



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والدراسة العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية للعلوم الصرفة
قسم علوم الحياة

**تأثير المركبات النانوية المحضرة من الفطر *Agaricus bisporus*
على الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis***

رسالة مقدمة
إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم في علوم الحياة - الفطريات

من قبل
نضال وهاب حميد
بكالوريوس تربية - علوم الحياة 2003

بإشراف
الأستاذة الدكتورة
بان طه محمد

1443 هـ

2021 م

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ رَبِّ أَوْزِعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ

وَعَلَىٰ وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي

بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة النمل : (الآية 19)

إقرار المشرف

أقر بأن اعداد الرسالة الموسومة:

(تأثير المركبات النانوية المحضرة من الفطر *Agaricus bisporus* على الفطرين
Trichophyton rubrum و *Microsporium canis*)

قد جرى بإشرافي في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء وهي
جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات .

التوقيع:

المشرف: أ.د. بان طه محمد

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 202

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا ورئيس القسم

إبناءً على التوصيات المقدمة من المشرف ارشح هذه الرسالة للمناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. نصير مرزة حمزة

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

مكان العمل: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 202

إقرار المقوم اللغوي

أقر بأن رسالة الماجستير الموسومة:

(تأثير المركبات النانوية المحضرة من الفطر *Agaricus bisporus* على الفطرين
Trichophyton rubrum و *Microsporium canis*)

التي تقدمت بها الطالبة (نضال وهاب حميد) قد جرى تقييمها لغوياً بإشرافي وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات .

التوقيع:

المرتبة العلمية: أستاذ

مكان العمل: كلية العلوم الاسلامية / جامعة كربلاء

التاريخ: / / 202

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا أعضاء لجنة المناقشة اطلعنا على هذه الرسالة الموسومة (تأثير المركبات النانوية المحضرة من الفطر *Agaricus bisporus* على الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis*) وقد ناقشنا الطالبة (نضال وهاب حميد) في محتوياتها وما له علاقة بها ووجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات () .

رئيس اللجنة

التوقيع:

الاسم: نيران عبيد جاسم

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

العنوان: جامعة القادسية / كلية العلوم

التاريخ: / /

عضو اللجنة

لتوقيع:

الاسم: محسن هاشم رسن

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

العنوان: جامعة النهرين / قسم التقانات الاحيائية

التاريخ: / /

عضو اللجنة

لتوقيع:

الاسم: ياسمين خلف خضير

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / /

عضو اللجنة (مشرف)

لتوقيع:

الاسم: بان طه محمد

المرتبة العلمية: استاذ دكتور

العنوان: جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / /

مصادقة عميد كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع :

الاسم: د. حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / /

الإهداء

إلى من علمني ان الدنيا كفاح ... وسلاحها العلم والمعرفة إلى اعظم واعز

رجل في الكون أبي طيب الله ثراه

إلى من ساندتني في صلاتها ودعائها ... إلى من سهرت الليالي تنير دربي

إلى أروع امرأة في الوجود .. أمي الغالية

إلى اللذين ظفرت بهم هدية من الأقدار .. أخوة فعرفوا معنى الأخوة ..

أخوتي الأحباء

إلى اختي العزيزة ورفيقة المشوار

إلى روح (اختي) الشهيدة وهي حية ترزق

إلى سندي في الحياة ... زوجي

إلى براعم العائلة وجيل المستقبل

نضال

شكر وتقدير

الحمد لله والصلاة والسلام على رسول الله وعلى اله وصحبه ومن ولاة.

في البداية الشكر والحمد لله جل في علاه فاليه ينسب الفضل كله في الجمال والكمال يبقى لله وحده بعد رحلة بحث وجهد واجتهاد تكمل بإنجاز هذا البحث، كما لا يسعني إلا ان اخص بأسمى عبارات الشكر والتقدير للأستاذ الدكتورة بان طه محمد لما قدمته لي من جهد ونصح ومعرفة طيلة انجاز هذا البحث فلولا الله ثم وجودها لما احسست بمتعة العمل وحلاوة البحث.

كما ادلي بالعرفان والجميل إلى جميعاً الأخوة العاملين في مركز صيانة المخطوطات ورعاية الباحثين في العتبة الحسينية المقدسة و اخص بالذكر مدير المركز السيد مناف لطيف حميد والاخوان احمد زغير جلاب وعلاء كاظم حمود.

كما اقدم جزيل شكري وتقديري إلى رئاسة قسم علوم الحياة واساتذتي الافاضل لتعاونهم اللامحدود خلال فترة الدراسة.

واتوجه بشكري وامتناني إلى الدكتورة شروق كاني ياسين لما كان لنصائحها وتوجيهاتها كما اشكر الأستاذة ميساء تقي عبد الحسن .

واقدم شكري وامتناني إلى من اعانني وساعدوا في اخراج هذا الرسالة واقدم شكري إلى الأستاذ علي مهدي جابر والأستاذ غيث رضا محمد، والدكتور عباس مطرود والدكتور علي المرزوكي والدكتورة لمى حاكم والست سولاف حسين.

وتعجز الكلمات شكر من شدّ ازري وأناار دربي أمي واخوتي واخواتي متمنية لهم جميعا دوام الصحة والعافية. وعرفاناً بالجميل أقدم الشكر والامتنان لكل الاصدقاء لما قدموه من مساعدة والى جميع الاساتذة وطالبة الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة.

واخيراً أود ان اشكر كل من ساعدني ولو بكلمة طيبة ولم أستطع ذكر أسمائهم.

الباحثة

الخلاصة:

إن الدراسة الحالية يمكن إدراجها ضمن الدراسات التي تحاول إيجاد بدائل للمضادات الحيوية في علاج الفطريات الجلدية، أجريت الدراسة في مختبر الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة كربلاء وفي مركز صيانة وترميم المخطوطات ورعاية الباحثين في العتبة الحسينية المقدسة من المدة 2020/11/1 لغاية 2021/11/1 بهدف دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* ومركبات النانوية (*ZnoaaNps*، *AgaaNps*، *ZnoawNps*، *AgawNps*) في نمو الفطريات الجلدية *Trichophyton rubrum* و *Microsporum Canis* وبتراكيز مختلفة مقارنة مع المضاد الفطري Clotrimazole . سجل الفطر *Agaricus bisporus* الاول بالعراق بالبنك الجيني العالمي Genbank بالرقمين التسلسليين MZ619063.1 و MZ798947.1، بينت نتائج تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction(PCR) ان العزلتين التي شخصت مظهرياً احتوت على حزمة مفردة من الحامض النووي المستخلص وتم قياس كمية ونقاوة الـ DNA المستخلص بجهاز (Nanodrop) وكانت نتائج التحليل الجيني (ITS) موجبة وكان الـ Marker Ladder (100- bp (1500) ، وكما بينت النتائج الجزيئية والمسجلة في البنك الجيني العالمي ومن خلال الشجرة الوراثية ان نسبة التقارب بين الانواع العراقية والانواع العالمية هي (99%) التي تعود إلى الدولة الاتية (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient - United Kingdom) ، اما نسبة التقارب والتشابه بين الأنواع التي تعود لهذه الدول 100%.

وتم فحص المركبات النانوية بمقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer وطيف الأشعة تحت الحمراء (FT-IR) Fourier transform in fared وطيف حيود الأشعة السينية (XRD) X-ray diffraction والمجهر الالكتروني الماسح Scanning Election Microscope(SEM) .

أظهرت النتائج باستخدام تقنية (qRT – PCR) Real time PCR ان تعبير الجين Serine protease الخاصة بالفطر *Trichophyton rubrum* ومجموعة السيطرة The specific primer of B-TUBULIN حيث حصل انخفاض واضح في التعبير الجيني لـ Serine protease في المعاملة

(1,10) وازداد في المعاملة (18,22) مقارنة مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبيراً جينياً بمقدار (fold chang1).

أما بالنسبة لتعبير الجين Serine protease الخاصة بالفطر *Microsporium Canis* ومجموعة السيطرة The specific primer of B- TUBULIN حيث حصل ازدياد واضح في التعبير لـ Serine protease في كل من المعاملة (9, 13, 24, 27) مقارنة مع نتيجة التعبير الجيني لمجموعة السيطرة التي تعادل تعبيراً جينياً بمقدار (Fold change1).

وتبين عن طريق النتائج وجود علاقة عكسية بين قيم ct والتعبير الجيني فكلما زادت قيمتها انخفض التعبير الجيني (ترتبط عكسياً بكمية قالب البداية التي تعني ارتفاع قيمة ct يشير إلى انخفاض مستويات التعبير الجيني أو جين التضخيم).

حضرت التراكيز المختلفة 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 من المستخلصات الكحولية والمائية والمركبات النانوية والمضاد الفطري وتم الحصول على النتائج بدلالة قطر المستعمرة على وسط Sabourand Dextrose Agar ووزن المستعمرة على وسط Sabourand Dextrose Agar بعد 14 يوماً من الحضانة للفطريات المدروسة ودراسة شكل المستعمرات الفطرية على الوسط الزرعي Sabourand Dextrosus Agar فضلاً عن تحضير الشراح المجهرية.

أوضحت النتائج ان المركبات النانوية (ZnoaaNps, AgaaNps) أثرت في معدل القطر والوزن الجاف للمستعمرات الفطرية بصورة أكبر في تثبيط نمو *Microsporium Canis*, *Trichophyton rubrum* فكان تأثيرهما مشابه لتأثير العقار الطبي Clotrimazole بينما المركبات النانوية (AgaawNps, ZnoawNps) وكانت أقل تأثيراً على معدل القطر والوزن الجاف للمستعمرات الفطرية للفطريات المدروسة.

كذلك بينت النتائج إن المستخلص الكحولي والمائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* لم تؤثر بشكل ملحوظ بمعدل القطر والوزن الجاف للمستعمرات الفطرية بل إنهما إذا من معدل النمو للقطر والوزن الجاف للمستعمرات الفطرية مشابهاً بذلك عينة السيطرة.

المركبات النانوية ZnoaaNps, AgaaNps كانت أكثر تثبيطاً بمعدل قطر *Trichophyton rubrum* على التوالي (1, 1.23) mm و (1.16, 1.03)mm على التوالي لفطر *Microsporium Canis*.

