتأثير المضاد البكتيري لجزيئات الزنك النانوية (100 ميكروغرام/ قرص) عندما استخدم كمزيج. بالرغم من ذلك فإن الفعالية ضد المايكروبية لمضاد الأوكساسيلين قد أظهرت زيادة وبالاعتماد على قطر التثبيط من (0 ملم) الى (14 ملم) عندما قيس بوجود التركيز العالي (9 ميكروغرام/ قرص) لمستخلص أوراق الزيتون مما يسجل تأثيراً محفزاً لفعالية المضاد ضد بكتريا المكورات العنقودية المقاومة للأوكساسيلين.

قام (2010) *Thati et al.* بدراسة تأثير استخدام أوكسيد الزنك كمضاد بكتيري بدون اي اضافة اخرى كما قام بإضافة اوكسيد الزنك مع بعض المضادات ودرس تأثير اوكسيد الزنك على بكتريا المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* بواسطة طريقة الانتشار القرص *Disk diffusion method* لاحظ عند استخدام *zinc nanoparticles (100µg/disc)* زيادة فعالية المضادات من اقل قطر تثبيط من (2mm to 10mm) وهذه الزيادة لوحظت مع المضادات *Penicillin G and Amikacin* من هذه النتيجة تتضح اهمية الدقائق النانوية للزنك كمادة قوى مع *beta lactams, cephalosporins* .

درس (Yehia and Ahmed, 2013) فعالية الدقائق النانوية لأوكسيد الزنك على إنتاج السمين الفطريين *F. oxysporum* and *P. expansum* mycotoxins fusaric acid and patulin المنتجين من الفطرين *F. oxysporum* and *P. expansum* لاحظنا أن هناك انخفاضاً في إنتاج هذه السموم عن معدلات إنتاجها الطبيعية كما لاحظنا أن هناك عاقبة في تكوين الغزل الفطري mycelia لكلا الفطرين .

ودرس (Lili et al., 2011) تأثير استخدام الدقائق النانوية على *Botrytis cinerea* قبل حصاد النبات ادى الى تغيير الوظائف الخلوية للهايفات الفطرية ومنع تكوين الحامل الكونيدي والكونيديات فاقترحنا استخدام كمييد فطري في الزراعة وامن في الأغذية. وركزت دراسة حول تأثيري لأوكسيد الزنك النانوي كقاتل وسام بكتيري من خلال دراسة قامت بها (Amna et al., 2015) لما للبكتريا من حجم صغير فاستخدام أوكسيد الزنك النانوي ليزيد المساحة السطحية للتفاعل لاحظوا تأثير الزنك على الجدار الخلوي، الغشاء البلازمي منع حركة البروتون من خلال الغشاء الخلوي وفي النهاية يؤدي الى تثبيط النمو وموت البكتريا. وتم دراسة تأثير الزنك اوكسيد على خواص شد المطاط الطبيعي والصناعي الاتية من

(قوة الشد Tensile Strength، معامل المرونة Elastic Modulus والاستطالة Elongation) حضر عينات من المطاط الطبيعي NR والمطاط الصناعي SBR بنسب متساوية للتعرف عن امكانية استبدال اوكسيد الزنك الاعتيادي بأوكسيد الزنك النانوي كمادة منشطة ذات حجم دقائق اصغر ومساحة سطحية اكبر لتقليل كمية الزنك المستخدم والحصول على نتائج جيدة من قوة شد ومرونة للمطاط فبينت نتائج الفحص ان التركيز الأمثل لمادة اوكسيد الزنك الاعتيادي للعجنات المطاطية لكل من المطاط الطبيعي NR والمطاط الصناعي SBR (بنسب متساوية) وللحصول على خواص شد افضل هو (5 pphr) في حين أن التركيز الأمثل لمادة اوكسيد الزنك النانوي للعجنات المطاطية المكونة من المطاط الطبيعي NR والمطاط الصناعي SBR (بنسب متساوية) وللحصول على خواص شد افضل هو (1.2 pphr)، من خلال النتائج المتحصلة تم الحصول على مجموعة من الميزات ابرزها تحقيق جدوى اقتصادية من خلال تقليل كلف العجنات اضافة الى تحسينه خواص الشد (2015 Hadi,). وقام (Nawaz et al., 2011) باستخدام دقائق اوكسيد الزنك في دباغة الجلود للسيطرة على بعض عوامل الامراض التي تنقلها الجلود الى الانسان

الفصل الثالث

3: المواد وطرائق العمل: Materials and methods

1-3: الأجهزة والمعدات المستخدمة:

1-1-3: الأجهزة :

جدول (1) الأجهزة والادوات المختبرية التي استخدمت في الدراسة.

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم الجهاز	
USA	BioRad	Miniopticon Real-Time PCR	جهاز البلمرة في الوقت الحقيقي
Italy	Eriotti	Electric oven	فرن كهربائي
Japan	Hirmayama	Autoclave	المؤصدة
England	Gallen Kaamp	Incubator	حاضنة
Lebanon	Concord	Refrigerator	ثلاجة
England	Gallen Kaamp	Sensitive electronic balance	ميزان الكتروني حساس
Germany	Memmert	Water bath	حمام مائي
Canada	Biobasic	Eppendorf tubes	أنابيب اختبار
USA	BBL	Conical flasks	دوارق مخروطية
China	CYAN	Vortex	مازج

Korea	Bioneer	Thermo cycler apparatus (PCR)	جهاز الدورات الحرارية
United Kingdom	THERMO	Nano drop spectrophotometer	مطياف قياس النانوميتر
Korea	Bioneer	Exispin vortex centrifuge	جهاز الطرد المركزي الهزاز
Germany	Eppendorf	High speed cold centrifuge	جهاز الطرد المركزي المبرد العالي السرعة
Germany	Eppendorf	Micropipette 0.5–10, 20–200, 100–1000 Micromoles	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Japan	Olympus	Compound microscope	مجهر ضوئي
India	Himedia	Cork borer	ثاقب فليني
Turkey	Nüve	Laminar flow cabinet	كابينة الزرع المجهري
India	Himedia	Standard wire loop) (1μ	الناقل الزراعي القياسي
United Kingdom	Sterilin	Disposable petri dishes	أطباق بتري بلاستيكية
Thailand	Sempermed	latex gloves	كفوف
China	Winner	face mask	كمام

India	Supertek	slides	شرائح زجاجية
China	Sail brand	cover slide	غطاء الشريحة الزجاجية
German	Macherey-nagel	filter paper	ورق ترشيح
Thailand	Sony	Digital camera	كاميرا رقمية

3-1-2: المواد

1: المواد الكيميائية:-

جدول (2) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة.

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم المادة الكيميائية	
England	BDH	Ethanol	إيثانول
England	BDH	Isopropanol	إيزوبروبانول
Korea	Bioneer	DEPC	ثنائي إيثيل بايرو كاربون
Korea	Bioneer	Free nuclease water	ماء خاص لل PCR
England	BDH	Glycerol	جليسرول

China	Hongow nanometer	zinc oxide nanoparticles <50 nm Purity 99.8%	او كسيد الزنك النانوي قطر <50 nm نقاوة 99.8%
-------	---------------------	---	---

2: الصبغات :-

جدول (3) الصبغات المستخدمة في الدراسة.

المنشأ	الشركة المصنعة	الصبغة	
India	cdh	Lactophenol blue	صبغة اللاكتوفينول الزرقاء
German	Syrbio	Methylene blue solution	صبغة المثيل الزرقاء

3: المضادات الحيوية :-

جدول (4) المضادات الحيوية المستخدمة في الدراسة.

المنشأ	الشركة المصنعة	اسم المضاد	
India	Brawn	Chloramphenicol	الكلورامفينيكول
Jordan	International Co.Amman	Ketoconazole	كيتوكونازول

4: العدد :-

جدول (5) العدد التي استخدمت في الدراسة.

الشركة وبلد المنشأ	مكوناته	اسم العدة	ت
Bioneer (Korea)	Trizol Reagent 100ml	عدة استخلاص الحامض النووي AccuZol™ Total RNA Kit Extraction	1
Bioneer (Korea)	<ul style="list-style-type: none"> - RocketScript Reverse Transcriptase (200 u) - 5× Reaction Buffer (1×) - DTT (0.25 mM) - dNTP (250 μM each) - RNase Inhibitor (1 u) 	عدة فحص AccuPower® RocktScript RT PreMix	2
Bioneer	2× Greenstar Master mix	عدة فحص AccuPower® 2×	3

(Korea)	-8 Well strips × 12 each	Master Greenstar qPCR Mix	
	-DEPC – D.W. 1.8 ml × 4 tubes		
BioBasic (Canada)	DNase I enzyme	DNase عدة انزيم DNase I enzyme set kit	4
	10X buffer		
	Free nuclease water		

5: البادئات primers:

تم تصميم هذه البادئات في هذه الدراسة باستخدام موقع NCBI GenBank Data وباستخدام برنامج تصميم البادئات Primer3 plus . وقد تم تجهيز هذه البادئات من قبل شركة بايونير الكورية كما في الجدول أدناه:

جدول (6) بادئات الـ DNA والتي تم تجهيزها من شركة Bioneer (Korea)

المصدر	حجم الناتج bp	تسلسل القواعد النيروجينية (3'→5')		اسم البادئ
تم التصميم لهذه التجربة	127bp	F	TTGTCCACCGCAAGTGTTTC	Act1
		R	AATCCACCCACCGCAATTTC	
	143bp	F	ATTCTCGCGATTTGGAAGGC	pcbAB
		R	TGGCGTTCACATTTCGAAGC	
	147bp	F	TGGCACACATCACCAACAAC	pcbC
		R	TCTTGCCGTCTTCCTTGCTAG	
	85bp	F	ATTCGCGGTATTGCAAAGGG	penDE
		R	TGAGCCCGTATGCAAATTCC	

F: Forward البادئ الامامي ، R : Reverse البادئ العكسي

3-2: طرائق العمل :

3-2-1: الاوساط الزرعية :

1: وسط سابرويد دكستروز أكار مع الكلورامفينيكول

Sabouraud's Dextrose Agar with Chloramphenicol (SDAC)

تم تحضير الوسط الزرعى بإذابة 65 غم من مسحوق سابرويد دكستروز أكار المجهز من قبل شركة Himedia الهندية في 1000 مل من الماء المقطر ثم رُج جيداً وسُخن حتى الغليان وبعدها عُقم بدرجة حرارة 121م تحت ضغط 15 باوند / 1انج2 لمدة 15 دقيقة. ثم برد إلى درجة حرارة 45 م بعدها أضيف إليه 0.25 غم من المضاد البكتيري الكلورامفينيكول ثم تم اكمال الحجم الى 1000 مل بعدها وُزِع في أطباق معقمة واستُخدم لعزل الفطريات (Ellis,1994).

2: وسط مرق السابرويد Sabouraud's Dextrose-Broth(SDB)

تم تحضير الوسط الزرعى بحسب تعليمات الشركة المجهزة Himedia الهندية بإذابة 30 غم من مسحوق مرق السابرويد دكستروز في 1000 مل من الماء المقطر ثم رُج جيداً، وسُخن حتى الغليان وبعدها عُقم بدرجة حرارة 121 م تحت ضغط 15 باوند / 1انج2 لمدة 15 دقيقة. ثم برد إلى درجة حرارة 45 م ثم تم اكمال الحجم الى 1000 مل بعدها وُزِع في دوارق معقمة لاستخدامه في التجارب اللاحقة.

3: وسط الزابكس أكار Czapeks Agar (CZA) : تم تحضير الوسط بحسب تعليمات الشركة المصنعة

الانجليزية Oxoid بإضافة 45 غرام لكل 1000 مل من الماء المقطر ثم رُج جيداً وسُخن حتى الغليان وبعدها عُقم بدرجة حرارة 121 م تحت ضغط 15 باوند / 1انج2 لمدة 15 دقيقة. ثم برد إلى درجة حرارة 45 م ثم تم اكمال الحجم الى 1000 مل بعدها وُزِع في أطباق معقمة واستُخدم في تشخيص الفطريات .

3-2-2: تحضير مضاد الكيتوكينازول :

تمّ إذابة 20 ملغم من المضاد الفطري في 100 مل من الوسط الزراعي المحضر قبل ان يبرد ثم رجّ جيداً ليتمّ تحضير (20%) من المضاد الفطري كعامل سيطرة موجب ثم اكمال الحجم الى 100 مل واستخدم في تجارب النمو الشعاعي والوزن الجاف.

3-2-3: تحضير التراكيز المختلفة لأوكسيد الزنك النانوي :

تم تحضير التراكيز المختلفة لأوكسيد الزنك النانوي بإذابة (3 ، 6 ، 12) ملغم من اوكسيد الزنك النانوي في 100 مل من الوسط الزراعي لكل تركيز ليتم تحضير التراكيز المستخدمة في البحث (3% ، 6% ، 12%) (Lili *et al.*,2011).

3-2-4: جمع العينات :

جمعت (193) عينة قشع سريرية من المرضى المصابين بالتهابات تنفسية والذين راجعوا العيادة الشعبية للأمراض الصدرية في محافظة ميسان للفترة من 2015/10/1 الى 2016/4/1 ، تم جمع العينات صباحاً ولجميع المرضى المراجعين خلال تلك الفترة وكانت العينات لأعمار مختلفة ولكلا الجنسين وقد طلب من المرضى ان يقوموا بغسل الفم بالماء المقطر ثلاث مرات وجمعت باستخدام حاوية جمع عينات القشع المعقمة ثم نقلت الى المختبر لإجراء الاختبارات عليها.

3-2-4-1: الفحوص المختبرية :

1- الفحص المجهرى المباشر:- تم فحص العينات مجهرياً وذلك بوضع مسحة من القشع على شريحة زجاجية نظيفة تحتوي على قطرة من اللاكتوفينول ثم وضع غطاء الشريحة وفحصت

العينات تحت المجهر على قوة 10X ثم 40 X لملاحظة الغزل الفطري والتراكيب الفطرية الاخرى (Finegold and Marti ,1982).

2: زرع العينات : أخذ جزء من القشع بواسطة الناقل وخطط على سطح الأطباق الحاوية على وسط السابرويد اكار والمحضّر مسبقاً وبواقع ثلاثة مكررات لكل عينة وحضنت بدرجة حرارة 28°C ولمدة سبعة ايام مع مراقبة ظهور النمو فيها (Oldes,1975).

3-2-4-2: تشخيص الفطريات: شخّصت الأنواع المعزولة من العينات النامية على وسط SDA بالاستعانة

بالصفات المظهرية للمستعمرات وباستخدام أوساط زرعية للتشخيص وهو CZA لكل عزلة من حيث شكل المستعمرة ولونها ونسيجها وقطرها وحوافها وارتفاعها عن سطح الوسط بالإضافة الى الصبغات التي تنتجها اضافة الى الصفات المجهرية لكل عزلة من حيث الهيافات الفطرية والحوامل والابواغ وغيرها من الصفات المظهرية ومقارنتها مع الصفات التي اورد ذكرها كلاً من (De-Hoog *et al.* and Hocking,1997 ; Quinn *et al.*, 2002 *al.*,2000 ; Pitt

3-2-5: حفظ العزلات :

بعد تشخيص العزلات الفطرية التي تم الحصول عليها من القشع حفظت العينات على وسط السابرويد الصلب SDA الموضوع بصورة مائلة Slant داخل قناني بلاستيكية صغيرة سعة 25 مل ثم حضنت بدرجة حرارة 28°C لمدة اسبوع ثم اضيف اليها الكليسرول وحفظت بدرجة حرارة $(20-)^{\circ}\text{C}$ لحين الاستعمال (Ashoor and Abu Baker, 2003).

3-2-6: تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي لفطر البنسليوم :-

تم اختبار تأثير مادة اوكسيد الزنك النانوي على نمو الفطر، إذ تم تنشيط العينات بعمر سبعة ايام تم تحضير الاطباق الزرعية بواقع ثلاث مكررات من الوسط الزراعي بدون اي اضافة كعامل سيطرة سالب وثلاث مكررات من الوسط الزراعي المضاف اليه المضاد الفطري كيتوكونازول (Ketoconazole) بتركيز (20%) كعامل سيطرة موجب وكذلك ثلاث مكررات من الوسط الزراعي مضاف اليه مادة اوكسيد الزنك النانوي (zinc oxide nanoparticles) بتركيز مختلفة

هي كالاتي: (3% , 6% , 12%)، ولكل تركيز ثلاث مكررات تم نقل قرص بقطر 5 ملم من مزارع نقية للفطر بعمر سبعة أيام باستخدام الثاقب الفليني ووضعت الأطباق جميعا في الحاضنة بدرجة حراره 28 م° لمدة سبعة أيام وتمّ قياس معدل النمو الشعاعي للمستعمرات بعد وصول نمو مستعمرات الفطر معاملة المقارنة (بدون اي اضافة) الى حافة الطبق وتمّ حساب مقدار النمو الشعاعي بأخذ معدل قطرين متعامدين للمستعمرات النامية على وفق المعادلة التي ذكرها كل من (Jinantana and Sariah,1997).

$$P/RG = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

P/RG=percent inhibition of radial growth

R_1 = اعلى نمو شعاعي للمستعمرة الفطرية في معادلة المقارنة

R_2 = اعلى نمو لمستعمرة الفطر في الاطباق المعاملة

3-2-7: تأثير اوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف لفطر البنسليوم :

لمعرفة تأثير مادة أوكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف لفطر البنسليوم استخدمت دوارق مخروطية سعة 250

مل وقد وضع في كل منها 50 مل من وسط مرق السابرويد (SDB) آذ تم تحضير ثلاثة تراكيز من اوكسيد

الزنك النانوي وهي: (3% ، 6% ، 12%) بواقع ثلاث مكررات لكل تركيز وايضا ثلاث مكررات من المضاد

الفطري كيتوكينازول بتركيز (20%) كعامل سيطرة موجب وثلاث مكررات من الوسط الغذائي بدون اي معاملة

كعامل سيطرة سالب تم نقل قرص بقطر 5 ملم من مزارع نقية للفطر بعمر سبعة أيام باستخدام الثاقب الفليني

ووضعت الدوارق جميعا في الحاضنة بدرجة حرارة 28 م° لمدة سبعة ايام بعدها تم ترشيح الدوارق لكل مكرر على

ورق الترشيح معقمة معلومة الوزن ثم جففت في الفرن بدرجة حرارة 60°م لمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم قياس الوزن الجاف لكل فطر باستعمال ميزان حساس (Pinto *et al.*,2001).

8-2-3: تأثير أوكسيد الزنك النانوي على الجينات المسؤولة عن إنتاج البنسلين (*pcbAB,pcbC,penDE*):

لاختبار تأثير مادة أوكسيد الزنك النانوي على الجينات المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين (*pcbAB, pcbC, penDE*) في عزلات فطر البنسليوم الثلاثة لكل من

النوع (1) *P. chrysogenum* وكذلك النوع (2) *P. chrysogenum* والنوع *P. citrinum* تم استخدام دوارق سعة 250 مل بواقع ثلاث مكررات للسيطرة السالبة وثلاثة مكررات للمعاملة بأوكسيد الزنك النانوي بتركيز 12% لكل من الأنواع الفطرية الثلاثة وتم نقل قرص بقطر 5 ملم من الانواع فطر البنسليوم المعزولة وتم الحضان لمدة سبعة ايام بعدها تم تصميم تجربة تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي وإجرائها كالاتي :

9-2-3: فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)

Quantitative Reverse Transcription Real–Time PCR(RT–qPCR)

تم اجراء فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي)، وذلك لقياس المستويات الكمية للحمض النووي المراسل (mRNA) لدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجينات (*pcbAB, pcbC, penDE*) وكذلك تم استخدام جين ال (*Act1*) كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني.

تمَّ إجراء هذا الفحص بحسب طريقة (Martín, 2000)

كما في الخطوات الآتية:

1-9-2-3: استخلاص الحامض النووي RNA : Total RNA extraction

تم استخلاص الحمض النووي Total RNA وذلك باستخدام عدة ال Trizol kit المجهر من قبل شركة بايونير الكورية ولقد تم العمل بهذا العدة بحسب تعليمات الشركة المصنعة كما في الخطوات الآتية:

1- تم أخذ 50mg من نماذج النمو الفطري لعزلات الفطر كلاً على حدة وسحقت جيداً باستخدام النتروجين السائل، ومن ثم وضعت في أنبوبة قياس 1.5 مل ثم تم إضافة 1 مل من محلول ال Trizol ومزجت جيدة لمدة دقيقتين.

4- أضيف 200 مايكرو لىتر من ال chloroform لكل عينة من العينات وعمل لها رج لمدة 15 دقيقة بواسطة vortex .

5- حضن الخليط في الثلج لمدة 10 دقائق

6- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة.

7- نقلت الطبقة العليا (الشفافة) الى أنبوبة ايندروف جديدة بواسطة micropipette وأضيف اليها كميته متساوية من isopropanol alcohol وقلبت الأنبوبة 4-5 مرات باليد.

8- حضنت العينات بدرجة حرارة -20م لمدة 10 دقائق .

9- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي 12000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق ثم تم التخلص من الطافي وأخذ المترسب pellet.

10- أضيف للمترسب 1 مل من ethanol alcohol بتركيز 80% ورج باستمرار بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق حيث يتم التخلص من الجزء الطافي وأخذ الجزء المترسب pellet.

11- جفف المترسب بتركه بدرجة حرارة (60-55) م° ولمدة 10 دقائق بعد ذلك حفظ الحمض النووي RNA المستخلص في درجه حراره -70 م°.

3-2-9-2: قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوسومي الكلي :

Assessing of RNA yield and quality

تم الكشف عن الحمض النووي RNA المستخلص وذلك من خلال استخدام جهاز خاص Nanodrop spectrophotometer وذلك من تحديد تركيز الحمض النووي الرايبوسومي RNA بوحدات نانوكرام /مل و قياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي (260/280) نانوميتر على النحو الآتي:

1- بعد تشغيل جهاز Nanodrop spectrophotometer تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع RNA.

2- يصفر الجهاز وذلك بوضع 2 مايكروليتر من (Free nuclease water) باستخدام Micropipette معقمة على سطح ركيزة المقياس وإجراء التصفير ونظف الركيزة باستخدام أوراق تنشيف لقياس العينات.

3- يضغط على مفتاح الاختيار ok لبدء عملية قياس تركيز ال RNA وذلك باستخدام 1 مايكروليتر من كل عينة من ال RNA المستخلص وتقرأ النتيجة ثم نظفت ركيزة المقياس للجهاز مرة اخرى لقياس العينة الأخرى.

4- حددت نقاوة عينات ال RNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280) نانوميتر إذ ان الحمض النووي RNA المستخلص يعتبر نقياً عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (2).

3-2-9-3: المعاملة بأنزيم DNase I Treatment

تم معالجة مستخلص الحمض النووي الرايبوسومي RNA باستخدام Dnase I وذلك للتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص وذلك بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم كما في الجدول الآتي:

جدول (7) مكونات مزيج أنزيم DNase I

Mix	Volume
Total RNA 100ng/ul	10ul
DNase I enzyme	1ul
10X buffer	4ul
DEPC water	5ul
Total	20ul

بعد ذلك تم حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37م لمدة 30 دقيقة، وبعدها أضيف 1 ميكرو ليتر من مادة ال EDTA وحضنت أيضا بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 م لمدة 10 دقائق وذلك لتنشيط فعل الانزيم.

3-2-9-4: تصنيع شريط الDNA المتمم: cDNA synthesis

تم استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل لل DNA من عينات الحمض النووي ال RNA المستخلص باستخدام عده Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من قبل شركة بايونير الكورية. وتم اجراء هذه العملية بحسب طريقة عمل العدة كما في الجدول الآتي:

جدول (8) مكونات مزيج تصنيع الـ cDNA

RT master mix	Volume
Total RNA 100ng/ul	10ul
Random Hexamer primer 10pmol	1ul
DEPC water	9ul
Total	20ul

بعد ذلك تم اضافة مكونات مزيج RT master mix التي ذكرت في الجدول المذكور آنفاً الى انابيب عدة cDNA synthesis والحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcription ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي الهزاز (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000 rpm لمدة ثلاث دقائق. بعد ذلك تم نقل الانابيب الى جهاز الدوار الحراري Thermocycler وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA بحسب طريقة عمل العدة كما في الجدول الآتي:

جدول(9) الظروف الحرارية لعملية تصنيع الـ cDNA

Step	Temperature	Time
cDNA synthesis (RT step)	50 °C	1 hour
Heat inactivation	95 °C	5 minutes

بعد ذلك نقلت العينات وحفظت بدرجة حرارة -20 م° لحين استخدامها في فحص Real-time PCR .

3-2-9-5: تفاعل سلسلة البلمرة الكمي ذو الاستنساخ العكسي

Quantitative Real-Time PCR

تم إجراء فحص الـ qPCR لعينات الـ cDNA لمجاميع التجربة وكذلك باستخدام عدة Accupower 2x Green Star qPCR kit المجهزة من قبل شركة بايونير الكورية، لإجراء هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر (Sybr green) الخضراء والتي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز الـ Real-Time PCR كما يأتي:

تحضير مزيج تفاعل qPCR

جدول (10) مكونات مزيج تفاعل qPCR لجينات الهدف

qPCR master mix		Volume
cDNA template		2.5µL
Primers (10pmol)	Forward primer	1.25 µL
	Reverse primer	1.25 µL
2x green star master mix		25
DEPC water		20 µL
Total		50 µL

بعد ذلك تم اضافة هذه المكونات التي ذكرت في الجداول المذكور آنفاً الى انابيب qPCR الخاصة. ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي الهزاز (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000 rpm لمدة ثلاث دقائق. وبعدها نقلت جميع الانابيب الى جهاز

(MiniOpticon Real-Time PCR . BioRad.USA) وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR

Thermocycler conditions لكل الجينات بحسب طريقة عمل العدة كما في الجدول الاتي:

جدول (11) الدورات الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل الجينات.

qPCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	45
Annealing\Extension Detection(scan)	58 °C	30 sec	
Melting	60-95°C	0.5 sec	1

6-9-2-3: طريقة تحليل بيانات: Real-Time PCR data analysis

تم القيام بتحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلر في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة livak method والتي وضعت من قبل (Livak and schmittgen, 2001) والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitive) والكمية المطلقة (Absolute Quantitive) من خلال عملية

تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع عينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي كل عينة من عينات الهدف تصحح مع عينة السيطرة لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وكما في المعادلات الآتية :

$$1- \Delta CT (\text{test}) = CT (\text{target ,test}) - CT (\text{ref, test})$$

$$2- \Delta CT (\text{control}) = CT (\text{target ,control}) - CT (\text{ref, control})$$

$$3- \Delta \Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{control})$$

$$4- \text{Gene expression Ratio} = 2^{-CT \Delta \Delta CT} .$$

عتبة الدورة = CT

ΔCT = الاختلاف في عدد حد عتبة الدورات

Ref = جين المصدر

$\Delta \Delta CT$ = الاختلاف في عتبة الدورة لمجموعة المعاملة ومجموعة السيطرة

$2^{-CT \Delta \Delta CT}$ = الصيغة الاسية لنسبة التعبير الجيني

10-2-3: تأثير الراشح الفطري للنوع (2) *P. chrysogenum* المعامل بأوكسيد

الزنك النانوي بتركز 12% على نمو بكتريا *Staphylococcus epidermidis* :

لاختبار تأثير راشح الفطر بعد المعاملة بأوكسيد الزنك النانوي على نمو بكتريا *Staphylococcus epidermidis* المعروفة بحساسيتها للبنسلين وتم إجراء الاختبار حسب طريقة انتشار الاقراص Antibiotic disk diffusion method (Cruickshank, et al., 1973) كما يلي:

1- تم تنمية فطر البنسليوم النوع (2) *P. chrysogenum* على وسط السابرويد السائل SDB المضاف له

أوكسيد الزنك النانوي بتركيز 12% المحضر مسبقاً حضن الفطر لمدة سبعة ايام بدرجة حرارة $28^{\circ}C$.