أما بالنسبة للوزن الجاف للمستعمرات الفطرية فكان المركبات النانوية (ZnoaaNps , AgaaNps) الأكثر تثبيطاً للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum Canis* بوزن (0.016 , 0.045) mg على التوالي بالنسبة للفطر *Trichophyton rubrum* و (0.019 , 0.039) mg على التوالي بالنسبة للفطر *Microsporum Canis*.

فكان معدل القطر الأكثر تثبيطاً بالنسبة للفطر *Trichophyton rubrum* (1.56), و (1.10) mm على التوالي و (0.96, 1.06) mm على التوالي للفطر *Microsporum Canis*.

أما بالنسبة للوزن الجاف للمستعمرات الفطرية فكان المركبات النانوية (ZnoawNps , AgawNps) أقل تأثيراً من المركبات النانوية (ZnoaaNps , AgaaNps) فكان معدل وزن الجاف لمستعمرات الفطر *Trichophyton rubrum* الأكثر تثبيطاً (0.016, 0.032) mg على التوالي و (0.014, 0.040) mg على التوالي لفطر *Microsporum Canis*.

أظهرت النتائج تفوق المستخلصات النانوية الخضراء من الزنك والفضة النانوية في تثبيط نمو الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum Canis* وهو بذلك مشابه تأثير المضاد الفطري Clotrimazole.

تعد هذه الدراسة الأولى من نوعها في مجال تحويل المستخلص الكحولي والمائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* إلى مستخلصات نانوية من الفضة والزنك في تثبيط نمو وفعالية الفطريات الجلدية والعمل على إيجاد البدائل للمضادات الفطرية الشائعة الاستعمال.

أجريت العديد من الفحوصات المجهرية على الفطريات المدروسة وأوضحت تأثير المعاملات المختلفة على العزول الفطرية وتباين هذا التأثير بين تحلل أو التشوهات في الغزل الفطري وانفصال البروتوبلازم في بعض المناطق وتجمعها في مناطق أخرى فضلاً عن اختفاء الكونيدات الصغيرة وتشوه الكونيدات الكبيرة، هناك تشوهات داخلية يمكن ملاحظتها أثناء الفحص المجهرى وكان أبرزها تكتل البروتوبلازم في داخل الخلايا الفطرية وانفصال الغشاء البلازمي وهناك تأثير آخر أمكن ملاحظته هو تكون أنواع كلاميذية بغزارة.

قائمة المحتويات

الصفحة	الموضوع
ب	الاية القرآنية
ج	إقرار المشرف
د	إقرار المقوم اللغوي
هـ	إقرار لجنة المناقشة
و	الاهداء
ز	الشكر والتقدير
ح-ي	الخلاصة
ك-س	قائمة المحتويات
ع	قائمة الجداول
ف-ر	قائمة الاشكال
ش	قائمة الملاحق
ش	قائمة المختصارات
5-1	الفصل الأول: المقدمة Introduction
1	1-1 المقدمة :
4	الهدف من الدراسة:
4	محاوِر الدراسة :
20-6	الفصل الثاني : استعراض المراجع Review of literatures
6	1-2 فطر <i>Trichophyton rubrum</i>
	2-2 فطر <i>Microsporum canis</i>
	3-2 الإفات الجلدية الناتجة عن الفطريات الممرضة
	4-2 المضادات الفطرية
	1-4-2 مضاد الكلوتريمازول Clotrimazole
	5-2 المستخلصات النباتية plant extract
	6-2 مستخلص فطر <i>Agaricus bisporus</i>
	1-6-2 جسيمات الفضة النانوية AgNPs
	2-6-2 اوكسيد الزنك النانوي ZnO Nanoparticles
	7-2 انزيم Serine proteases
	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and methods
	1-3 الأجهزة والمواد المستعملة Device and Materials
	2-3 الأوساط الزراعية Culture Media

الصفحة	الموضوع
	Subouraud Dextrose Agar وسط 1-2-3
	Subouroud Dextrose broth وسط 2-2-3
	3-3 تعقيم الأوساط الزراعية
	4-3 طرائق العمل
	1-4-3 الفطريات المستخدمة في الدراسة
	2-4-3 الحصول على فطر المشروم وتجفيفه
	5-3 المستخلصات
	1-5-3 تحضير المستخلصات الكحولية paration of the alcoholic extract
	2-5-3 تحضير المستخلصات المائية Preparing the aqueous extract
	6-3 التشخيص الجزيئي لفطر المشروم Molecular Diagnosis of Agaricus bisporus
	1-6-3 استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (Deoxyribonucleic acid, DNA)
	3-6-3 الكشف عن الجين (ITS) The specific primer of gene
	4-6-3 اعداد هلام الاكاروز Prepare of the Agarose gel
	5-6-3 تحليل تسلسل القواعد النتروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف
	6-3 تحضير المركبات النانوية من المستخلصات المائية والكحولية للمشروم
	1-6-3 اختزال نترات الفضة من المستخلصات المائية والكحولية للمشروم باستخدام AgNo3
	2-6-3 تحضير اوكسيد الزنك من المستخلصات الكحولية المائية باستخدام Zinc Oxide
	3-6-3 الاختبارات التي تم اجراها لكشف عن تكوين المركبات النانوية لزنك والفضة وهي:
	7-3 الصفات المظهرية والمجهرية للفطرين Trichophyton rubrum و Microsporium Canis بعد المعاملة
	8-3 قياس معدل الوزن الجاف للمستعمرات الفطرية النامية على وسط SDB
	9-3 التعبير الجيني
	1-9-3 التعبير الجيني للجين الانزيم Serine protease الخاصة الفطرين , Trichophyton rubrum , M.canis
	1-1-9-3 استخلاص الحامض النووي الرايبوي RNA
	10-3 طريقة تحليل بيانات - Real - Time PCR data analysis
	11-3 التحليل الاحصائي : Statistical analysis -
	Results الفصل الرابع : النتائج
	1-4 الخواص المظهرية والمجهرية للفطرين Microsporium canis, Trichophyton rubrum,
	1-1-4 الفطر Trichophyton rubrum isolate IQT-Na
	1-1-1-4 الصفات المظهرية

الصفحة	الموضوع
	2-1-1-4 الصفات المجهرية
	M.canis isolate IQM No.3 الفطر 2-1-4
	1-2-1-4 الصفات المظهرية
	2-2-1-4 الصفات المجهرية
	2-4 الخصائص المظهرية والجزئية للفطريات الجلدية الخاص بالجنسين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporum canis</i> ,
	3-4 الصفات المظهرية والجزئية لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i>
	1-3-4 الصفات المظهرية
	2-3-4 الصفات الجزئية
	1-2-3-4 التشخيص الجزيئي لفطر المشروم <i>Molecular Diagnosis of Agaricus bisporus</i>
	4-4 مواصفات المركبات النانوية المحضرة من المشروم بواسطة XRD. SEM. FTIR. و UVL. لنترات الفضة النانوية فقط
	1-4-4 فحص FTIR
	1-1-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك <i>ZnoaaNps</i> الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك
	2-1-4-4 خصائص المركب النانوي لاوكسيد الزنك <i>ZnoawNps</i> الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك
	3-1-4-4 المركب النانوي لنترات الفضة <i>AgaaNps</i> الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	4-1-4-4 المركب النانوي لنترات الفضة <i>AgawNps</i> الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i>
	2-4-4 طيف حيود الأشعة السينية XRD
	1-2-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك <i>ZnoaaNps</i> الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك
	2-2-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك <i>ZnoaaNps</i> الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك
	3-2-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة <i>AgaaNps</i> الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم نترات الفضة
	4-2-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة <i>AgawNps</i> الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع نترات الفضة
	3-4-4 تحليل المجهر الالكتروني الماسح SEM
	1-3-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك <i>ZnoaaNps</i> الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

الصفحة	الموضوع
	2-3-3-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشرووم مع اوكسيد الزنك
	3-3-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgaaNps الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشرووم مع نترات الفضة
	4-3-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgawNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشرووم مع نترات الفضة
	5-4 بواسطة جهاز مقياس الأشعة فوق البنفسجية.UVL
	1-5-4 خصائص المركب النانوي لجسيمات نترات الفضة AgaaNps الناتجة من المستخلص الكحولي لفطر المشرووم مع نترات الفضة
	2-5-4 خصائص المركب النانوي لجسيمات نترات الفضة AgawNps الناتجة من المستخلص المائي لفطر المشرووم مع نترات الفضة
	6-4 تقييم المركبات النانوية المحضرة في نمو الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporum Canis</i>
	1-6-4-1 تقييم المركبات النانوية المحضرة في معدل قطر المستعمرات الفطرية
	2-6-4-2 تقييم المركبات النانوية المحضرة في الصفات المظهرية والمجهرية للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporum Canis</i>
	3-6-4-3 تقييم المركبات النانوية المحضرة في الصفات والمجهرية للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporum Canis</i>
	4-6-4-4 تقييم المركبات النانوية المحضرة في معدل وزن المستعمرات الفطرية (mg)
	7-4 نتائج تحليل بيانات Real-Time PCR data analysis
	الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations
	الاستنتاجات
	التوصيات
	المصادر والمراجع
A-C	الملخص باللغة الانكليزية
-	العنوان الانكليزي

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان
21	الجدول (1-3): الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ.
	الجدول (2-3) المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ
	الجدول (1-4) العزلة العراقية لفطر المشروم Agaricus bisoporus ونسبة التطابق بينهما
	الجدول (2-4) نسبة التقارب بين الانواع العراقية والعالمية.
	الجدول (3-4) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لاوكسيد الزنك المتكون من المستخلص الكحولي لفطر المشروم Agaricus bisoporus
	الجدول (4-4) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لاوكسيد الزنك المتكون من المستخلص المائي لفطر المشروم Agaricus bisoporus
	الجدول (5-4) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لنترات الفضة المتكون من المستخلص الكحولي لفطر المشروم Agaricus bisoporus
	الجدول (6-4) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لنترات الفضة المتكون من المستخلص المائي لفطر المشروم Agaricus bisoporus
	الجدول (7-4) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم الكحولي
	الجدول (8-4) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم المائي
	الجدول (9-4) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم الكحولي
	الجدول (10-4) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم المائي
	الجدول (11-4) الجينات المرجعية المستخدمة في الدراسة Reference gene
	الجدول (12-4) يمثل الجين المستهدف في الدراسة Target gene
	الجدول (13-4) التعبير الجيني لانزيم Serine protease

قائمة الأشكال

الصفحة	العنوان
11	الشكل (1-2): التركيب الهيكلي كلوتريمازول
	الشكل (1-4) الوجه الامامي والخلفي لفطر الـ <i>Trichophyton rubrum</i> والصور المجهرية
	الشكل (2-4) الوجه الامامي والخلفي لفطر الـ <i>M.canis</i> والصور المجهرية
	الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لفطر المشروم
	الشكل (4-4) يبين الفطر المشروم (الاول بالعراق)
	الشكل (5-4) تحليل الشجرة الوراثية للعينه Agaricus bisporus A, B وتطابق بنسبة 99% مع العينات للدول (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient United Kingdom) والنسبة العشرية والمئوية.
	الشكل (6-4) تحليل الشجرة بالنسبة المئوية لفطر Agaricus bisporus A, B وكانت نسبة التوافق 99% مع العينات للدول (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient - United Kingdom)
	الشكل (7-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لاوكسيد الزنك من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	الشكل (8-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لاوكسيد الزنك من المستخلص المائي لفطر المشروم
	الشكل (9-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	الشكل (10-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص المائي لفطر المشروم
	الشكل (11-4) طيف حيود الأشعة السينية لاوكسيد الزنك الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	الشكل (12-4) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لاوكسيد الزنك الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم Agaricus bisporus
	الشكل (13-4) طيف حيود الأشعة السينية لاوكسيد الزنك الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم
	الشكل (14-4) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لاوكسيد الزنك الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم
	الشكل (15-4) طيف حيود الأشعة السينية لنترات الفضة الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	الشكل (16-4) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لنترات الفضة الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم
	الشكل (17-4) طيف حيود الأشعة السينية لنترات الفضة الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم
	الشكل (18-4) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لنترات الفضة الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم

الصفحة	العنوان
	المشروم
	الشكل (4-19) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص الكحولي لفطر المشروم Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة
	الشكل (4-20) يوضح تكون مواد نانوية أخرى فضلاً عن أكسيد الزنك النانوية من مستخلص المشروم الكحولي
	الشكل (4-21) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص المائي لفطر المشروم Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة
	الشكل (4-22) يوضح تكون مواد نانوية أخرى فضلاً عن أكسيد الزنك النانوية من مستخلص المشروم المائي
	الشكل (4-23) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص الكحولي لفطر المشروم Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة
	الشكل (4-24) يوضح تكون مواد نانوية أخرى فضلاً عن الفضة النانوية من مستخلص المشروم الكحولي
	الشكل (4-25) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص المائي لفطر المشروم Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة
	الشكل (4-26) يوضح تكون مواد نانوية أخرى فضلاً عن الفضة النانوية من مستخلص المشروم المائي
	الشكل (4-27) منحنى الطيف لجسيمات نترات الفضة النانوية AgaaNps بواسطة جهاز المطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-VIS Spectrophotometer
	الشكل (4-28) منحنى الطيف المرئي لجسيمات نترات الفضة AgawNps بواسطة جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV-VIS Spectrophotometer
	الشكل (4-29) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين Trichophyton rubrum Microsporium canis والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 °م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-30) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين Trichophyton rubrum Microsporium canis والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 °م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-31) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين Trichophyton rubrum Microsporium canis والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 °م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-32) التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع والمستخلص في معدل قطر الفطرين Trichophyton rubrum Microsporium canis والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة

الصفحة	العنوان
	25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-33) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-34) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-35) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-36) التداخل الثنائي بين نوع الفطر وتركيز المستخلص في معدل قطر الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-37) تأثير كل من معدل الفطر، نوع المستخلص، تركيز المستخلص % في معدل قطر الفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2 م° ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-38) تأثير مستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Trichophyton</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°
	الشكل (4-39) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Trichophyton</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°
	الشكل (4-40) تأثير الزنك الكحولي والمائي من مستخلص المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Trichophyton</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°
	الشكل (4-41) تأثير الفضة الكحولي والمائي من مستخلص المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Trichophyton</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°
	الشكل (4-42) تأثير مستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Microsporium</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°
	الشكل (4-43) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Microsporium</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 م°

الصفحة	العنوان
	الشكل (4-44) تأثير الزنك الكحولي والمائي من مستخلص المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Microsporium</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م
	الشكل (4-45) تأثير الفضة الكحولي والمائي من مستخلص المشروم <i>Agaricus bisporus</i> بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر <i>Microsporium</i> على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م
	الشكل (4-46) تأثير المستخلصات الكحولية والمائية لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i> على الشكل المجهرى للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium Canis</i> بعد تصيبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X
	الشكل (4-47) تأثير المضاد الفطري <i>Clotrimazole</i> على الشكل المجهرى للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium Canis</i> بعد تصيبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X
	الشكل (4-48) تأثير المستخلص الكحولي والمائي مع الزنك <i>ZnoaaNps</i> , <i>ZnoawNps</i> لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i> على الشكل المجهرى للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium Canis</i> بعد تصيبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X
	الشكل (4-49) تأثير المستخلص الكحولي والمائي مع الفضة <i>AgaaNps</i> , <i>AgawNps</i> لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i> على الشكل المجهرى للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium Canis</i> بعد تصيبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X
	الشكل (4-50) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2° م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-51) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2° م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-52) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2° م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-43) التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع والمستخلص في معدل الوزن الجاف للفطرين <i>Trichophyton rubrum</i> و <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2° م ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-54) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل

الصفحة	العنوان
	الوزن الجاف للفطريين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-55) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطريين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-56) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطريين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-57) التداخل الثنائي بين نوع الفطر وتركيز المستخلص في معدل الوزن الجاف للفطريين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-58) التداخل الثنائي بين معدل الفطر، نوع المستخلص، ومعدل التركيز في معدل الوزن الجاف للفطريين <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporium canis</i> والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ ولمدة 14 يوم.
	الشكل (4-59) المنحنى البياني للتعبير الجيني Serine protease للجينات المرجعية
	الشكل (4-60) المنحنى البياني للتعبير الجيني Serine protease متمثلاً بالجينات المستهدفة

قائمة الملاحق

الصفحة	العنوان	
146	تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلة A	.1
147	تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلة B	.2
148	الستجيل بالبنك الجيني للعزلة A	.3
150	الستجيل بالبنك الجيني للعزلة B	.4
152	تسلسل القواعد النيتروجينية للتشخيص الجزيئي لفطر المشروم <i>Agaricus bisporus</i>	.5

قائمة المختصرات

الرمز	الوصف الكامل
A. bisporus	<i>Agaricus bisporus</i>
AgaaNps	المركب النانوي من المستخلص الكحولي لفطر المشروم و نترات الفضة AgNo3
AgawNps	المركب النانوي من المستخلص المائي لفطر المشروم و نترات الفضة AgNo3
AgNo3	Sliver nitrate
FT-IR	Fourier transform infrared spectrophotometer
M.Canis	<i>Microsporium canis</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDB	Sabouraud Dextrose broth
SEM	Scanning Electron Microscope
T. rubrum	<i>Trichophyton rubrum</i>
UVL	Spectrophotometer UV-VIS
XRD	X-Ray diffraction
Zno	Zinc oxid
ZnoaaNps	المركب النانوي من المستخلص الكحولي لفطر المشروم و اوكسيد الزنك Zno
ZnoawNps	المركب النانوي من المستخلص المائي لفطر المشروم و اوكسيد الزنك Zno

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

الفصل الأول

المقدمة Introduction

1-1 المقدمة :

يعد الطبيب المجري ديفيد غروبي هو المؤسس لعلم الفطريات الجلدية الطبية dermatomycology، وفقا لإكتشافاته في الفترة 1841-1844م ونشره لتلك الاكتشافات في مجلة الاكاديمية الفرنسية للعلوم في تلك المدة، إذ قام بوصف العامل المسبب لداء favus وداء القشريات التي تصيب فروة الرأس والناطقة عن الإصابة بفطر *Trichophyton schoenleinii* من الناحية السريرية والمجهريه والطبيعة المعدية للفطر (Summerbell, 1995).

الفطريات الجلدية Dermatophytes هي مجموعة من الفطريات التي لها القدرة على مهاجمة الأنسجة الكيراتينية للإنسان والحيوان كالشعر والجلد والأظافر مسببة ما يعرف بداء الفطار الجلدي Dermatophytosis، وتضم هذه الفطريات ثلاثة أجناس هي *Trichophyton*، *Microsporum* و *Epidermophyton* (Janardhan 2017). كذلك يوجد عدد من الاجناس الفطرية الأخرى مثل *Pityriasis versicolor*، *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida spp* تكون ممرضة انتهائية opportunist pathogenic fungi قادرة على إحداث اصابات والتهابات سطحية على جسم الإنسان والفقرات الأخرى (Gupta & Cooper, 2008). وتعتبر الأمراض الجلدية الناتجة عن الاصابات الفطرية من أكثر الأمراض المعدية انتشارا وإصابة للإنسان حول العالم، وعلى الرغم من انتشارها الكبير إلا إن نسبة المصابين بها لا يتعدى 20 % من سكان العالم (Kadhim et al., 2015).