- 2- جمع الراشح بترشيح النمو الفطري والابقاء على الراشح بعدها تم عمل أقراص من ورق الترشيح من نوع (Machery-Nagel) وغمرها براشح الفطر الذي تم الحصول عليه لمدة 24 ساعة.
- 3- تمّ الحصول على *Staphylococcus epidermidis* من مختبرات مستشفى الصدر العام في محافظة ميسان المشخصة مسبقاً (حيث كانت سالبة لاختبار (-) Coagulase، وكانت حساسة تجاه (Novobioine (S)
- 4- استخدمت طريقة انتشار الاقراص Antibiotic disk diffusion method لمعرفة مدى حساسية البكتيرية تجاه الراشح الفطري .
- 5- زرعت البكتريا على وسط Muller Hinton بعد ان قورنت عكوره النمو المتكونة مع عكوره محلول ثابت العكوره القياسي والذي يعطي عدداً تقريبياً للخلايا 1.5 x 10⁶ خلية / مل .
- 6- وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37م° بعدها تم قياس قطر التثبيط الموجود حول القرص وتم اجراء نفس الخطوات في حالة معاملة السيطرة ماعدا عدم إضافة أوكسيد الزنك النانوي.

11-2-3: التحليل الاحصائي : Statistical analysis

تم تحليل النتائج احصائيا باستخدام برنامج (SAS Institute,Inc.USA) GraphPad Prism الاصدار الرابع في تحليل نتائج الدراسة الحالية إذ استخدم اختبار تحليل التباين الاحادي لغرض المقارنة بين مجاميع الدراسة لكل من النمو الشعاعي والوزن الجاف والتعبير الجيني، واختبرت معنوية الفروق بين المتوسطات بواسطة اختبار اقل فرق معنوي (LSD) Least significant differences لهذا الغرض وقد بنيت مستوى الاحتمالية عنده 5% (Motulsky ,2003).

4-1: العزل :

جمعت (193) عينة من المرضى المراجعين الى العيادة الشعبية للأمراض الصدرية في محافظة ميسان للفترة من 2015/10/1 الى 2016/4/1، إذ كان عدد المراجعين الى العيادة الشعبية خلال تلك الفترة (193) مراجع توزعوا الى (165) ذكر و(28) أنثى، إذ بينت نتائج الفحوصات المخبرية (الفحص المجهرى والزرع) ان نتائج الزرع كانت 118 عينة سالبة النمو الفطري بنسبة 61.14% بينما 75 عينة تحتوي على نمو فطري بنسبة 38.86% ، وقد كانت اكثر الاصابات حدوثا في الرجال بسبب ظروف العمل الذي يمارسونه وكثرة العينات التي عزلت مقارنة مع النساء اللاتي راجعنا وطبيعة عمل المرأة ، ففي الجدول (12) قد كان اكثر الفطريات تواجداً هو *Aspergillus spp.* بواقع 41 عينة بنسبة 21.24% من المجموع الكلي للعينات وبالغلة 193 وبنسبة تكرار 54.66% من المجموع الكلي للعزلات الفطرية الموجبة وبالغلة 75 عزلة فطرية وتعتبر الأنواع التابعة لهذا الجنس ممرضة انتهازية (Opportunistic pathogenic) تنتشر بكثرة في التربة والهواء ، وتتمكن من النمو في أي وسط حي ، وتحدث الإصابة بها نتيجة لاستنشاق الابواغ Airbone إذ تتمكن من الوصول إلى الرئة بأضعف تيار هوائي نتيجة لحجمها الصغير، والتي تؤدي إلى حدوث داء الرشاشيات الرئوي (Pulmonary aspergillosis) (اسماعيل ، 2008) وهي نسبة لا تتفق مع النسب التي حصل عليها عبود (2009) في الدراسة التي قام بها من عزل وتشخص بعض أنواع الفطريات المرافقة لإفرازات القناة التنفسية في مدينة الناصرية والتي كانت 45.56% ولا تتفق هذه النسبة مع ما حصلت عليه العميد(2000) إذ كانت النسبة التي حصلت عليها 42% في دراستها التي قامت بها عن دراسة في وبائية عفن الرشاشيات الدخلاء *Aspergillus fumigatus* في الانسان.

وقد كانت اقل من النسبة التي سجلتها الربيعي (2001) فقد سجلت 74% اصابة. وقد وجد ابراهيم (2006) ان اعلى نسبة للإخماج كانت بسبب الجنس *Aspergillus spp.* في الدراسة التي قام بها من الدراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبياً ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري فقد عزل 31 عزلة من مجموع 100 عينة تابعة الى فطر *Aspergillus spp.* بسبب التفاوت في النتائج يعود لاختلاف مكان جمع العينات والى نوع المجتمعات التي جمعت منها العينات وطبيعة العمل الذي يمارسونه والفترة الزمنية التي جمعت فيها العينات واختلاف اعداد العينات التي جمعت ويعتبر فطر *Aspergillus spp.* أحد الفطريات التي تصيب الرئة ويسبب مرض Pulmonary Aspergillosis وان الإصابات التنفسية المختلفة مثل الإصابة بالتدرن الرئوي الذي يسبب تثبيطاً مناعياً يزيد من نسب الإصابة بهذا العفن (Cramer, 1999) كما ان الأشخاص الذين يعانون من مشاكل صحية تزداد قابليتهم للإصابة بالعفن خاصة الذين يعانون من انخفاض المناعة لديهم أو المثبطين مناعياً نتيجة علاجهم بعقار الكورتيكوزون أو العلاج لمدة طويلة بالمضادات الحيوية (Patterson, 2004).

يأتي في المرتبة الثانية *Candida spp.* بواقع 18 عينة بنسبة 9.33% من مجموع الكلي للعينات والبالغة 193 وبنسبة تكرار 24% من المجموع الكلي للعزلات الفطرية الموجبة والبالغة 75 عزلة فطرية وهي نسبة لا تتفق مع ما حصل عليه عبود (2009) فقد كانت النسبة التي حصل عليها هي 22.79% وكانت اعلى من النسبة التي سجلتها الربيعي (2001) فقد سجلت 0.04% وتعتبر خميرة *Candida* من المستوطنات الطبيعية في تجويف الفم مما يفسر ظهور الخمائر بأعداد عالية (الشبلي، 2006)، وسبب الاختلاف ربما حصل نتيجة اختلاف الفترة الزمنية التي جمع فيها الباحث وعدد العينات التي جمعها و مكان الجمع وان أكثر العينات التي جمعت هي لمرضى كبار السن والذين اكثرهم مصابين بداء السكري والذي شجع على نمو هذه الفطريات الانتهازية.

يأتي فطر *Penicillium* spp. في المرتبة الثالثة بواقع 14 عينة بنسبة 7.25% من مجموع الكلي للعينات والبالغة 193 وبنسبة تكرار 18.67% من المجموع الكلي للعزلات الفطرية الموجبة والبالغة 75 عزلة فطرية ولا تتفق مع النسبة التي سجلها عبود (2009) إذ كانت النسب التي حصل عليها 12.6%.

وقد اشار (Hamad,1998) ان الفطر *Penicillium dupontii* من الفطريات التي لها القدرة على تحمل مدى واسع من درجات الحرارة وهذا ما يبرر ظهوره في معظم فصول السنة لذلك من الممكن ان تحصل الإصابة به على طول السنة . وكانت قريبة الى النسبة التي حصلت عليها المحنة (2014) من دراسة عزل وتشخيص الفطريات المسببة لخمج الجيوب الأنفية واختبار حساسيتها الدوائية تجاه بعض المضادات الفطرية إذ كانت نسبة الإصابة الفطرية 45.36% و منها *Pencillium* spp. بنسبة 18.18% وقد كانت أكثر الإصابات في الأشهر الباردة من السنة وأعلى نسبة إصابة سجلت لدى المصابين من المناطق الحضرية بنسبة 52.27% مقارنة بسكان المناطق الريفية بنسبة 47.72% وكان هناك علاقة للإصابة مع الأمراض المزمنة .

وكان اقل الفطريات توجد هما *Rhizopus* spp. ، *Alternaria* spp. عزلة واحدة لكل منهم بنسبة 0.52% من مجموع الكلي للعينات والبالغة (193) وبنسبة تكرار 1.33% من المجموع الكلي للعزلات الفطرية والبالغة 75 عزلة فطرية لكل منهم.

وعلى مستوى الأنواع المعزولة فمن خلال النتائج المسجلة ففي حالة الجنس *Aspergillus* spp.

سجل النوع *A. fumigatus* نسبة 25.33% وتلاه النوع *A. niger* بنسبة 18.67% في حين سجل النوع *A. flavus* بنسبة 10.67% . لا تتفق مع النتائج التي حصلت عليها العميد (2000) حول دراسة في وبائية عفن الرشاشيات الدخلاء *Aspergillus fumigatus* في الإنسان فقد سجلت *A. fumigatus* بنسبة 8% و *A. niger* بنسبة 4% و *A. flavus* بنسبة 2% . ولا تتفق مع النسب التي حصل عليها عبود (2009) فقد سجل النوع *A. niger* اعلى نسبة للإصابة فقد كانت 25% .

وبالنسبة للجنس *Candida spp.* فقد كان عدد العزلات 18 عزلة للنوع *Candida albicans* بنسبة 24% من مجموع العزلات الفطرية لا تتفق مع ما سجله الجناحي (2012) في الدراسة التي قام بها حول الفطريات المعزولة من مرضى الأخماج الرئوية في مدينة الديوانية فقد سجل 27,45% عزلة. ولا تتفق مع النسب التي حصل عليها عبود (2009) فقد سجل نسبة 44,44% . ولا تتفق مع ما سجلته الربيعي (2001) إذ سجلت أعلى نسبة للإصابة بـ *Candida albicans* كانت 79,6,37% . أما على مستوى أنواع جنس فطر *Penicillium spp.* كانت عدد العزلات 14 عزلة فطرية بنسبة 7.25% وكان النوع (*Penicillium chrysogenum* (2) أكثرها شيوعاً وبلغت نسبة العزلات 9.33% وجاء بعدة (*Penicillium chrysogenum* (1) بنسبة 6.67% في حين سجل النوع *Penicillium citrinum* نسبة 2.67% من مجموع العزلات الفطرية. في حين سجل الفطران *R. stolonifer* , *Alternaria alternata* أقل نسبة إذ بلغت 1.33% لكل واحد منهم من مجموع العزلات الفطرية ويعد الفطر اللاقحي من الاصابات الفطرية الانتهازية الناتجة عن الاصابة بـ *R. stolonifer* التي ينتج عنها اصابة رئوية ترتبط بالتهاب الغدد اللمفاوية Lymphoma (Tortora et al.,2002) وان الفطار العفني Mucormycosis إصابة نادرة الحدوث مالم يتوفر لها عامل مهيبى يعمل على إحداث خلل في آليات دفاع الجسم ضد هذا النوع من الإصابة الفطرية التي يطلق عليها تسميات أخرى مثل الفطار اللاقحي (Zygomycosis) والفطار الاشنوي phycomycosis ويعتبر *Rhizopus* من المسببات الرئيسية للفطار العفني لدى المرضى المنخفضي المناعة مثل: مرضى داء السكري، والفشل الكلوي، ومرض السرطان، وبعد داء السكري من اهم العوامل المهيئة للإصابة بالفطار العفني إذ تتفرد مسببات الفطار العفني عن باقي مسببا الأخماج الفطرية الأخرى بميلها الشديد لغزو الأوعية الدموية مسببة قلة في تجهيز الدم وفقر دم وتخرنا نسيجيا (Ellis,1994). وقد تحدث الإصابة نتيجة الى استنشاق أبواغ الفطر والتي يعقبها تخثراً دمويّاً في الأوعية الدموية وبعدها حدوث نزف واحتشاء نسيج الرئة ولعل أكثر الاشكال حدوثا يشاهد لدى الأشخاص الذين يعانون من نقص في خلايا الدم البيضاء

(Ibrahim et al.,2003;Rinaldi ,1989).

جدول (12) النسب المئوية لظهور الأنواع الفطرية المعزولة.

النسبة المئوية للتكرار %	مجموع عزلات الجنس الواحد	عدد العزلات	نوع الفطر المعزول
25.33	41	19	<i>Aspergillus fumigatus</i>
18.67		14	<i>Aspergillus niger</i>
10.67		8	<i>Aspergillus flavus</i>
24	18	18	<i>Candida albicans</i>
16	14	12	<i>Penicillium chrysogenum</i>
2.67		2	<i>Penicillium citrinum</i>
1.33	1	1	<i>Rhizopus Stolonifer</i>
1.33	1	1	<i>Alternaria alternata</i>
%100	75	75	المجموع الكلي للعزلات الفطرية

4-2: تأثير أوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي لأنواع فطر البنسليوم :

4-2-1: تأثير أوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع (1) *P. chrysogenum*

تبين النتائج الموضحة في الجدول (13) ان في حالة التركيز 3% كان معدل قطر منطقة النمو الشعاعي

2.36±0.03 سم وهي نسبة مقارنة الى معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة السالبة، وفي حالة التركيز

6% كان معدل النمو 2.03 ± 0.16 سم وهي ايضا مقارنة الى معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة السالبة، اذ بلغ معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة السالبة 2.13 ± 0.03 سم. في حين التركيز 12% كان اكثر التراكيز تحفيزاً للنمو اذ بلغ معدل قطر منطقة النمو الشعاعي 2.63 ± 0.23 سم و هي نسبة اعلى من معدل قطر منطقة النمو في حالة السيطرة السالبة وعند مقارنة التراكيز الثلاثة 3% ، 6% ، 12% مع النمو المثبّت للعينة المعاملة بالمضاد الفطري كيتوكينازول المستخدم كعامل سيطرة موجب نلاحظ هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 واضحة اذ كان معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة الموجبة 0.93 ± 0.06 سم . نلاحظ ان تراكيز اوكسيد الزنك النانوي الثلاثة المستخدمة لم تكن هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 مع السيطرة السالبة في حالة التراكيز 3% و 6% في حين التركيز 12% كان هناك فرق معنوي بمستوى احتمال 0.05 مع السيطرة السالبة إذ نلاحظ حصول زيادة في النمو الشعاعي اعلى من النمو في حالة السيطرة السالبة. فمن التجربة الحالية نلاحظ أن أوكسيد الزنك له أثر محفز على نمو النوع (1) *Penicillium chrysogenum*.

جدول (13) تأثير أوكسيد الزنك النانوي والمضاد الفطري على النمو الشعاعي للنوع (1) *P. chrysogenum*

التركيز	المعاملات	معدل قطر المستعمرات (سم) \pm الخطأ القياسي
-	السيطرة	2.13 ± 0.03^A
20%	المضاد الفطري	0.93 ± 0.06^B
3%	ZnO NP	2.36 ± 0.03^{AC}
6%	ZnO NP	2.03 ± 0.16^A
12%	ZnO NP	2.63 ± 0.23^C

القيم تمثل المعدل لثلاث مكررات \pm الخطأ القياسي ،

الأحرف تمثل القراءة الاحصائية عند مستوى احتمالية 5%

الأحرف المتشابهة بين اي مجموعتين تعني عدم وجود فروق معنوية ($P > 0.05$)

الأحرف المختلفة بين أي مجموعتين تعني وجود فروق معنوية ($p < 0.05$)

4-2-2: تأثير اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع (2) *P. chrysogenium* :

تبين نتائج التجربة الموضحة في الجدول (14) ان في حالة التركيز 3% هناك تحفيز للنمو و زيادة في معدل قطر منطقة النمو الشعاعي عن النمو الطبيعي السيطرة السالبة إذ بلغ معدل قطر منطقة النمو الشعاعي 2 ± 0.3 سم، وكذلك في حالة التركيز 6% هناك تحفيز للنمو و زيادة في معدل قطر منطقة النمو الشعاعي 2.46 ± 0.08 سم وهي اعلى مقدار للنمو من التراكيز الاخرى والتركيز 12% هناك تحفيز للنمو وزيادة في معدل قطر منطقة النمو الشعاعي 2.23 ± 0.32 سم اذ بلغ معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة السالبة 1.9 ± 0.25 سم. وعند المقارنة بين التراكيز 3% ، 6% ، 12% المستخدم فيها أوكسيد الزنك النانوي مع النمو للعينة المعاملة بالمضاد الفطري كيتوكينازول المستخدم كعامل سيطرة موجب نلاحظ هناك فرق معنوي بمستوى احتمال 0.05 إذ كان معدل قطر منطقة النمو الشعاعي للسيطرة الموجبة 0.8 ± 0.11 سم، نلاحظ ان تراكيز أوكسيد الزنك النانوي المستخدمة لم تكن هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 مع النمو الاعتيادي السيطرة السالبة اي حصل تحفيز للنمو وكان هناك زيادة في النمو الشعاعي في جميع التراكيز الثلاثة 3% ، 6% ، 12% المستخدمة من التجربة ان اوكسيد الزنك النانوي له أثر محفز على نمو النوع (2) *p. chrysogenium*

جدول (14) تأثير أوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع (2) *p. chrysogenium*

معدل قطر المستعمرة (سم) \pm الخطأ القياسي	المعاملات	التركيز
1.9 ± 0.25^A	السيطرة	-
0.8 ± 0.11^B	المضاد الفطري	20%
2 ± 0.3^A	ZnO Np	3%
2.46 ± 0.08^A	ZnO Np	6%
2.23 ± 0.32^A	ZnO Np	12%

4-2-3: تأثير أكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع *p. citrinum* :

أظهرت نتائج التجربة الموضحة في الجدول (15) عدم وجود فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 مع السيطرة السالبة للتركيز الثلاثة المستخدمة من مادة أكسيد الزنك النانوي .

ففي حالة التركيز 3% كانت النتائج مقارنة الى السيطرة السالبة فلم تكن هناك فرق معنوي مع السيطرة السالبة اذ بلغ معدل قطر النمو الشعاعي 1.13 ± 0.03 سم، وفي حالة التركيز 6% كان له تأثير تحفيزي أعلى من السيطرة السالبة، إذ بلغ معدل قطر النمو الشعاعي 1.36 ± 0.14 سم اذ بلغ معدل قطر النمو الشعاعي للسيطرة السالبة 1.23 ± 0.08 سم. في حين التركيز 12% كان له اثر تحفيزي مقارنةً مع السيطرة السالبة و كذلك اعلى من التراكيز الاخرى اذ كان معدل قطر منطقة النمو الشعاعي 1.4 ± 0.20 سم، وعند المقارنة مع النمو المثبط المعامل بالمضاد الفطري كيتوكينازول المستخدم كعامل سيطرة موجب نلاحظ هناك فرق معنوي بمستوى احتمال 0.05 اذ كان معدل النمو المثبط بالكيتوكينازول كعامل سيطرة موجب 0.73 ± 0.06 سم من التجربة نلاحظ أن أكسيد الزنك له أثر تحفيز على نمو معدل قطر النمو الشعاعي للفطر *p. citrinum*

جدول (15) تأثير أكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي للنوع *p. citrinum*

معدل قطر المستعمرات (سم) \pm الخطأ القياسي	المعاملات	التركيز
1.23 ± 0.08^A	السيطرة	-
0.73 ± 0.06^B	المضاد الفطري	20%
1.13 ± 0.03^A	ZnO Np	3%
1.36 ± 0.14^A	ZnO Np	6%
1.4 ± 0.20^A	ZnO Np	12%

3-4: تأثير أكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف لأنواع فطر البنسليوم:

1-3-4: تأثير أكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف للنوع (1) *P. chrysogenium* :

تبين النتائج الموضحة في الجدول (16) ان لا توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين نتائج المعاملات مع الوزن الجاف للسيطرة السالبة على العكس من معاملة السيطرة الموجبة إذ وجدت فروق معنوية بينها وبين التراكيز المستخدمة في الدراسة. ففي حالة التركيز 3% كان الوزن الجاف مقارب للسيطرة السالبة اذ كان معدل الوزن الجاف 0.481 ± 0.03 غرام والتركيز 6% كان الوزن الجاف بمعدل 0.502 ± 0.03 غرام والتركيز 12% كان الوزن الجاف بمعدل 0.565 ± 0.06 غرام في حين كان معدل الوزن الجاف للسيطرة السالبة 0.599 ± 0.07 غرام. بينما عند المقارنة مع السيطرة الموجبة المعاملة بالكيتوكينازول لوحظ هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين السيطرة الموجبة المعاملة بالكيتوكينازول والتراكيز 3% ، 6% ، 12% اذ كان معدل الوزن الجاف المعامل بمضاد الكيتوكينازول 0.283 ± 0.05 غرام من التجربة نلاحظ أن أكسيد الزنك له أثر محفز على معدل الوزن الجاف.

جدول (16) تأثير أكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع (1) *p. chrysogenium*

معدل الوزن الجاف للفطر (غم) \pm الخطأ القياسي	المعاملات	التركيز
0.599 ± 0.07^A	السيطرة السالبة	-
0.283 ± 0.05^B	المضاد الفطري	20%
0.481 ± 0.03^A	ZnO Np	3%
0.502 ± 0.03^A	ZnO Np	6%
0.565 ± 0.06^A	ZnO Np	12%

4-3-2: تأثير اوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع (2) *p. chrysogenum*:

تشير النتائج الموضحة في الجدول (17) ان لا توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين التراكيز المستخدمة في التجربة 3% ، 6% ، 12% مع الوزن الجاف للسيطرة السالبة على العكس من معاملة السيطرة الموجبة إذ وجدت فروق معنوية بينها وبين التراكيز المستخدمة في الدراسة.

ففي حالة التركيز 3% كان الوزن الجاف مقارب للسيطرة السالبة اذ كان معدل الوزن الجاف 0.455 ± 0.02 غرام و التركيز 6% كان الوزن الجاف بمعدل 0.459 ± 0.02 غم والتركيز 12% كان الوزن الجاف بمعدل 0.463 ± 0.02 غم في حين كان معدل الوزن الجاف للسيطرة السالبة 0.476 ± 0.05 غم ونلاحظ هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين المعاملات الثلاث والمعاملة بالمضاد الفطري الكيتوكينازول كعامل سيطرة موجب فقد كان معدل الوزن الجاف في حالة المعاملة بالكيتوكينازول 0.208 ± 0.02 غم من التجربة نلاحظ أن أوكسيد الزنك النانوي له أثر تحفيز على معدل الوزن الجاف.

جدول (17) تأثير أوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع (2) *p. chrysogenum*

معدل الوزن الجاف للفطر (غم) \pm الخطأ القياسي	المعاملات	التركيز
0.476 ± 0.05^A	السيطرة السالبة	-
0.208 ± 0.02^B	المضاد الفطري	20%
0.455 ± 0.02^A	ZnO Np	3%
0.459 ± 0.02^A	ZnO Np	6%
0.463 ± 0.02^A	ZnO Np	12%

4-3-3: تأثير وكسيد الزنك النانوي على الوزن الجاف للنوع *p. citrinum* :

تشير النتائج الموضحة في الجدول (18) ان لا توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين نتائج المعاملات مع الوزن الجاف للسيطرة السالبة على العكس من معاملة السيطرة الموجبة إذ وجدت فروق معنوية بينها وبين التراكيز المستخدمة في الدراسة.

ففي حالة التركيز 3% كان الوزن الجاف مقارب للسيطرة السالبة اذ كان معدل الوزن الجاف 0.394 ± 0.04 غم وكذلك الوزن الجاف في التركيز 6% مقارب للسيطرة السالبة اذ كان معدل الوزن الجاف 0.549 ± 0.06 غم والتركيز 12% كان الوزن الجاف مقارب للسيطرة السالبة اذ كان معدل الوزن الجاف 0.476 ± 0.04 غم في حين كان معدل الوزن الجاف للسيطرة السالبة 0.617 ± 0.12 غم بينما عند المقارنة مع السيطرة الموجبة المعاملة بالمضاد الفطري الكيتوكينازول لوحظ هناك فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين السيطرة الموجبة المعاملة بالكيتوكينازول و التراكيز 6% ، 12% ، في حين كان التركيز 3% مقارب للسيطرة الموجبة اي عدم وجود فرق معنوي بنسبة احتمال 0.05 بين التركيز 3% والسيطرة الموجبة اذ كان معدل الوزن الجاف المعامل بالكيتوكينازول 0.194 ± 0.02 غم من نتائج التجربة نلاحظ أنه أوكسيد الزنك له أثر تحفيز على معدل الوزن الجاف.

جدول (18) تأثير أوكسيد الزنك النانوي على معدل الوزن الجاف للنوع *p. citrinum*

التركيز	المعاملات	معدل الوزن الجاف للفطر (غم) \pm الخطأ القياسي
-	السيطرة السالبة	0.617 \pm 0.12 ^A
20%	المضاد الفطري	0.194 \pm 0.02 ^B
3%	ZnO Np	0.394 \pm 0.04 ^{AB}
6%	ZnO Np	0.549 \pm 0.06 ^A
12%	ZnO Np	0.476 \pm 0.04 ^A

من النتائج التي تم الحصول عليها من دراسة تأثير أوكسيد الزنك النانوي على فطر البنسليوم لاحظنا انه لا توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 لمادة اوكسيد الزنك النانوي على النمو الشعاعي على أنواع فطر البنسليوم الثلاثة عند مقارنتها مع النمو السالب غير المعامل وكذلك الحال عند دراسة تأثيرها على الوزن الجاف لوحظ انه لا توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 عن النمو السالب غير المعامل. في حين توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 بين المعاملات الثلاثة والمعاملة بالكيتوكينازول لكل نوع من انواع فطر البنسليوم في حالة النمو الشعاعي بينما في حالة الوزن الجاف لوحظ في العينة الثالثة ان تأثير المعاملة بتركيز 3% لا يوجد فرق معنوي مع المعاملة بالكيتوكينازول كعامل سيطرة موجب بينما التراكيز 6% ، 12% للعينة نفسها كانت هناك فروق معنوية مع المعاملة بالكيتوكينازول كعامل سيطرة موجب، وفي حالة الانواع الفطرية الاولى والثانية توجد فروق معنوية بمستوى احتمال 0.05 لكل التراكيز 3% ، 6% ، 12% المستخدمة في التجربة مع السيطرة الموجبة هذا لا يتفق مع ما توصلت له (Lili et al., 2011) من ان اوكسيد الزنك النانوي مثبت نمو ضد الفطر *Botrytis cinerea* ولا يتفق مع ما توصل إليه

Yehia and Ahmed, (2013) من ان أوكسيد الزنك النانوي مثبط نمو ضد الفطر *Fusarium*

. *oxysporum*

4-4: تأثير أوكسيد الزنك على الجينات المسؤولة عن انتاج مضاد البنسلين

(*pcbAB* , *pcbC* , *penDE*) في انواع الفطر. *penicillium spp.* :