وتوجد عدة طرق لإنتشار العدوى الفطرية، إذ تنتشر بعضها بشكل مباشر من شخص لآخر ويطلق عليها anthropophilic organisms، وهناك ما يعيش في التربة وينتقل منها إلى الإنسان بشكل مباشر ويطلق عليها geophilic organisms، أما النوع الآخر فهو ينتقل من الحيوانات المنزلية أو البرية إلى الإنسان ويطلق عليها zoophilic organisms، كما يمكن ان ينتقل عن طريق الادوات الملوثة مثل المفروشات والقبعات وفرشاة الشعر (Rodwell et al.,

(2008). ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية WHO (Kumar et al., 2007)، فإن الفطريات الجلدية تؤثر في 25% من السكان حول العالم، ولكن هنالك من 30-70% من البالغين منهم لا تظهر عليهم أعراض الإصابة الفطرية، وتزداد شدة الإصابة مع التقدم بالسن للشخص الحامل للفطر الممرض، وبشكل عام فإن الفطريات الجلدية تظهر نمطاً عالمياً من الانتشار والتواجد في مختلف مناطق العالم، مع وجود اختلاف في وتيرة انتشار نوع دون آخر من منطقة لأخرى، ناتج عن اختلاف الظروف المناخية والاجتماعية لكل منها (Peres et al., 2010). على الرغم من وجود عدة عوامل تساهم في نجاح الفطر في إحداث عملية الإصابة إلا أن حدوث الأمراض ترتبط بشكل كامل بقدرة الفطر في التغلب على اليات المقاومة الخاصة بالمضيف كالأحماض الدهنية المضادة للفطريات fungistatic fatty acids، سلامة الطبقة الكيراتينية في الجلد فضلاً عن عوامل الرطوبة والحرارة ومستوى pH في الجلد (Martinez-Rossi et al., 2018). ويعد داء القوباء الحلقية ring-worm والتي يطلق عليها داء السعفة Tinea وفقاً للاصل اللاتيني للكلمة، أحد أشهر الآفات الجلدية الناتجة عن الإصابة بأجناس *Trichophyton*، *Microsporum* و *Epidermophyton*

الهدف من الدراسة:

تحويل المستخلصات المائية والكحولية لفطر المشروم *Agaricus bisporus* إلى مركبات نانوية متمثلة بالزنك النانوي والفضة النانوية في محاولة إيجاد السبل البديلة للمضادات الفطرية وتثبيط نمو الفطرين الممرضين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* ودراسة تأثيرهما على جين الانزيم Serine protease.

محاوِر الدراسة :

- 1- الحصول على فطر المشروم *Agaricus bisporus* وتشخيصه جزئياً وتسجيله في البنك الجيني العالمي وتحديد الشجرة الوراثية ومدى التقارب والتباعد مع الأجناس العالمية .
- 2- استخدام مستخلصات المشروم *Agaricus bisporus* الكحولية المائية في تثبيط الفطرين الجلديين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* .

3- تحويل المستخلصات الكحولية والمائية لفطر المشروم *Agaricus bisporus* إلى مستخلصات نانوية متمثلة بالنزك النانوي والفضة النانوية .

4- دراسة التعبير الجيني للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* المعامل بالمستخلصات النانوية على الجين الانزيم Serine protease.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Review of literatures

الفصل الثاني

استعراض المراجع Review of literatures

1-2 فطر *Trichophyton rubrum*

يتميز فطر *T. rubrum* بقدرته على مقاومة الظروف البيئية المختلفة خارج الجسم الحي وهذا مما ساعد على بقاءه لفترات طويلة دون مضيء يتطفل عليه قد تصل إلى أكثر من ستة أشهر (Wang et al., 2006). يسبب فطر *T. rubrum* ما لا يقل عن 60 % من الاصابات الجلدية الفطرية حول العالم، مسببا ما يعرف بداء السعفة *tinea* وتتركز اصابات السعفة عادة في مناطق الرأس مسببة ما يعرف بسعفة الرأس *tinea capitis* وكذلك في القدم مسببة سعفة القدم *tinea pedis* والتي تنتشر بشكل كبير لدى الرياضيين وتسمى بداء القدم الرياضي Athlete's foot وكذلك سعفة اليد *tinea manuum* والسعفة الأربية *tinea inguinalis* وسعفة الاظافر *tinea unguium* (Pereira et al, 2011). يسبب الفطر نوع من العدوى التي غالبا ما تكون سطحية على الجلد، كما أنه يؤثر في قرنية العين، أما بالنسبة للمرضى الذين يعانون من نقص المناعة immunocompromised patients فتكون الإصابة أعمق وتصل إلى الأعضاء الداخلية (kim et al., 2016).

يفضل الفطر التواجد في المناطق الرطبة وينمو الفطر بمدى حراري عالي نسبيا إذ ينمو بدرجة 20-40°م، وتعد الدرجة 30°م هي الدرجة المثالية للنمو، كما يمكن للفطر أن ينمو بدرجة حامضية 6 وتعتبر هذه الظروف هي المثالية للفطر لإنتاج الانزيمات المحللة للبروتينات على وسط سابرويد دكستروز اجار (SDA Sabouraud dextrose agar) (Kadhim et al., 2015). تظهر مستعمرة جنس الفطر *T. rubrum* على الاوساط الزرعية بشكل صوفي أو زغبي ذات لون وردي مع نمو متوسط السرعة، يظهر الخيط الفطري تحت المجهر بتفرعات غزيرة ومنتجة للابواغ الكونيدية بكثافة عالية، والتي تكون بنوعين صغيرة دمعية الشكل tear-shaped وmicroconidia وكبيرة ذات شكل اسطواني يشبه السيجار cigar-shaped macroconidia (Liu et al., 2018). بعض أنواعه منتجة للأجسام الثمرية من النوع pseudo-ascomata ، بينما يفتقر جنس الفطر *T. rubrum* طور الـ telomorph (Metin & Heitman, 2017). كما إن الفطر قادر

على انتاج اجسام ثمرية حقيقية وانتاج أبواغ كيسية ناضجة (Summerbell & Weitzman, 1995). وبين (Ohst et al, 2004) إن الموطن الاصلي لهذا الفطر هو منطقة الشرق الأقصى ثم انتقل إلى بقية اجزاء العالم بفعل العدوى التي نقلها الجنود الاوربيون اثناء الحرب العالمية الاولى. وصف الفطر لأول مرة عام 1896 م كأول فرد يتم تشخيصه في مجموعة الفطريات الجلدية، ومن ثم وصفه Castellani جنبا إلى جنب مع *Trichophyton mentagrophytes* لأحد المسببات الرئيسية لداء السعفة tinea في الإنسان وفي عشرينيات القرن الماضي تم وصفه كعامل مسبب لسعفة الوجه Tinea Faciei في غرب اوربا، واصبح متوطناً في دول البحر المتوسط كمسبب رئيسي لسعفة الجلد بنهاية القرن العشرين (GRAˆSER et al , 2000).

ينتج الفطر عدد من المركبات العضوية كالانزيمات وغيرها والتي تمثل عامل ضراوة على المضيف، إذ يعد إنزيم الكيراتينيز keratinase هو المركب الاساسي الذي يعمل على تحلل طبقة الكيراتين في جلد المضيف، كما يقوم الفطر بإنتاج انزيم البروتياز protease المسؤول عن تحليل البروتينات والفسفولايبيز phospholipase المسؤولة عن تحليل طبقات الدهون وتحويلها إلى احماض دهنية اساسية يسهل امتصاصها، فضلا عن انتاجه لسم الزانثوميغنين xanthomegnin والذي يعطي اللون الأحمر الوردي والذي يمكن مشاهدته على موضع الإصابة (Elavarashi et al., 2017). كما ينتج الفطر مركبات الشبيه بالميلانين melanin-like compounds والتي تعمل كعامل وقاية للفطر ضد العوامل القاتلة إذ وجود هذه الصبغة يعمل على تقليل خطر الجذور الكيميائية المشتقة من عنصري النيتروجين والاكسجين، فضلا عن إنها تعمل على زيادة مقاومة الفطر للمضادات الحيوية (Youngchim et al., 2011). وبين كل من (Mendoza et al., 2002) و (de Hoog et al., 2000) إن الفطر *Trichophyton* ينتمي إلى مجموعة الفطريات الكيسية الحقيقية ضمن مجموعة الفطريات الجلدية وكما موضح ادناه:

Kingdom: Eumycota

Phylum: Ascomyco

Class: Euascomycetes

Order: Onygenales

Family: Arthrodermataceae

Genus: *Trichophyton rubrum*

2-2 فطر *Microsporium canis*

يتطفل جنس الفطر *M. Canis* في الغالب على الكلاب والقطط، وتعتبر القطط كمضيف خازن له، كما تم تسجيل العديد من حالات الإصابة للحيوانات المنزلية والبرية الأخرى (Chermette *et al.*, 2008). وتم الحصول على العزلة ذات الرقم التسلسلي MK167439.1 لفطر *M. canis* من مرضى يراجعون مستشفى الحسين الطبي في محافظة كربلاء (Mohammed *et al.*, 2021; Al-Masaoodi, 2021). يتكاثر الفطر لا جنسياً من خلال الانقسام الخيطي وتختلف تراكيب propagules والتي تنشأ من الكونيديا وفقاً لموقع تواجد الفطر، فعند غزو الشعر، تتجزأ الهيافات لتنتج كتل صغيرة من الكونيديات مقصلية الصغيرة والتي تمثل الجزء المعدي من الفطر (Andrea Peano *et al.*, 2017).

وصف الفطر لأول مرة عام 1843 م من قبل العالم غروبي (Gruby *et al.*, 2000). وبعد الحرب العالمية الثانية بدأت عدوى *M. Canis* تظهر بشكل موجات وبائية متفرقة في مدن اوربية عديدة، ثم أصبح بعد ذلك واحداً من أكبر مصادر العدوى الجلدية الفطرية في إيطاليا، إسبانيا وفرنسا (Iunder, 1992). يعد الفطر *M. Canis* من الفطريات الجلدية المحبة للحيوانات zoophilic، ويسبب لها ما يعرف بداء السعفة tinea أو القوباء الحلقية ring worm وأكثر الحيوانات إصابة بهذا المرض هي الحيوانات الأليفة كالقطط والكلاب المنزلية والتي ينتقل منها إلى الإنسان كما يمكن أن يصيب الخنازير والابقار والخيول أيضاً والدواجن والقوارض (Torres-Guerrero *et al.*, 2016). يصيب الفطر مناطق الرأس والاطراف وقرنية العين وتكون أكثر شيوعاً في الاطفال (Gürtler *et al.*, 2005). تتراوح حدة الاصابات من عديمة الأعراض وصولاً إلى حدوث أعراض شديدة كالتقرحات الجلدية وتساقط الشعر، ويظهر الفحص المجهرى لمناطق الإصابة عادة خيوط فطرية كثيرة ومتفرعة ونحيلة، مع وجود الكثير من الابواغ المفصليّة arthroconidia المسؤولة عن نقل الإصابة إلى كائن اخر (Mendoza *et al.*, 2010). يختلف انتشار هذا الفطر ودرجة الإصابة باختلاف الظروف المحيطة به، كالمنطقة الجغرافية وعمر المصاب والجنس وموسم الإصابة ففي الإنسان بعمر 16 عام فأكثر تكون احتمالية إصابة الذكور أعلى من في الاناث، فضلاً عن تأثره بالعامل الوراثي للمضيف إذ تكون درجة الإصابة مختلفة باختلاف السلالات الوراثية في القطط والكلاب وانتقال الفطر يكون فقط عبر ملامسة الفرد المريض بشكل مباشر (Cafarchia *et al.*, 2018). ينتج الفطر عدد من الانزيمات المختلفة

التي تلعب دورا هاما في تشكيل ضراوة الفطر كانزيم الكولاجينيز collagenases المحلل للكولاجين وكذلك انزيم الايلاستيز elastases واللايبيز lipases (Viani et al., 2001).