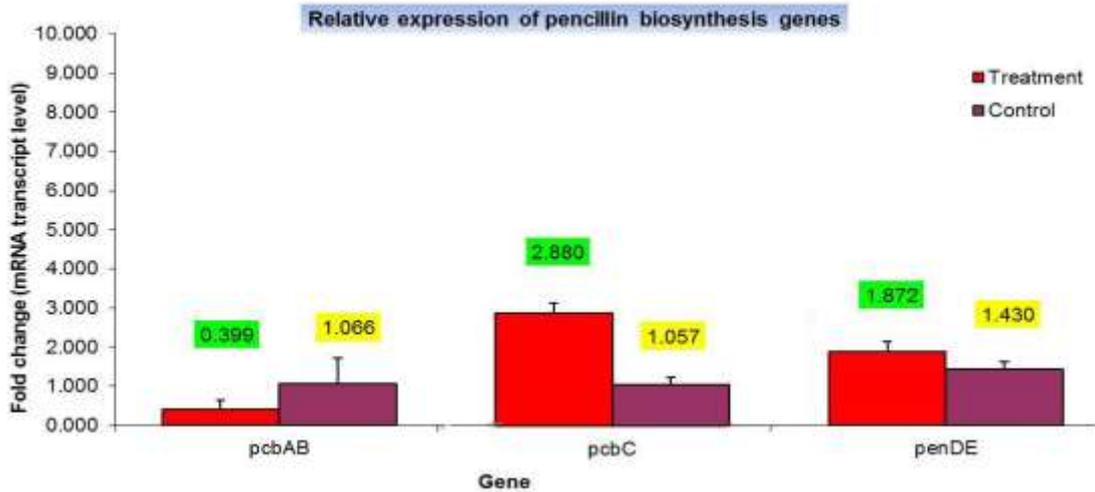
بينت نتائج الدراسة الحالية والخاصة بتأثير الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك على التعبير الجيني للجينات المسؤولة

عن انتاج مضاد البنسلين لأنواع من فطر البنسليوم والتي عزلت في هذه الدراسة وباستخدام تقنية Real-Time

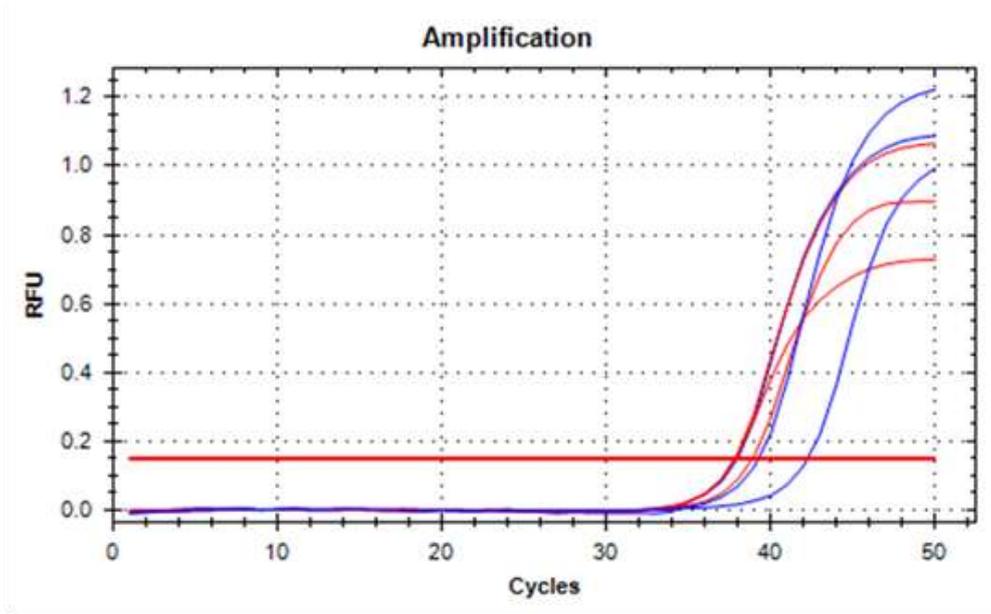
PCR إذ اوضحت النتائج ان هناك تفاوتاً في التأثير للجزيئات النانوية بين المعاملة بتركيز 12% ومعاملة

السيطرة التي كانت بدون إضافة (سيطرة سالبة) الشكل (6) يوضح تأثير أوكسيد الزنك النانوي بتركيز 12% على

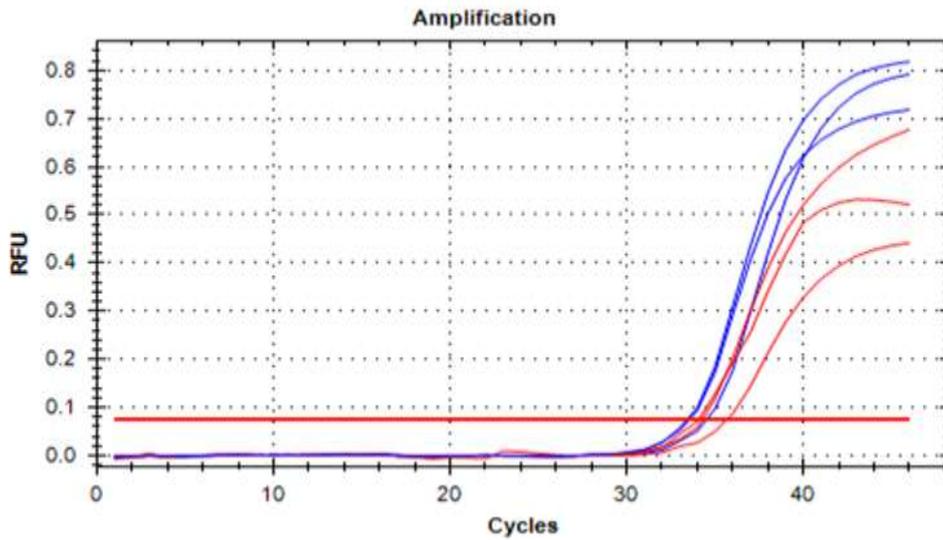
التعبير الجيني للجينات الثلاثة الموجودة في النوع (1) *p. chrysogenum* .



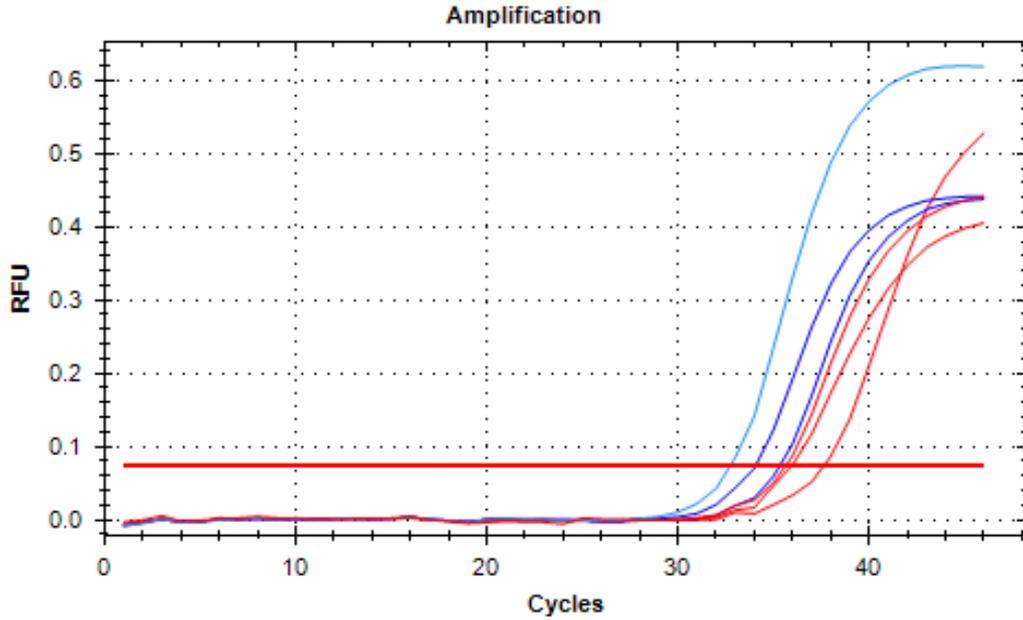
شكل (6) تأثير أوكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع (1) *p. chrysogenum*



شكل رقم (7) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbAB* في النوع *p. chrysogenum* (1) إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.



شكل رقم (8) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbC* في النوع *p. chrysogenum* (1) إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.



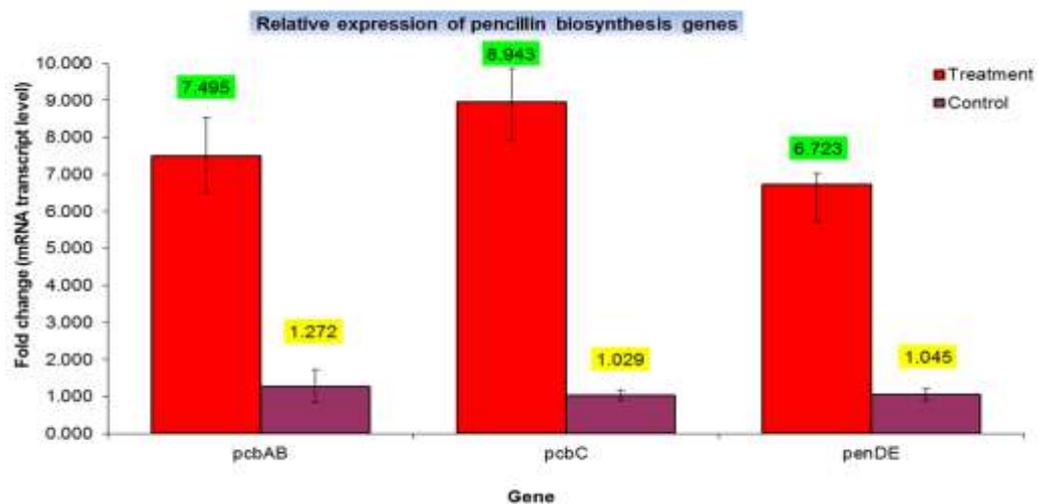
شكل رقم (9) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *penDE* في النوع *p. chrysogenum* (1) إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.

حيث بلغت قيمة التعبير الجيني للجينات الثلاثة (*pcbAB* , *pcbC*, *penDE*) القيم 1.065 ± 0.221 ، 1.057 ± 0.183 ، 1.430 ± 0.653 على التوالي لمعاملة السيطرة اما لمعاملة التركيز 12% فقد بلغت القيم 0.399 ± 0.239 ، 2.879 ± 0.259 ، 1.871 ± 0.654 على التوالي ولا يلاحظ بحسب التحليل الاحصائي وجود فرق معنوي بين السيطرة ومعاملة التركيز 12% أي ان الجزيئات النانوية ليس لها تأثير محسوس ومعنوي على الجينات المسؤولة عن انتاج المضاد في هذه العزلة من عزلات فطر البنسليوم او بتعبير أدق هذه العزلة من نوع (2) *p. chrysogenum* على خلاف النتائج التي يبينها الشكل (10) الذي يشير الى وجود فروق معنوية في معدل التعبير الجيني للجينات الثلاثة مقارنةً مع السيطرة، حيث يلاحظ زيادة واضحة في قيم التعبير الجيني فقد بلغت القيم للجينات الثلاثة عند التركيز 12%: 7.495 ± 2.671 ، 8.943 ± 3.363 ، 6.723 ± 2.396 على التوالي اما معاملة السيطرة فقد بلغت قيم التعبير الجيني لها 1.272 ± 0.448 ، 1.029 ± 0.142 ،

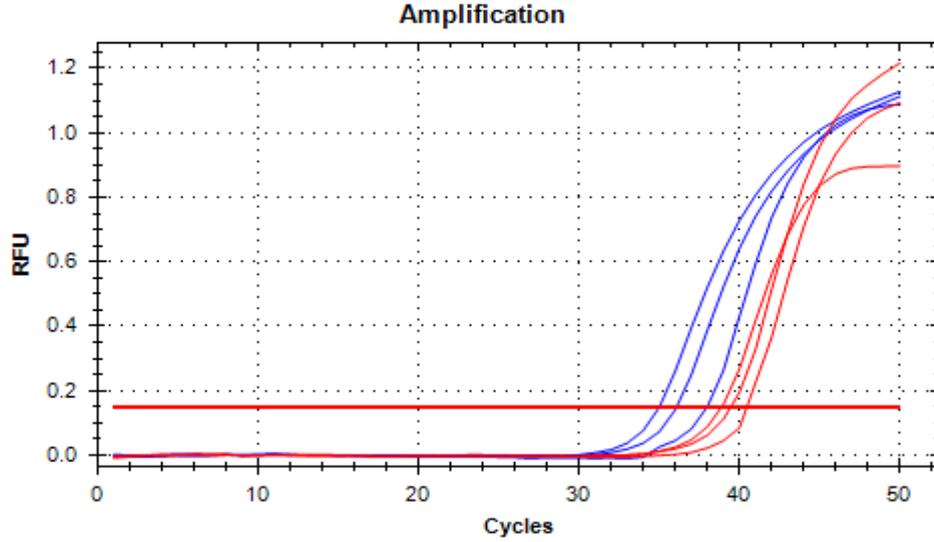
1.045±0.169 على التوالي وهذه القيم تشير الى التأثير الواضح للجزيئات النانوية على معدل التعبير الجيني للجينات الثلاثة وتشير ايضاً الى التأثير الايجابي لهذه الجزيئات على انتاج المضاد فزيادة التعبير الجيني يؤدي الى زيادة في انتاج المضاد وهذه يمكن تفسيرها ان الجزيئات النانوية تمتلك خصائص فريدة من نوعها وأهمها صغر الحجم مما يؤهلها من الدخول الى الخلية ووصولها الى المادة الوراثية والتأثير عليها هذا من جانب ومن جانب اخر ان مادة اوكسيد الزنك النانوي تعتبر من المواد التي تمتلك سمية خلوية Cytotoxicity أي لها القدرة على احداث تغيير في المادة الوراثية(Sharma *et al.*,2012; Condello *et al.*,2016).