يتكاثر الفطر بطريقة جنسية (Teleomorph) كما هو الحال في اغلب مجموعة الفطريات الجلدية (Kano et al., 2009). أما الطريقة اللاجنسية التكاثر اللاجنسي فيتم بالانقسام الخيطي والتراكيب الخضرية propagules تنتج من السبورات الكونيدية اللاجنسية والتي تختلف باختلاف البيئة، تتجزأ الهايفات hyphae لتنتج ما يعرف بالكونيديات المفصلية arthroconidia والتي تمثل الجزء المعدي من الفطر وعلى الاوساط الزرعية ينتج الفطر كونيدات متعددة الخلايا كبيرة مغزلية الشكل multi-celled spindle shaped macroconidia، واخرى احادية الخلية صغيرة الحجم one-celled microconidia (Pasquetti et al, 2017). وعلى الرغم من الفطر *M. Canis* لم يكتشف طوره الجنسي بشكل واضح ولم يتضح انتاجه للجسام الثمرية الجنسية إلا أن الطرز الوراثية والادلة التطورية الحديثة تشير إلى انها تحمل خليطاً جينياً متنوعاً فريد من نوعه أدى إلى الاختلاف الحاصل في خصائصه المظهرية وتنوع المضائف التي يعيش عليها (Heitman et al, 2010).

يظهر شكل مستعمرة الفطر على وسط SDA الغذائي بمظهر زغبي ابيض اللون مائل للاصفر أما الجانب الأسفل من الطبقة فيظهر بلون اصفر داكن (Pasquetti et al, 2017). يبدو الغزل الفطري تحت المجهر بشكل كتل من الخيوط الفطرية المقسمة الأسطوانية الشكل المتفرعة، مع وجود سلاسل من السبورات المفصلية arthrospores، فضلاً عن تغليف الشعرة بالغزول الفطرية والكونيديات ectothrix مما يؤدي إلى تدمير فروة الرأس إذ تقوم بالالتفاف حول قاعدة الشعرة و من ثم تدمير الكيراتين فيها مما يؤدي إلى تساقط فروة الرأس في منطقة الإصابة (Mendoza et al., 2010). وبين Mihali وجماعته (2012) إن الفطر *M. Canis* ينتمي إلى مجموعة الفطريات الكيسية الحقيقية Euascomycetes ضمن مجموعة الفطريات الجلدية و كما موضح ادناه:

Kingdom: Eumycota

Phylum: Ascomycota

Class: Euascomycetes

Order: Onygenales

Family: Arthrodermataceae

Genus: *Microsporum Canis*

2-3 الآفات الجلدية الناتجة عن الفطريات الممرضة

وفي السنوات الأخيرة ظهرت زيادة ملحوظة في أعداد المصابين بالعدوى الفطرية، مع انخفاض في قدرة العقاقير على محاربة هذه الاجناس المعدية، فضلا عن الآثار الجانبية التي يمكن تسببها تلك العقاقير؛ ويمكن تقسيم الآفات الجلدية الناتجة عن الفطريات الممرضة إلى عدة انواع هي :

1- سعفة الرأس *Tinea Capitis* : وهي التي تصيب فروة الرأس وتنتشر بشكل أكبر بين الاطفال، وتكون ناتجة بنسبة 90% عن الإصابة بفطر *Trichophyton tonsurans* وبنسبة 5% ناتجة عن الأنواع التابعة لجنس *Microsporum* (Abd Elmegeed et al., 2015).

2- سعفة الاظافر *Tinea unguium* تمثل سعفة الأظافر إحدى الإصابات الفطرية الجلدية للأظافر والتي تتميز بالتهاب يبدأ حول الأظافر والذي يؤدي إلى تغيرات مختلفة ومتفاوتة حسب نوع الفطر وهذه التغيرات تشمل ضخامة الأظافر وتغير لونها وتحولها إلى الشكل الباهت بدل البريق الصحي اللامع وسهولة تكسر الأظافر ومن العوامل المشجعة على تطور الإصابة هو تقدم العمر وداء السكر والأحذية الضيقة وكذلك وجود سعفة القدم *Tinea pedis* ومن الفطريات التي تسببها *Trichophyton rubrum*، *Trichophyton mentagrophytes* وقد تحصل الإصابة بسعفة الأظافر بسبب الفطريات غير الجلدية *Non dermatophytic fungi* وبعض أنواع الخمائر مثل *Candida* (صالح، 2010).

3- سعفة بارباي *Tinea Barbae* : تصيب العاملين في الحقول والمزارع والاطباء البيطريين أيضاً وتنتقل اليهم عن طريق الماشية معظمها تكون ناتجة عن فطر *Trichophyton verrucosum* و *Trichophyton mentagrophytes* وتتركز الإصابة عادة في مناطق اللحى (Welsh & Gonzalez, 2016).

4- *Tinea Corporis* : والتي تسمى أيضاً *jock itch* وهي التي تصيب الجذع والاطراف ويصاب بها الاطفال والمراهقين عن طريق العدوى من الحيوانات المصابة بالآفات الجلدية

الفطرية اما البالغين فتكون غالبا نتيجة العدوى من شخص لأخر ومن الأجناس المسببة لها

Trichophyton Tonsurans (Goedadi, 2004) و *T.rubrum*

5- سعفة الوجه *Tinea Faciei* : وترتكز الإصابة هنا في الوجه والمناطق المحيطة به، تشبه اعراضها

إلى حد كبير أعراض *Tinea Corporis* وتكون ناتجة عن العدوى بفطري *M.Canis* و

(Atzori et al., 2012) *Trichophyton mentagrophytes*

6- سعفة العانة أو المنطقة العانية *Tinea Inguinalis*: وتكون ناتجة من العدوى بفطر

Epidermophyton floccosum و *Trichophyton mentagrophytes* و *T.rubrum* تكون

منتشرة في المناطق الرطبة والحارة وتكون الإصابة في الرجال أكثر منها شيوعا في النساء

وتحدث نتيجة السمنة ولدى الاشخاص المصابين بداء السكري وغالبا ما تكون الإصابة

مزمنة (Goldstein, et al., 2000).

7- سعفة القدم *Tinea Pedis* أو القدم الرياضي *Athlete's foot*: وتنتشر بين الرياضيين والجنود

وعمال المناجم وتكثر لدى المراهقين والبالغين وبدرجة اقل لدى الاطفال ترتكز الإصابة في

الجزء الظاهر من القدم وتحدث نتيجة الإصابة بفطري *T.rubrum* و *Trichophyton*

mentagrophytes (MSPH et al., 2015: Dolenc-Voljč, 2015).

واستخدمت العديد من المضادات الحيوية كعوامل علاجية للاصابات الجلدية الفطرية كالا

Nystatin، *Griseofulvin*، *Fluconazol* و *Itraconazol* والتي تعمل على تثبيط النمو الفطري

وبالرغم من قدرة هذه المضادات الحيوية على قتل هذه الكائنات الا انها لا تخلو من التأثيرات

الجانبية، فضلا عن ظهور سلالات جديدة للأجناس الفطرية تستطيع أن تزيد من قدرتها على

مقاومة هذه المضادات ولتصبح مقاومة بشكل تام بمرور الوقت (Sharma et al., 2015).

أن العقاقير والمضادات المستخدمة ضد الاصابات الجلدية تظهر عادة آثار جانبية، كما في

حالة العقاقير الحاوية على الازول التي تؤثر بشكل مباشر في الانزيمات الكبدية والجهاز

العصبي المركزي وهورمونات الغدة الدرقية وبناء التيستوستيرون، لذا أصبح البحث عن أساليب

علاج بديلة حاجة ملحة، وشملت هذه الأساليب استعمال النباتات أو المركبات المستمدة من

النباتات استنادا إلى قدرة هذه النباتات في الدفاع عن نفسها ضد مسببات الأمراض الفطرية،

وكما تمتلك الجسيمات النانوية للمعادن *met als nanoparticles* خصائص مضادة للجراثيم فريدة من نوعها، فضلا عن تطبيقاتها الواسعة في مجالات مختلفة كصناعة العقاقير وعلاج الأمراض السرطانية وحفظ المواد الغذائية أيضاً (Kadhim et al., 2017; Ouf et al., 2015).