فمن الممكن حدوث طفرة في مناطق Promoter لاحد الجينات او للجينات الثلاثة حيث ان هذه الجينات تعمل بشكل جماعي Cluster لإنتاج مضاد واحد او ان الطفرة حدثت في الجينات الكابحة لانتاج المضاد Suppressor gene مما سبب في زيادة التعبير الجيني للجينات الثلاثة. وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره

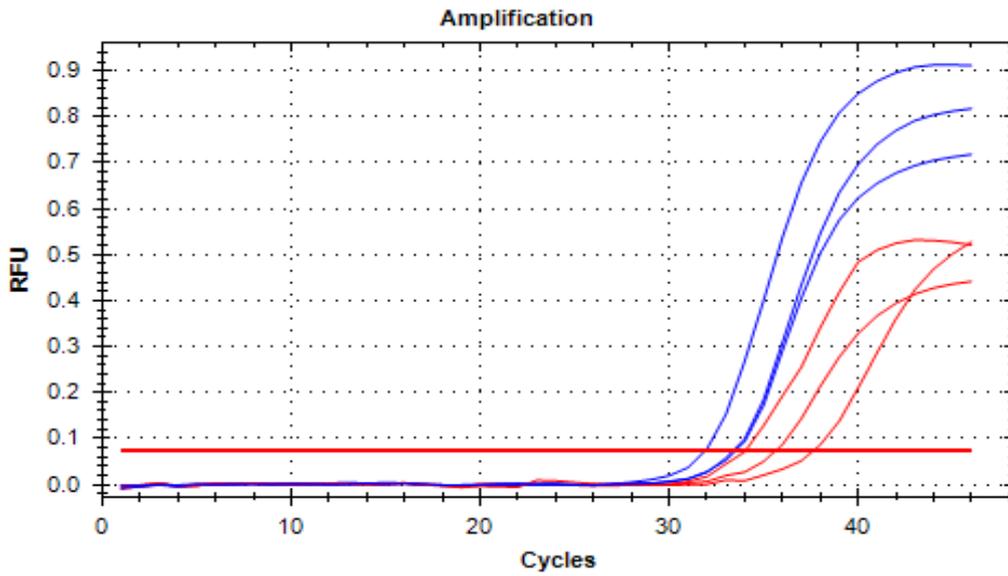
Lee *et al.*, (2012) ان التعرض للجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك تسبب تنظيمياً عالياً up-regulation للجينات وتزيد من التعبير الجيني gene expression.



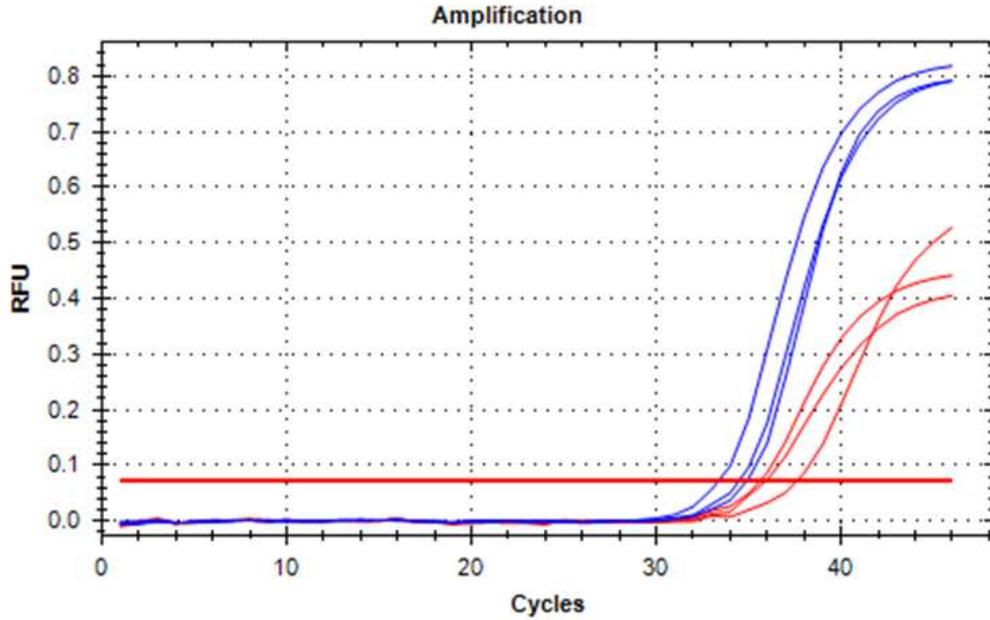
شكل (10) تأثير أوكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع (2) *p. chrysogenum*



شكل رقم (11) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbAB* في النوع (2) *p.* *chrysoygenum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.



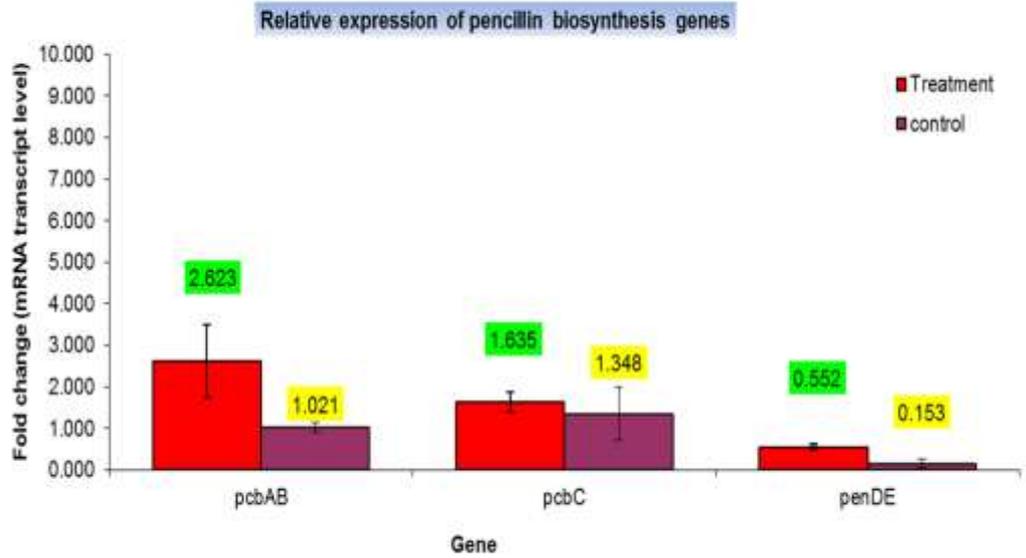
شكل رقم (12): منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbC* في النوع (2) *p.* *chrysoygenum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.



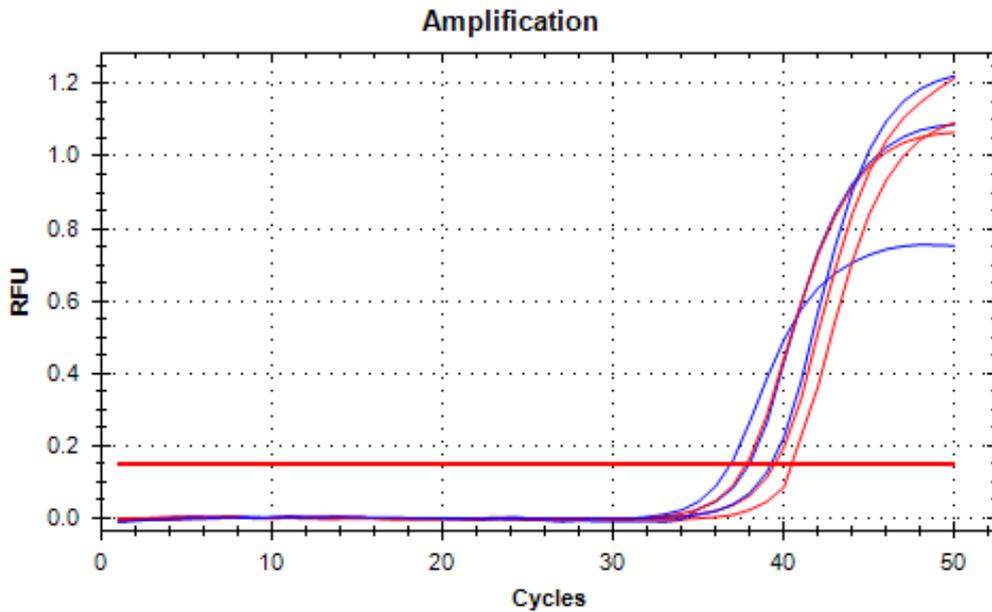
شكل رقم (13) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *penDE* في النوع (2) *p. chrysogenum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.

اما الشكل (14)، فيوضح تأثير الجزيئات النانوية بتركيز 12% على الجينات الثلاثة المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين في النوع *p. citrinum* فقد بلغت قيم التعبير الجيني لمعاملة التركيز 12%: 2.623 ± 0.873 ، 1.635 ± 0.236 ،

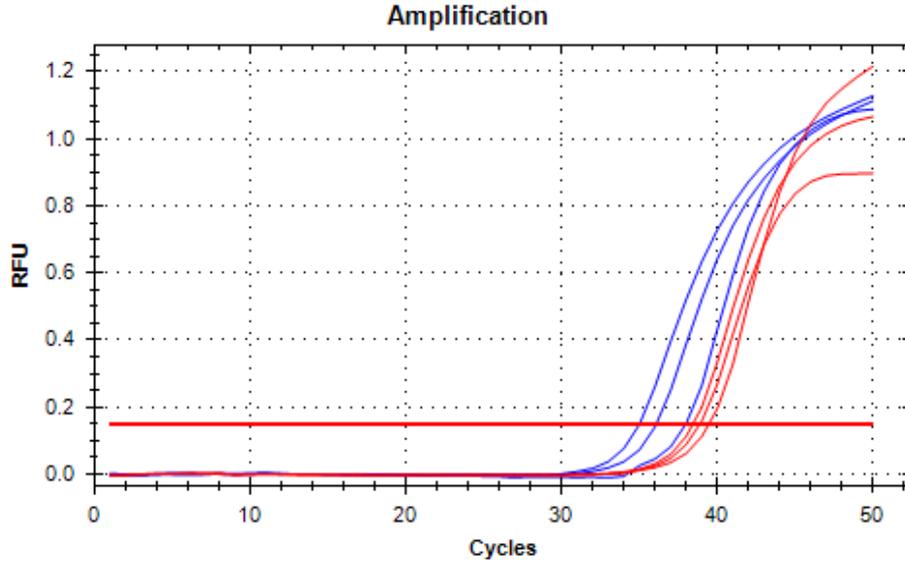
0.552 ± 0.072 على التوالي اما معاملة السيطرة فقد بلغت 1.021 ± 0.111 ، 1.348 ± 0.648 ، 0.153 ± 0.018 للجينات الثلاثة على التوالي وأشارت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملة بتركيز 12% ومعاملة السيطرة حيث توضح النتائج وجود زيادة غير محسوسة وغير معنوية في التعبير الجيني في هذا النوع وقد يكون هذا بسبب قلة انتاج هذا المضاد في هذا النوع أصلاً فهو من الأنواع غير المعروفة بإنتاجها لمضاد البنسلين مع وجود هذه الجينات فيه (Refai et al.,2015).



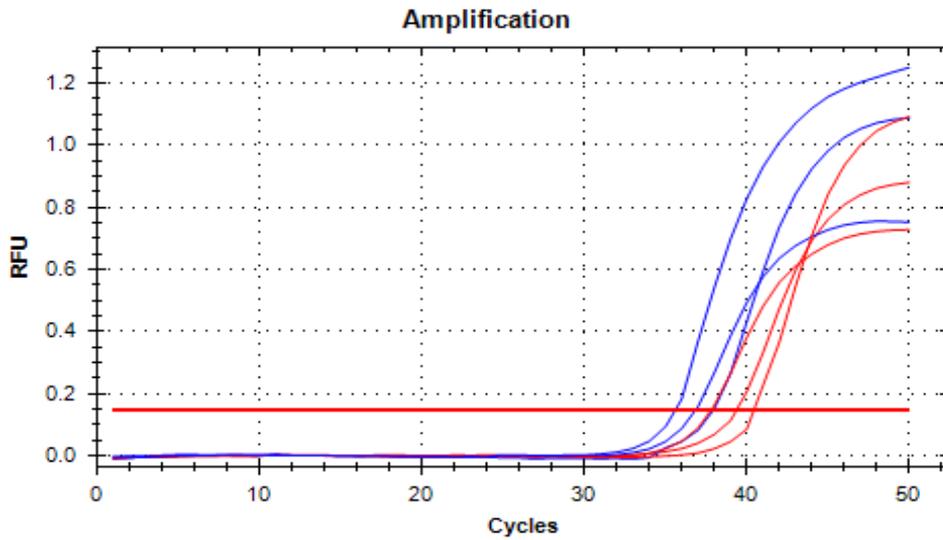
شكل (14) تأثير أكسيد الزنك النانوي على معدل التعبير الجيني للنوع *p. citrinum*



شكل رقم (15) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbAB* في النوع *p. citrinum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.



شكل رقم (16) منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *pcbC* في النوع *P. citrinum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.