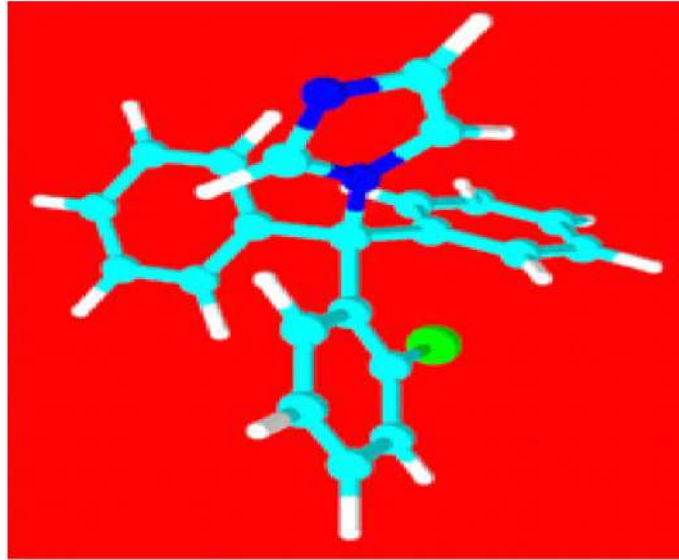
2-4 المضادات الفطرية

يوجد العديد من المضادات الفطرية المستعملة في علاج الإصابات الجلدية الفطرية ، فبعضها موضعية تستعمل في حالات إصابات الجلد الموضعية وبعضها جهازية تؤخذ عن طريق الفم في حالات الإصابات الحادة. تعد المضادات الموضعية غير فعالة ضد الفطريات التي تصيب الشعر وعادة ما تؤخذ المضادات الجهازية، وقد تستخدم بعض المضادات الموضعية لمنع انتقال أو الإصابة مرة أخرى (Plempel, 1982). يجد المرضى صعوبة في تطبيق العلاجات بشكل متكرر وقد تستغرق وقت طويل (Hay, 2018). وتستخدم مضادات مختلفة بعضها موضعية والبعض الآخر تؤخذ عن طريق الفم لعلاج فطر *M. Canis*، مثل *griseofulvin* ، (Gri) ، *terbinafine* (TER) ، *itraconazole* (IT) ، *fluconazole* (FLZ) ، *polyenes* و *Clotrimazole* (Cafarchia et al., 2018). كما يستعمل كل من *itraconazole* ، *terbinafine* ، *fluconazole* و *allylamine* لعلاج حالات الإصابة بفطر *T. rubrum* و يتم احيانا استعمال هذه العقاقير بشكل منفرد أو يتم خلط نوعين أو أكثر كعلاج مشترك (Alexandro et al., 2011)

2-4-1 مضاد الكلوتريمازول Clotrimazole

يستعمل عادة مركب الكلوتريمازول *Clotrimazole* حالات سعفة القدم أو ما يعرف بالقدم الرياضي *athlete's foot* والفطريات الجلدية وداء المبيضات الفموي البلعومي، كما يعد هو العلاج المفضل لحالات التهاب المبيضات المهبلية (*vulvovaginal candidosis* Workowski) (Bolan, 2015 & Mendling et al., 2020). ينتمي مركب الكلوتريمازول إلى مجموعة الايميدازول والتي هي مجموعة من المضادات الفطرية والتي تم اكتشافها في ستينيات القرن الماضي من قبل العالم Karl Hienz Buchel، والتي تتتركب من أربع حلقات عطرية *aromatic* (Crowley & Gallagher, 2014). يكون مركب الكلوتريمازول عبارة عن مسحوق بلوري وتكون

صيغته الجزيئية هي $C_{22}H_{17}ClN_2$ ذات وزن جزيئي 344.8 g/mol، محب للماء ويقابلية ذوبان في الماء بمعدل 0.49 ملغم/ لتر (White et al., 2014).



الشكل (1-2): التركيب الهيكلي كلوتريمازول (Wilson, et al., 2013)

يملك الكلوتريمازل فعالية واسعة الطيف ضد العوامل الميكروبية المختلفة مثل *Candida albicanis* والعوامل الأخرى، وكما هو الحال في بقية أنواع عائلة ال-azole، فإن الخصائص المضادة للفطريات لهذا المركب تتم من التداخل مع بناء الارغوستيول ergosterol مما ينتج زيادة في نضوح السوائل والمركبات الأخرى عن طريق الجدار الخلوي مما يؤدي إلى اضطراب في تركيب ووظيفة الجدار الخلوي (Mendling et al., 2020).

وقد بين (Nizam et al., 2016) في دراسته لعدد من المضادات الفطرية وهي ketoconazole و terbinafine ، miconazole ، itraconazole ، clotrimazole ، amphotericin B ضد فطر *T.rubrum* و عدد من الفطريات zygomycetes وانواع من *Aspergillus* المعزولة من عدد من المرضى، وقد اظهرت النتائج قدرة المضاد clotrimazole على تثبيط نمو الفطريات الزيجية. اما (Banerjee et al., 2012) فقد بين في دراسة مقارنة تم اجرائها على مرضى مصابين بسعفة الجسد tinea corporis، ناتجة فطريات *T.rubrum* ، *Trichophyton mentagrophytes* و *M.Canis* استعمل فيها كل من fluconazole بشكل جل gel و clotrimazole بشكل مرهم موضعي يدهن على منطقة الإصابة وبتركيز 0.5% لكل منهما، و اشارت النتائج إلى أن كلا

المركبين اظهرا فعالية امنية بعد 8 أسابيع من المتابعة، وربما يعود هذا التشابه في القدرة العلاجية إلى التشابه الكبير في تركيب المركبين اللذان يعودان إلى نفس العائلة الكيميائية.

5.2 المستخلصات النباتية plant extract

تعد النباتات أحد أهم المصادر المعتمدة في صناعة الادوية والعقاقير المختلفة في الطب التقليدي والطب الحديث على حد سواء، وقد استعملت المستخلصات النباتية واجزاء النباتات كعلاجات لقرون عديدة، ويعد استعمال النباتات كمضادات مايكروبية هو امر شائع لدى كبار السن في البلدان النامية، كما بدأ الاهتمام بهذه النوعية من العلاجات ينشأ في الآونة الأخيرة بسبب المشاكل المرتبطة بإستعمال المضادات التقليدية (Massiha & Muradov, 2015). ان المضادات الفطرية ذات قدرة محدودة، وتقتصر على عدد من العوامل السريرية، فضلا عن ظهور عدد من السلاسل المقاومة، لذا أصبحت الحاجة ملحة إلى استعمال بدائل علاجية فعالة جديدة، وشكلت المستخلصات النباتية البديل الناجح بسبب قلة الكلفة واثارها الجانبية القليلة كما إن بعضها يمتلك مدى عالي من التأثير المسببات المايكروبية الممرضة (Hadizaseh et al., 2015).

ففي دراسة اجريت على تأثير المستخلصات الكحولية والمائية لعشبة الليمون ونبات اللانطانا وأوراق الزيتون على فطريات *T.rubrum*، *M. gypseum* و *Trichophyton mentagrophytes* وكانت النتائج تشير إلى وجود فعالية عالية جدا للمستخلصات الكحولية على الفطر وبنسبة تثبيط للنمو تصل إلى 85% فيما وصلت نسبة التثبيط للمستخلصات المائية لنفس النباتات تصل إلى 77% ويمكن الاستنتاج من ذلك على قدرة المستخلصات الكحولية لهذه النبات في علاج الإصابات الفطرية الجلدية (Bokhari, 2009). اما (Sagar & Vidyasagar, 2013) فقد بينا في دراستهم على لعدد من المستخلصات الكحولية لنبات الكاسيا وبتراكيز مختلفة على عدد من الاجناس الفطرية الممرضة، وهي كل *Trichophyton tonsurans*، *T.rubrum*، *Epidermophyton floccosum* و *Microsporum gypseum*، *Trichophyton mentagrophytes* وأظهرت جميع المستخلصات نشاطا مضادا للفطريات حتى عند الحد الأدنى من التركيزات المثبطة (MICs) والحد الأدنى من تركيزات الفطريات (MFCs). وكما استعمل Amari et al.

(2021) عدد من الاجزاء الهوائية لنبات المثنان *Thymelaea hirsuta* كمستخلصات لعلاج عدد من الاجناس الفطرية الممرضة كعلاج موضعي وهي *Microsporium audouinii*، *gypsea*، *Nannizzia*، *Trichophyton interdigitale* وفطر *T.rubrum* وخمائر *Candida albicans*، واطهرت النتائج قدرات تثبيطية متفاوتة للاجزاء النباتية في درجات التبيط لنمو الفطريات المختلفة وعند تراكيز مختلفة أيضاً ويعود ذلك إلى اختلاف نوعية وتراكيز المركبات المثبطة فضلاً عن الاختلافات الانزيمية في الاجزاء النباتية المختلفة وفقاً لتفسير الباحث. وعلى اي حال فإن توليف أو اعداد اي مستخلص نباتي يتطلب عدد من المعالجات الحرارية (Reeda et al., 2021; yassin & Mohammed, 2021)، وهذا ربما يؤدي احيانا إلى تغيير عدد من الخصائص الكيميائية وبالأخص متعددات الفينول التي تشكل العنصر الاساس في قدرة المستخلصات النباتية على تثبيط النمو الميكروبي (Chawla et al., 2021). ويمكن التغلب على هذه المشكلة من خلال استعمال نواقل فيروسية أو نواقل شحمية أو مستحلبات نانوية nanoemulsions أو النانوهايديروجلس nanohydrogels، وتعتبر هذه التقنيات هي الافضل في اوصول المادة المضادة إلى موضع الاصابة، مع أدنى فرصة لرفض الجسم لهذا المركب، فضلاً عن الحد الأدنى من الاثار الجانبية لهذه المركبات (Gonçalves et al., 2010).

6.2 مستخلص فطر *Agaricus bisporus*

يعد فطر *A. bisporus* المسمى ب mushroom button أكثر أنواع الفطريات المزروعة في العالم، وينتمي هذا الفطريات إلى مجموعة الفطريات البازيدية basidiomycetes، موطنه الأصلي هو اوربا وامريكا الشمالية كما يشكل 35-45% من انواع الفطريات الصالحة للاكل في العالم (Waqas et al., 2018). يعيش هذا الفطر بشكل رمي saprophytic ويعد مصدراً جيداً لكثير من المغذيات الاساسية كالكاربوهيدرات والبروتينات والفيتامينات مثل الثيامين B1 والرابيوفلافين B2 والنياسين B3، فضلاً عن مركبات البيوتين biotin و ascorbic acid و فيتامين E (Ndungutse et al., 2015). كما تحتوي الأجسام الثمرية للفطر fruitbodies على عدد من العناصر المعدنية الضرورية ك(النحاس، الزنك، الحديد، بوتاسيوم، سيلينيوم، الصوديوم، الفسفور، المنغنيز، المغنسيوم) (Kalac, Svoboda, 2000). يمتلك هذا الفطر عدد من

الخصائص الطبية والعلاجية فهو معروف في جميع أنحاء العالم بعلاجاته المضادة للسرطان anticancer، المضادة للورم antitumor، الدوائية pharmacological، خفض الكوليسترول cholesterol-lowering، التحفيز المناعي immunostimulant، مضادات الميكروبات antimicrobial، المضادة للالتهابات anti-inflammatory، والأنشطة المضادة للأكسدة antioxidant activities (Sami et al., 2021).

يحتوي الفطر على عدد من المركبات التي تمتلك خصائص مضادة للميكروبات، تكون هذه المركبات بنوعين هما المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض low molecular weight (LMW)، مثل التربينات terpenes، الستيرويدات steroids، والانتوكوينات anthraquinone، وحامض البنزويك benzoic acid ومشتقاته، أما المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي high molecular weight (HMW) فتشمل البروتينات والبيبتيدات (Pourianfar & Rezaeian, 2016). وبين Shang et al (2013) في دراستهم على قدرة المستخلص الكحولي للفطر على تثبيط نمو أنواع مختلفة من البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام gram +ve & -ve bacteria، وظهر المستخلص قدرة فائقة ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام، وبدرجة أقل للأنواع السالبة لصبغة غرام gram -ve bacteria. وفي دراسة اجريت حول تأثير المستخلصات المختلفة لعدد من فطريات المشروم ومن ضمنها فطر *A. bisporus* على الاجناس *Bacillus megaterium*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumoniae*، *Candida albicans*، *C. glabrata*، *Trichophyton spp* و *Epidermophyton spp*، وظهر مستخلص الايثانول لفطر *A. bisporus* قدرة تثبيطية ضد كل من الاجناس البكتيرية *S. aureus*، *E. coli*، واجناس الفطريات *C. glabrata* و *Trichophyton spp* (Akyuz et al., 2010). واستخدم مستخلص راشح الفطر البازيدي *Marasmius Palmivorus* على نمو الفطرين *M. Canis*، *T. rubrum* إذ اعطى تأثيرا تثبيطياً على نمو الفطرين (Al-Mosoodi, 2020a).

1.6.2 جسيمات الفضة النانوية AgNPs

تعد جسيمات الفضة النانوية واحدة من افضل الابتكارات في مجال التطبيقات النانوية الطبية، إذ أن هذه الجسيمات لها مساحة سطحية بارزة وقدرة تفاعلية عالية، علاوة على ذلك

فأنها تمتلك خصائص مضادة للميكروبات وهذا ما شجع على استعمالها في صناعة الضمادات الخاصة بالحروق والجروح (Kalwar & Shan, 2018). تتميز المركبات النانوية للفضة بأنها غير سامة عند التراكيز الواطئة، كما واسعة الطيف في حال استخدامها كمضادات للحياة المجهرية المختلفة (Sriram & Pandidurai, 2014). بسبب السمية المنخفضة لجسيمات الفضة النانوية فقد اعتبرت جذابة بشكل خاص لإنتاج المضادات المايكروبية، وعلى الرغم من انتشارها بشكل واسع إلا أن آلية عملها كمضادات غير واضحة بشكل دقيق (Nurani et al., 2015; Franci et al., 2015).

إن قدرة الجسيمات النانوية للفضة على القضاء على أنواع مختلفة من الاحياء المجهرية، دفع العديد من الباحثين إلى استخدام AgNPs كمضادات فطرية (Osonga, et al., 2020)، ففي دراسة مقارنة اجريت بين المضادين الحيويين fluconazole و terbinafine والجسيمات النانوية للفضة والتي بنيت بطريقتين الكيميائية والطريقة الحيوية من قبل الفطرين *Penicillium chrysogenum* و *Aspergillus oryzae* وتأثيرهم على فطر *T.rubrum*، بينت النتائج إن الجسيمات النانوية للفضة المصنعة كيميائيا كانت أعلى قدرة تثبيطية من عقار fluconazole وبتراكيز 0.25 - 2.5 مايكروغرام/مل كما إن الجسيمات المصنعة حيويًا والمنتجة من الفطر *P.chrysogenum* اظهرت قدرة تثبيطية عند التراكيز 0.5 - 5.0 مايكروغرام/مل في حين لم تظهر الجسيمات المنتجة من الفطر *A. oryzae* أي قدرة تثبيطية تذكر، ولكن النتائج اظهرت أيضاً أن هذه الجسيمات بنوعها المصنعة كيميائيا وحيويًا كانت اقل تأثيراً في نمو الفطر *T.rubrum* مقارنة بالمضاد الحيوي terbinafine (Pereira et al., 2013). كما استخدم Rónavári et al. في دراسته عام (2018) الجسيمات النانوية للفضة كمضاد لفطريات *Candida*، *Cryptococcus*، *Microsporium* و *Trichophyton* الممرضة، واطهرت النتائج قدرة الجسيمات النانوية على تثبيط نمو الاجناس المذكورة اعلاه (Reeda, 2021; Yassin, 2021; Jasim, et al., 2019)، مما يؤكد قدرتها العلاجية للاصابات الفطرية الجلدية، ومع وجود توافق لهذه الجسيمات مع خلايا الجلد يمكن القول انها ممكن أن تكون علاجاً موضعياً للفطريات الجلدية الموضعية وبدل مناسب عن المضادات الحيوية المعروفة. اما Hadizadeh et al., (2015) فقد استعمل في دراسته على فطريات *M.Canis*، *Trichophyton mentagrophytes*

و *Microsporium gypseum*، تراكيز مختلفة من جسيمات الفضة النانوية وهي 40، 80، 120، 160، 170، 180 و 200 مايكروغرام /لتر، بالمقارنة مع المضاد الغرايسيفولفين *griseofulvin* وظهرت النتائج قدرة فعالة لجسيمات الفضة النانوية بتراكيز 170، 180، 200 مايكروغرام/لتر على الأجناس الثلاث المذكورة اعلاه. بالمقارنة إلى المضاد *griseofulvin* الذي اظهر قدرة تثبيطية للأجناس قيد الدراسة عند تراكيز 25، 50، 100 مايكروغرام/لتر.

2.6.2 اوكسيد الزنك النانوي ZnO Nanoparticles

تمتلك جسيمات الزنك النانوي متوسط حجم 30 نانومتر (El-Diasty *et al.*, 2013). عادة ما تظهر ZnO-NPs كمسحوق أبيض وهي غير قابلة للذوبان تقريبا في الماء، يستخدم المسحوق على نطاق واسع كمضاف للعديد من المواد والمنتجات بما في ذلك البلاستيك والسيراميك والزجاج والاسمنت والمطاط (مثل إطارات السيارات) ومواد التشحيم والدهانات والمراهم والمواد اللاصقة وموانع التسرب والأسمدة الحيوية والبطاريات والفريت ومثبطات الحريق (Tiwari *et al.*, 2016). وتمتلك جسيمات الزنك النانوي قدرة فائقة على مقاومة أنواع مختلفة من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام مثل *Campylobacter*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* عن طريق قدرتها على الالتصاق بالخلايا البكتيرية، مما يقلل من نفاذية الغشاء البلازمي وتحوير مركبات السايوتوكينات cytokine (Khalifa *et al.*, 2019). وبسبب خصائصه المضادة للميكروبات يتم دمج جسيمات الزنك النانوية مع الطلاء المستعمل في المستشفيات والمؤسسات الصحية كما انه عنصر فعال في صناعة المراهم والمستحضرات الخاصة بعلاج الأمراض الجلدية (El-Diasty *et al.*, 2013). كما يستعمل اوكسيد الزنك النانوي في الكثير من التطبيقات الطبية الأخرى وغير الطبية كصناعة مستشعرات الغازات السامة، البصريات، صناعة الأدوية وتخزينها، المستشعرات الكيميائية، الالياف البصرية والاجهزة الالكترونية (Vaseem *et al.*, 2010).

توجد عدد من الدراسات التي اشارت إلى قدرة اوكسيد الزنك النانوي المضادة على عدد من الكائنات المجهرية كالفطريات (Reeda, *et al.*, 2021; Yassin, 2021; Jasim, *et al.*, 2018) والبكتريا السالبة والموجبة لصبغة غرام gram stain فقد اشار Sharma وجماعته (2015) إلى إن

المضادات الشائعة كـ ciprofloxacin وampicillin اظهرت قدرة تثبيطية أكبر بوجود اوكسيد الزنك النانوي لنمو بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella Typhi* وبنسبة 10% فيما لو تم استعمالها بشكل منفرد على الكائنات قيد الدراسة. كما استخدم Jalal et al., (2018) اوكسيد الزنك النانوي المصنع حيويًا من خلاصة نبات *Crinum latifolium* كعامل ضراوة ضد فطر *C. albicans* وفعالته الحيوية، فقد لاحظ إن الجسيمات النانوية قد خفضت انتاج الفوسفولايبيز hydrolytic phospholipases والبروتياز proteinase وبنسبة 58 و 95 % على التوالي وعند تركيز 25 ملغم/مل كما اظهرت الصور المجهرية إن الجسيمات النانوية قد حطمت الغشاء البلازمي والجدار لخلوي للفطر، إن هذه النتائج تعطي نظرة مستقبلية لتوظيف جسيمات الزنك النانوية في علاج التهابات المبايض الناتجة عن عدوى الكانديدا.

7-2 انزيم Serine proteases

يعد انزيم Serine proteases أحد الانزيمات المائية والتي تعمل على تكسير الروابط الببتيدية في البروتينات ويتواجد هذا الانزيم في جميع الكائنات الحية، كما يقوم أيضاً بنقل اشارات، دوران البروتين داخل الخلايا، الاستجابة المناعية، موت الخلايا المبرمج، التكاثر ومعالجة السيروتروم في الميتوكوندريا (Muszewska et al., 2017). ينتمي هذا الانزيمات إلى مجموعة endopeptidases والتي تعمل على تحلل المناطق الداخلية للسلاسل الببتيدية، وتضم cysteine proteases وAspartic protease، Serine proteases و met alloproteases، ويطلق عليها أيضاً مصطلح subtilisin والذي يعني انزيمات هاضمة للبروتين a protein-digesting enzyme يتميز هذا الأخير (Serine proteases) بإحتوائه على مجموعة السيرين serine group في الموقع الفعال للانزيم والتي تكون فعالة عند المستويات القاعدية، إذ تفضل اس هيدروجيني يتراوح من 7-11 وبوزن جزيئي قليل 18-35 كيلودالتون (de Souza et al., 2015).

تمتلك الفطريات الجلدية عدد من اليات وعوامل الضراوة والتي تساعد الفطر على اختراق واستعمال جلد المضيف، إذا تبدأ المرحلة الاولى والتي تسمى بـ the sulfitolysis stage بتكسير الأواصر الكبريتية في جزيئة حامض السيستين cysteine الموجود في الكيراتين الخاصة بطبقات الجلد عن طريق انزيم cysteine dioxygenases، ثم تبدأ انزيمات الاندوبيبتايد endopeptidases

وتحديدا الـ Serine proteases بتكسير السلاسل الببتيدية إلى سلاسل اصغر ليتمكن الغزل الفطري من امتصاصها بسهولة (Chiapello et al., 2020). وبين robati وجماعته (2018) في دراستهم على العديد من العينات المعزولة من اصابات مختلفة على الإنسان والحيوان لفطريات *T.rubrum* و *M.Canis* ان 94% من العينات تحتوي على الجين (SUB) subtilisin genes المنتج لإنزيمات subtilisin. كما تساهم هذه الانزيمات في تهرب الفطر من الأنظمة المناعية للمضيف من خلال قدرتها على شق البروتينات المناعية المنتجة من المضيف كما في فطر *Aspergillus fumigatus* (Chiapello et al., 2020). وأشار Patel (2017) إلى ان Serine proteases المنتج من قبل الفطر يؤدي إلى اطلاق سريع لإنترلوكين 33 (IL-33)، ويترتب على ذلك تهيج الطبقة المخاطية للأمعاء المضيف المصاب بفطر *Alternaria alternata* ، كما يعمل Serine proteases المنتج من قبل فطر *Cryptococcus neoformans* المسبب لداء السحايا Cryptococcal meningitis على زيادة نفاذية الاوعية الدموية المتواجدة في جدار الحاجز المحيط بالدماغ blood-brain barrier.

إن انتاج البروتياز من قبل الكائنات المجهرية يعتمد بشكل كبير على مصدر النيتروجين، وعلى الرغم من إن مصادر النيتروجين غالبا ما تكون مركبات معقدة، إلا ان مصدر النيتروجين المعتمد لتخليق البروتياز يختلف من كائن لآخر، وبشكل عام فإن الفطريات تزيد قدرتها على انتاج البروتياز في حال وجود مصادر نيتروجين عضوية أكثر تعقيدا أو ذات وزن جزيئي أعلى مقارنة بالمركبات النيتروجية ذات الوزن الجزيئي المنخفض أو المركبات النيتروجينية اللاعضوية (de Souza et al., 2015).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methods

الفصل الثالث

Materials and methods المواد وطرائق العمل

1-3 الأجهزة والمواد المستعملة Device and Materials

الأجهزة والمعدات المخبرية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ. كما

في الجدول (1-3):

الجدول (1-3): الأجهزة والمعدات المخبرية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ.

الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Blinder – Germany	فرن كهربائي Electric Oven	.1
Denver – Germany	ميزان Balance	.2
Blinder – Germany	حاضنة Incubator	.3
NOVEX – HOLLANND HOLLAND	مجهر مركب Compound Microscope	.4
Sartorius – Germany	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	.5
Tiauja Taisite – China	حجرة تلقیح Hood	.6
Lab Tech – Korea	جهاز التعقيم البخاري Autoclave	.7
Arston – Turkey	جهاز تقطير الماء Distilled water apparatus	.8
Arston – Turkey	ثلاجة Refrigerator	.9
Canon – Japan	كاميرا رقمية Digital Camera	.10
Bionerr - Korea	مازج كهربائي Vortex	.11
China	محرك مغناطيسي Magnetic Stirrer	.12
Iraq	مصباح غاز Benzene Burner	.13
Yaugyi	مفرغ هوائي Vacuum Pump	.14
Germany	أدوات زجاجية مختلفة الأشكال Laboratory glassware	.15
China	Latex gloves + Face mask	.16
India	ثاقب فليني Cork Borer	.17
India	الناقل الزراعي القياسي Stander Wirel loop	.18
China	شرائح زجاجية مع غطاء الشريحة Slides and cover slide	.19
China	أطباق بتري بلاستيكية Disposable Petri dishes	.20
Local market	شاش	.21
Korea	حاضنة هزازة Shaking Incubator	.22
Japan	مطياف ضوئي UV – spectrophotometer	.23
Italy	AURA TM PCR Cabinet	.24
Germany- Bio San	Microspin 12, High-speed Mini-centrifuge	.25
Germany- Digsystem	V-1 plus, Personal Vortex for tubes	.26

الشركة المصنعة	اسم الجهاز	ت
Germany- Bio San	Bio TDB-100, Dry block thermostatbuilt	.27
Germany	Biopette Variable Volume 0.5-10 ul Volume 2-20 ul Volume 10-100 ul Volume 100-1000 ul	.28
Chain	Mini-Power Supply 300V, 2200V	.29
USA- Labnet	MultiGeneOptiMax Gradient Thermal Cycler	.30
USA- CBS, Scientific	Electrophoreses	.31
USA- Labnet	Document system	.32
Farance- Vilber lourmat	UV.transmission	.33
Lativa- Biosan	Microspin	.34
Lative- Biosan	Combi-spin	.35
Germany- Kernpfb	Balance	.36
China- Jrad	Incubation	.37
China- Gosonic	Microwave	.38
China	Water distilater	.39

الجدول (2-3) المواد الكيميائية التي استخدمت في الدراسة مع اسم الشركة وبلد المنشأ

الشركة المصنعة	اسم المواد	ت
Coudalab – Spain	Sabouroud Dextrose Agar	.1
Liofitchem – Italy	Sabouraud Dextrose broth	.2
Trage – Germany	Chlororamphenical كلوروامينيكول المضاد الحيوي	.3
Fluka – Swiss	Lactophenol Cotonblue Stan صبغة اللاكتوفينول ازرق القطني	.4
Juman – Jordan	Clotrimazole مضاد فطري كلوتريمازول	.5
BHD . England	Sodiam Chloraed كلوريد الصوديوم	.6
Fluka – Swiss	Ethanol 96% ايثانول	.7
تخليق حيوي	Zinc Nanoparticles الزنك النانوي	.8
تخليق حيوي	Ag Nanoparticles الفضة النانوية	.9
تجاري	DMSO ثنائي مثيل السلفوكسيد	.10
Conda / USA - 8100.11	Agarose	.11
Intron / Korea- 21141	Red safe staining souluion	.12
Intron / Korea - 21161	6X Loading dye	.13
Intron / Korea - 24075	Ladder 1000 plus bp	.14
Intron / Korea - 25025	Pre mix pcr	.15
Conda / USA - IBS.BT004	TBE buffer 10 X	.16
Integrated DNA technologies /USA	Primer	.17
ZYMO/ USA - D6005	ZR Fungal/Yeast/Bacterial DNA MiniPrep	.18
ZYMO/ USA- R2014	Quick-RNA Fungal/ Bacterial DNA MiniPrep	.19

2-3 الأوساط الزراعية Culture Media

1-2-3 وسط Subouraud Dextrose Agar

حضر الوسط بإذابة 65 غم من مسحوق Subourand Dextrose Agar (1000 مل) من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

2-2-3 وسط Subouroud Dextrose broth

حضر الوسط بإذابة 30 غم من مسحوق Subouraud Dextrose Broth (1000) مل من الماء المقطر حسب تعليمات الشركة المصنعة.

3-3 تعقيم الأوساط الزراعية

تم إضافة المضاد الفطري Chloramphenicol بمعدل 250 ملغم/ لتر إلى جميع الأوساط الزراعية ثم عقت بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 م° وضغط 1.5 جو لمدة 90 دقيقة بعدها تركت لتبرد.

4-3 طرائق العمل

1-4-3 الفطريات المستخدمة في الدراسة

تم الحصول على العزلتين الفطريتين المستخدمتين في هذه الدراسة *M.Canis* isolate IQT-Na-3 و *T.rubrum* isolate IQT-Na من قبل أ. د. بان طه محمد من مختبر الدراسات العليا في كلية التربية للعلوم الصرفة في جامعة كربلاء والمشخصين والمسجلين في البنك الجيني العالمي GenBank تحت أرقام تسلسلية MK167434.1 و MK167439.1 على التوالي، وتم تنشيط العزلتين وزراعتهما على الوسط SDA (Sandven, Per, & Jørgen Lassen, 1998; Ahmed, et al., 1999) كما درست الخواص المظهرية والمجهريّة لها قبل وبعد المعاملات اللاحقة.

2-4-3 الحصول على فطر المشروم وتجفيفه

تم الحصول على فطر المشروم *Agaricus bisporus* من مزرعة الودق لانتاج الفطر الواقعة في مدينة بغداد قرب مجمع بسمايا السكني (33°11'42"N 44°35'56"E) شهر تشرين

الثاني عام 2020 وتم غسل فطر المشروم بالماء العادي ثم بالماء المقطر وقطع إلى قطع صغيرة بسكين نظيفة حسب طريقة (Trease, et al., 1994) وجفف هوائياً على درجة حرارة (35°م) باستخدام آلة تجفيف مخصصة، ثم طحنت بواسطة طاحونة كهربائية لغرض الحصول على مسحوق.

3-5 المستخلصات

تم تحضير نوعين من المستخلصات للدراسة

3-5-1 تحضير المستخلصات الكحولية paration of the alcoholic extract

تم وزن 50غم من المسحوق الجاف لفطر المشروم *Agaricus bisporus* ومزج مع 500 مل من الكحول الايثيلي 70% في دورق زجاجي سعة 1000مل واغلق بواسطة القطن وورق المنيوم، ووضع في حاضنة هزازة وترك لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة الغرفة بعدها رشح الخليط باستخدام عدة طبقات من الشاش الطبي للتخلص من العوالق وعقم الراشح خلال اوراق ترشيح من نوع 0.22 ملي مايكرون للحصول على محلول رائق ومعقم، جفف المستخلص باستعمال الفرن بدرجة 40°م وتم حفظ في الثلاجة لحين الاستعمال Hernández-Pérez et al 1994, Khanzada et al. 2006

3-5-2 تحضير المستخلصات المائية Preparing the aqueous extract

اتبعت نفس طريقة تحضير المستخلص الكحولي ولكن استبدل الماء المقطر بدل الكحول الايثيلي.

3-6 التشخيص الجزيئي لفطر المشروم Molecular Diagnosis of *Agaricus*

bisporus

3-6-1 استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين (Deoxyribonucleic acid,)

(DNA)

استخلص الحامض النووي DNA باستخدام العدة الجاهزة ZR Product contents fungal/ Bacterial yeast DNA Miniprep™ من شركة Macrogene في كوريا الجنوبية وكالاتي: للحصول على الأداء الأمثل اضيف بيتا مير كابوتانول

- Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer (لدمم الاستعماء) إلى