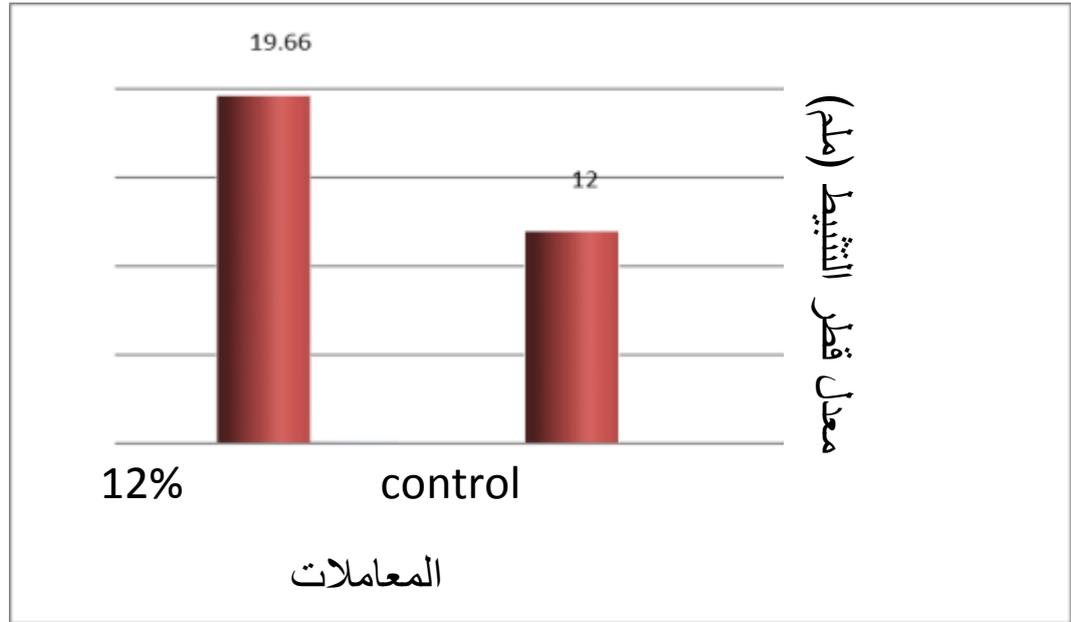


شكل رقم (17): منحنى التضخيم لتفاعل فحص Real-Time PCR والخاص بجين *penDE* في النوع *P. citrinum* إذ أنّ المنحنيات ذات اللون الأزرق تمثل مجموعة المعاملات، والمنحنيات ذات اللون الأحمر تمثل السيطرة.

وهناك العديد من الدراسات التي اشارت الى الامكانية التي تمتلكها الجزيئات النانوية لإحداث تغييرات في المادة الوراثية وإمكانية حدوث الطفرات فقد ذكر (Nel et al., 2006) ان التأثيرات الجينية التي تحدثها الجزيئات النانوية نتيجة لتواجدها داخل النواة وارتباطها بالحامض النووي DNA قادرة على احداث طفرات وراثية.

4-5: اختبار فعالية المضاد المنتج بوجود اوكسيد الزنك النانوي :

يوضح الشكل (18) فعالية المضاد المنتج من فطر البنسليوم النوع (2) *p. chrysogenum* الذي أبدى تعبيراً جينياً عالياً لإنتاج مضاد البنسلين بعد المعاملة بتركيز 12% من أوكسيد الزنك النانوي وجاء هذا الاختبار لإثبات ان الطفرة التي حدثت لم تكن موجودة في داخل الجين التركيبي لأي من الجينات الثلاثة المسؤولة عن انتاج المضاد لان ذلك يؤدي الى زيادة وهمية في انتاج المضاد أي أن هناك إنتاجاً عالياً ولكن المضاد يكون غير فعال لوجود طفرة بداخله فقد تم اختبار فعالية راشح الفطر الحاوي على المضاد بعد معاملته بالجزيئات النانوية تجاه بكتريا *Staphylococcus epidermidis* المعروفة بحساسيتها للبنسلين بالمقارنة مع راشح الفطر النامي بدون اضافة اوكسيد الزنك ويلاحظ من الجدول ان راشح الفطر النامي بوجود الجزيئات النانوية امتلك فعالية عالية تجاه البكتريا مقارنةً مع معاملة السيطرة اي ان المضاد المنتج بحالة وجود أوكسيد الزنك النانوي فعال وان الطفرة التي حدثت أو التعبير الجيني الموجود والذي سبب بزيادة التعبير الجيني لم يحدث بالجين التركيبي وان الزيادة لم تكن على حساب فعالية المضاد المنتج.



شكل (18) تأثير راسح الفطر (*p. chrysogenum* (2) المعامل بأوكسيد الزنك النانوي على بكتريا *Staph.*

epidermidis

Conclusions

1-5: الاستنتاجات :

- 1- تم عزل الفطريات الانتهازية المسببة للإصابات الرئوية وكانت النتائج تفوق فطر *Aspergillus spp.* أولاً ثم خميرة *Candida spp.* وفي المرتبة الثالثة جاء الفطر *Penicillium spp.*.
- 2- تم عزل عزلتين من فطر *Penicillium spp.* تعود للنوع *P. chrysogenum* إضافة الى النوع *P. citrinum*.
- 3- عند اختبار تأثير أكسيد الزنك النانوي مختبرياً لوحظ هناك تأثيراً محفزاً لنمو أنواع فطر البنسليوم *Penicillium spp.* مقارنةً مع المعاملة بالمضاد Ketoconazole وخصوصاً عند التركيز 12%.
- 4- عند قياس التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن إنتاج مضاد البنسلين (*pcbAB* , *pcbC* , *penDE*) بوجود الجزيئات النانوية لأوكسيد الزنك بتركيز 12% لوحظ وجود تنظيم عالي *up-regulation* وإنتاجية عالية *Over expression* لهذه الجينات في العزلات الخاصة بأنواع الفطر *Penicillium spp.*.
- 5- عند اختبار فعالية المضاد المنتج بوجود أكسيد الزنك النانوي وبتركيز 12% لوحظ وجود تأثيراً مضاداً عالياً على بكتريا *Staphylococcus epidermidis* المستخدمة مقارنةً مع معاملة السيطرة.

Recommendation

2-5: التوصيات :

- 1- الانتباه الى خطورة الفطريات الانتهازية opportunistic fungi; بكونها من المسببات المرضية الخطرة خصوصاً عند الاشخاص ضعيفي المناعة والذين يعانون من الامراض المزمنة.
- 2- إجراء المزيد من الدراسات المتعلقة بالشجرة الوراثية لأنواع فطر البنسليوم *Penicillium spp.* لوجود تداخل في عملية تشخيصها.
- 3- إمكانية تجريب استخدام جزيئات الزنك النانوية كعامل محفز لنمو بعض أنواع الأحياء المجهرية الصناعية ومنها أنواع الفطر *Penicillium spp.* لأهميتها الصناعية.
- 4- إجراء دراسات حول الجينات المسؤولة عن انتاج البنسلين في أنواع فطر البنسليوم *Penicillium spp.* المعزولة من عينات بيئية، والتي لم تشملها الدراسة الحالية; لضيق وقت الدراسة وعدم توفر الامكانيات اللازمة لذلك.

أولاً : المصادر العربية:

ابراهيم ، حسنين خليل ; عبد الرزاق ، محمد صبري وناجي ، وداد.(2006).دراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبياً ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري .مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 12/العدد 3.

أسماعيل ، محمد طاهر ، عبير الكفري .(2008).كتاب الطفيليات والفطور الطبية ، منشورات جامعة دمشق – كلية الطب البشري .(458 صفحة).

الاسكندراني، محمد شريف .(2010). تكنولوجيا النانو من اجل غذا افضل. مجلة عالم المعرفة سلسلة شهرية يصدرها المجلس الوطني للثقافة والفنون والاداب. 4(306) : 978-99906.

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

الحريشي، اسماء احمد و رمضان، احمد نديم .(2009). عزل وتشخيص الأنواع التابعة لجنس فطر spp. *Penicillium* من الغبار الداخلي للأبنية في مدينة الموصل / العراق. مجلة علوم الرافدين ، 1(120):1-10 .

الدليمي ، عبد الستار صديق ردينة .(2013). دراسة الخصائص البصرية لاغشية $Ni(1-x) Zn_x O$ المحضرة بطريقة التحليل الكيميائي الحراري . رسالة ماجستير، جامعة ديالى /كلية العلوم .

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

الرحمة ، عبد الله بن ناصر .(2005). اساسيات علم الفطريات . قسم النبات والاحياء الدقيقة ، كلية العلوم – جامعة الملك سعود . الطبعة الرابعة ، الرياض . السعودية.

الركابي ،علي خضير جابر ؛ الدبون، عبد الحافظ و وادي، هديل محمد .(2011) . دراسة قابلية بعض
الفطريات الخيطية على انتاج مضادات الاكسدة . مجلة ابحاث البصرة (العلميات) العدد السابع
والثلاثون ، الجزء الرابع:1817 - 2695 .

الشبلي، ماجد كاظم عبود (2006). تأثير العزلات السريرية لخميرة المبيضات *Candida spp.* . دراسة
بايولوجية ونسجية مرضية في محافظة الديوانية .اطروحة دكتوراه .كلية التربية - جامعة القادسية.

العميد، أسيل إبراهيم مظفر و السامرائي ،إكرام عباس عبود و فرج ،محمد قاسم .(2000). دراسة في
وبائية عفن الرشاشيات الدخلاء *Aspergillus fumigatus* في الإنسان. المجله العراقية لبحوث السوق
وحماية المستهلك ،. 1(1).

المحنة ، رواق حيدر عبد النبي .(2014) . عزل وتشخيص الفطريات المصاحبة لأخماج الجيوب الانفية
وحساسيتها لبعض المضادات الفطرية .رسالة ماجستير ، علوم الحياة / أحياء مجهرية- فطريات طبية .
سعيد، ندى محمد و سهيل عبدالله محسن .(2009). تحضير ودراسة خواص التركيب النانوي لأغشية
أوكسيد الخارصين الرقيقة. المجلة العراقية للفيزياء: 75-81 .

عبود ، ميثاق ستار. (2009) . عزل وتشخيص بعض أنواع الفطريات المرافقة لإفرازات القناة التنفسية في
مدينة الناصرية. مجلة جامعة ذي قار، 3(5):1 - 11 .

عميش ،ابراهيم غريب محمد .(2011) . النانوبيولوجي عصر جديد من علوم الحياة .القاهرة الهيئة المصرية
العامة للكتاب . 224.

نايفة ، منير.(2009). النانوتكنولوجي-عالم صغير ومستقبل كبير. الدار العربية للعلوم ناشرون.7-675-87-
978-9953

Ahmet, A. S. A. N.; (2004)"*Aspergillus, Penicillium* and related species reported from
Turkey." Mycotaxon 89.1: 155-157.

Al-Ugaili, D. ; Fadhil,A.M.A.and Saleh, A. W. (2014). Potential Activity of Zinc Oxide Nanoparticles and Ethanolic Olive Leaf Extract Against Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. Journal of Al-Nahrain University – Science., 17(3): 162–169.

Amna, S.; Shahrom, M.; Azman, S.;Noor, H. M. K . ;Ling, C.A.; Siti ,K. M. B.; Habsahm H.and Dasmawati, M.(2015). Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. Nano–Micro Lett., 7(3):219–242.

Ashoor, A. A. and Abu–Baker, Y. (2002). Is the classical classification of aspergillosis of the paranasal sinuses to non– invasive and invasive still valid or not. Bahrain Med Bull, 24, 3.

Asnaashari, M.; Ghanbary, M. A. T., and Tazick, Z. (2012). Optimization of penicillin G production by *Penicillium chrysogenum*. Ann. Biol. Res, 3(12), 5434–5440.

Atlas, R.M. (1984). Microbiology fundamentals and application. 1st ed. Macmillan, New York.

Badenoch, P. R.; Halliday, C. L., Ellis, D. H., Billing, K. J., and Mills, R. A. D. (2006). Ulocladium atrum keratitis. Journal of clinical microbiology, 44(3), 1190–1193.

Baron, E.J.; Chang, R.S.; Howed, H.D.; Miller, N.J. and Turner, A.J. (1994).

Medical Microbiology: A Short Course. Wiley-Liss. New York. p.64.

Condello, M.; DeBeradis B.; Ammendolia, MG. and Barone F. (2016). Zinc oxide nanoparticles tracking from damage in human colon carcinoma. *Toxicol in Vitro*. 35:169–79

Cramer, R. (1999). Epidemiology and molecular basis of the involvement of *Aspergillus fumigatus* in allergic diseases. In *Aspergillus fumigatus*

Karger Publishers. (Vol. 2, pp. 44–56).

Craig, C.R. and Stitzel, R.E. (1997). Modern pharmacology with clinical applications. Little, Brown and company (Inc).

Cruickshank, R.; Duguid, J.P.; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A. (1975).

medical microbiology. 12th ed. Vol. 1 microbiology infections, Churchill Livingstone, chapter 18 pp. 263–266.

De Hoog, G. S.; Guarro, J., Gené, J., and Figueras, M. J. (2000).

Atlas of clinical fungi, 2nd. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 305–310

Dillon, H.K.; Hinsohn, P.A. and Miller, J.D.(2005). Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples. Fairfax, Virginia: American Industrial Hygiene Association. 174 pp

Durán, M.T.; Pozo, J.D.; Yebra, M.T.; Crespo, M.G.; Paniagua, M.J. and Cabezón, M.A.(2003). Cutaneous infection caused by *Ulocladium chartarum* in a heart transplant recipient: case report and review . Acta.Derm.Venereol.,38 :218–221.

Edmunds, M.W. (2000). Introduction to clinical pharmacology .3rd ed. Mosby, Inc.

Ellis, D. H. (1994). Clinical mycology. The human opportunistic mycoses. Gillingham printers Ltd. Australia. PP: 166.

Federico, L.; Francisco, F., Rosa, E.C. and Juan, M.(1998) .

Organization of gene cluster for biosynthesis of *Penicillium* nalgiovense and antibiotic production in crud dry sausages. Applied and Environmental Microbiology. 65: (3) 1236–1240.

Fernández, F. J.; Gutierrez, S., Velasco, J., Montenegro, E., Marcos, A. T., and Martin, J. F. (1994). Molecular characterization of three loss-of-function mutations in the isopenicillin N-acyltransferase gene (*penDE*) of *Penicillium chrysogenum*. Journal of bacteriology, 176(16), 4941–4948.

Finegold, S.M. and Martin, W.J. (1982). Bailey and Scott's diagnostic Microbiology.

6th ed., C.V. Mosby Company, USA, pp. 253–265.

Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of food and *Penicillium* Sub genus *Penicillium* : A guide to identification of studies In Mycology, air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins, 49:1–52.

Goh, J. C.; Juliana, J., Malina, O., Ngah, Z. U., and Norhafizalena, O. (2007).

Prevalence of *Penicillium* specific Ig E level and allergy symptoms among office workers in a selected company in Bangi, Malaysia. Trop Biomed, 24(1), 37–46.

Gutiérrez, S.; Marcos, A. T., Casqueiro, J., Kosalková, K., Fernández, F. J.,

Velasco, J., and Martín, J. F. (1999). Transcription of the *pcbAB*, *pcbC* and *penDE* genes of *Penicillium chrysogenum* AS-P-78 is repressed by glucose and the repression is not reversed by alkaline pHs. Microbiology, 145(2), 317–324.

Hadi, F. A.; Al-Azzawi, A. H.; R., and Al-Allaq, H. H. (2015). Effect of Zinc

Oxide Level on Tensile Properties of a NR/SBR Composite. Journal of Kufa-Physics, 7(1) : 53–63.

Hamad, M.S. (1998). Microfungal community in Iraq desert land Ph.D. Thesis

coll. Sci. Univ. Babylon.

Hartnagel H. L.;Dawar A. L.; Jain A. K., and Jagadish C. (1995)

Semiconducting Transparent Thin Films” , Institute of Physics
Publishing, Bristol.

Hare,R .(1982).New light on the history of Penicillin. *Medical History.* 26 (01), 1–24.

Hemath, N. K.S.; Gaurav, K.; Karthik L.and Bhaskara, R.K.V.(2010).

Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus
Penicillium spp. *Scholars Research Library.*, 2 (6): 161–167.

Hodgson, B.B. and Kizior, R.J. (2003). Saunders nursing drug hand book Elsevier
Science (U.S.A).

Ibrahim , A.S. ; Edwards JR, J.E. and Filler, S.G.(2003). Zygomycoses

In: Dismukes ,W.E. ; Pappas,P.G. and Sobel,J (eds). *Clinical
mycology.* Oxford University Press, Inc.

Jinantana, J. and Sariah, M. (1997). Antagonistic effect of Malaysian
isolates of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* on
Sclerotium rolfsii. *Pertanika J.of Trop. Agric. Sci.,* 20, 38–41.

Laich, F.; Fierro, F., Cardoza, R. E., and Martin, J. F. (1999).

and Organization of the gene cluster for biosynthesis of *Penicillium*

antibiotic production in *penicillin nalgiovense* in cured dry sausages. Applied and environmental microbiology, 65(3), 1236–1240.

Laurence, D.R.; Bennett, P.N. and Brown, M.J. (1997). Clinical pharmacology. 8th edition. Churchill Livingstone. London.

Lee, S. H.; Pie, J. E., Kim, Y. R., Lee, H. R., Son, S. W., and Kim, M. K.

(2012). Effects of zinc oxide nanoparticles on gene expression profile in human keratinocytes. Molecular and Cellular Toxicology, 8(2), 113–118.

Leitão, A. L. (2009). Potential of *Penicillium* species in the bioremediation field.

International journal of environmental research and public health, 6(4), 1393–1417.

Liras,P.; Antonio R.; García and Juan, M. F.(1998). Evolution of the

clusters of genes for I β –lactam antibiotics: a model for evolutive microbiology 1:271– combinatorial assembly of new I β –lactams . International 278.

Lili, H.; Yang, L.; Azlin, M.and Mengshi ,L.(2011). Antifungal activity of zinc oxide

nanoparticles against *Botrytis cinerea* . Microbiological research., 166: 207—215.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods*, 25(4), 402–408.
- Lyratzopoulos, G.; Ellis, M., Nerringer, R., and Denning, D. W. (2002).** Invasive infection due to *Penicillium* species other than *P. marneffeii*. *Journal of Infection*, 45(3), 184–195.
- Mandell, G.L.; Bennet, J.E. and Dolim, R. (1995).** Principles and practice infectious diseases. Fourth edition. Churchill Living stone London.
- Martín, J. F. (2000).** Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *Journal of bacteriology*, 182(9), 2355–2362.
- Meon, S. (1997).** Antagonistic effect of Malaysian isolates of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* on *Sclerotium rolfsii*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 20(1), 35-41.
- Motulsky, H.J. (2003).** Prism 4 Statistics guide –statistical analyses for laboratory and clinical researchers. GraphPad Software Inc., San Deigo CA.
- Muñiz, C. C.; Zelaya, T. E. C.; Esquivel, G. R.; and Fernández, F. J. (2007).** Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(3–4), 88–98.

- Nawaz, H. R.; Solangi, B. A.; Zehra, B., and Nadeem, U. (2011).** Preparation of nano zinc oxide and its application in leather as a retanning and antibacterial agent. *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research*, 2(4), 164–170.
- Neal, M. J. (2002).** *Medical pharmacology at a glance* .4th ed. Oxford: Black well Science.
- Nel . A.; Xia T.; Madler L. and Li N. (2006).** Toxic potential of material at the nanolevel .*Science* 311:622–627.
- Nowack , B. (2010).** Nanosilver revisited downstream . *science* . 330 (6007), 1054–1055.
- Noritomi, D. T.; Bub, G. L., Beer, I., da SILVA, A. S. F.; de Cleve, R., and Gama–Rodrigues, J. J. (2005).** Multiple brain abscesses due to *Penicillium* spp. infection. *Critical Care*, 9(S2), P65.
- Okhovvat, S. M. and Zakeri, Z. A. H. R. A. (2002).** Identification of fungal diseases associated with imported wheat in Iranian silos. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 68: 533–535.
- Oldes, R.J.(1975).**Fungi ,Microscopic appearance. In: A colour atlas of on growth and keratinase activity on T. mentagrophytes. Iran. *Biomed.* J.7(3):113–118.

Pandey,R.; Tauseef,A.; Sagar,A.; Bikash,R. and Bipin,S.(2014). Penicillin Production and History: An Overview. International Journal of Microbiology and Allied Sciences (IJOMAS). 1(2):103–108.

Patterson, T.F. (2004). *Aspergillus* species. In: Principles & Practice of infectious diseases. Edited by Mandell , G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R.Vol. 26th , 2958–2973.

Pinto, M.; Gencale,E; Rossi,M. and Simoni, I.(2001).Study of some plant oils effect on *A. flavus* L.growth on corn. Brazilian Journal of Microbiology. 32,127pp.

Pitt, J.I. and Hocking A.D. (1997). Fungi and Food Spoilage. 2nd. Gaithersburg , Maryland: Chapman and Hall. 593 pp.

Pitt, J. I. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. academic press Inc, london.

Pitt J.I. and Samson RA (1993). Names in current use in the family Trichocomaceae, Cladoniaceae Pinaceae, and Lemnaceae (Greuter W, ed). Koeltz Scientific Books, Konigstein: 13–57.

Pitt J.I.; Samson RA. and Frisvad JC (2000). List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. In: Integration of modern taxonomic

methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification . harwood academic publishers, amsterdam: 9–79.

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

Rafai , M. ; El-yazid , H. and Tawakkol, W. (2015). Monograph on the genus *Penicillium*. University of cairo pp:66–69.

Raper K.B. and Thom C (1949). A manual of the penicillia. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. pp 875.

Ramirez, C. (1982). Manual and atlas of the penicillia. elsevier biomedical press amsterdam.

Ratnam, J.; Syed, J. I., and Singh, S. K. (2014). Comparative Study on Production of Penicillin by *Penicillium Notatum* and *Penicillium Chrysogenum* and its Antimicrobial Property. Int J Biotech Trends and Technol, 1(6): 2249–0183.

Rinaldi, M. G. (1989). Zygomycosis. Infectious disease clinical north. America 3(1), 19 – 41.

Romano, C.; Maritati, E.; Paccagnini, E., and Massai, L. (2004). Onychomycosis due to *Ulocladium botrytis*. Mycoses, 47(7), 346–348.

Seydametova, E.; Salihon, J., Zainol, N., and Convey, P. (2012). Production of Lovastatin by *Penicillium* spp. soil microfungi. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 3(5), 337.

Slman, A. A. (2012). Article Antibacterial activity of zno nanoparticle on some gram-positive and gram-negative bacteria . Iraqi Journal of Physics., 10(18): 5-10.

Sharma, V.; Anderson D.;and Dhawan A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells(HepG2).. Apoptosis. 17(8): 852-70.

Suhail, M.; Akhund, S.; Jatt, T.; A. H. I. R. A., Mangrio, A. M., and Abro, H. (2006). Isolation and identification of *Penicillium* spp., from the river indus bed at Kotri. Pakistan Journal of Botany, 38(4), 1289.

Tawfeeq, A. T. ; Kadhim, H. Al-D. M. ; Yseen,N. Y.and Kalil , S. K.(2015). Targeting Mice Mammary Adenocarcenoma Cells with Zinc OxideNanoparticles .Jornal of Biotechnology., 9 (2): 14-20 .

Thati, V.; Roy, A. S.; Ambika Prasad, M. V. N., Shivannavar, C. T. and Gaddad, S. M. (2010). nanostructured zinc oxide enhances the activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus*. J. Biosci. Tech, 1(2), 64-69.

- Thom, C.; Church, M. B., May, O. E., and Raines, M. A. (1930).** The penicillia
baltimore: williams and wilkins (pp. 1–644).
- Tiwari, K.L. ; Jadhav , S.K. and Kumar, A.(2011).** morphological and molecular
study of different *Penicillium* species. middle–east Journal of scientific
research.,7 (1): 203–10.
- Todar, K. (2002).** antimicrobial agents used in the treatment of infectious disease.
department of bacteriology university of wisconsin–madison.
- Tortora, Case,Ch.L.(2002).**microbiology an Introduction .7th ed.,benjamin
cummings, sanfrancisco. boston new york. university,1–8–1 in ohana , chuo–
ku, chiba 260–8673,
- Visagie, C. M.; Houbroken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C.
H. W., Perrone, G. Seifert, K.A., Varga, J., Yaguhi, T., and Samson, R.
A. (2014).** Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. Studies in
Mycology, 78, 343–371.
- Yehia, R. S. and Ahmed, O. F. (2013).** In vitro study of the antifungal efficacy of
zinc oxide nanoparticles against *Fusarium oxysporum* and *Penicillium
expansum*. African Journal of Microbiology Research, 7(19), 1917–1923.

summary

The study aimed to isolate and diagnose opportunistic fungi from clinical samples collected from patients who attended to the Popular Clinic of Chest Diseases in Maysan province during the period 1/10/2015 to 1/4/2016. The total number of sputum samples was 193, The clinical sputum are collect from patients infected with chronic pulmonary diseases . Samples are examined and diagnosed by using cultural media and microscopic examination. Also testing the effects of ZnO nanoparticles in three concentrations (3%,6%,12%) on two isolated fungi , genus *Penicillium* spp. This testing included the effect of nanoparticles on radial growth and dry weight .In addition the effect of these particles on the genes responsible for the production of penicillin antibiotic by using Real-Time PCR technique.

Results show 75 patients samples were containing fungal infections 38.86%. they involved 41 isolates 54.66% *Aspergillus* spp. , was represented by *A.fumigatus* in 19 isolates 25.33%, *A.niger* in 14 isolates 18.67% and *A. flavus* in 8 isolates 10.67%. *Candida albicans* 18 isolates in 24% . *Penicillium* spp. 14 isolates 18.6% was represented by *P. chrysogenum* in 12 isolates 16% and *P. citrinum* in 2 isolates 2.67%. Finally , *Rhizopus stolonifer* and *Alternaria alternata* in one isolate 1.33% .

Resultes of the effect of nanoparticles of zinc oxide on radial growth of the genus *Penicillium* spp. show a significant differences between the treatments, the concentrations that used stimulated the growth of fungus and the concentration 12% was more influential in the growth of isolated fungus where diameter of the colony *P. chrysogenum* (1) was 2.63 cm compared with the of the negative control 2.13 cm and the positive control (antifungal) 0.93 cm. while the diameter of *P. chrysogenum* (2) was 2.23 cm, also the genus *P. citrinum* was 1.4 cm compared with the control treatment 1.23 cm .

Also results of the effects on the dry weight of fungus species has confirmed the catalytic effect these particles, showed that there were significant differences between the treatments, 12% was more concentration effect and

P. chrysogenum (2) was the most species affected were the rate of dry weight reached 0.463 g compared with the positive control (antifungal) 0.208 g.

Results of testing the nanoparticles of zinc particles in 12% on genes expression those are responsible to penicillin production. that *P. chrysogenum* (2), where they found significant differences between the treatment of the 12% compared with the control treatment of the three genes, gene expression rate to the three genes (*penDE*, *pcbC*, *pcbAB*) in concentration 12% it was (7.495, 8.943, 6.723) respectively, compared with the control treatment (1.272, 1.029, 1.045) respectively.

Also results of the activity of penicillin that produced in present of 12% zinc oxide nanoparticles, showed the effectiveness of penicillin against of *Staphylococcus epidermidis* in inhibition zone 19.66 mm, compared with the control treatment that was 12 mm.

**Ministry of Higher Education
And Scientific Research
University of Al-Qadisiya
College of Science**



**Effect of zinc oxide nanoparticles on the gene expression of genes regulating of
penicillin production in two species of *penicillium***

A Thesis

**Submitted to the Council of the College of Science / University of Al-Qadisiya
as Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in
Biology / microbiology**

By

Alaa Hasan sagban

B.Sc. of Biology / 2012

Supervised by

Prof. Dr. Neeran Obied Jassim

2017 A.D

1438 A.H

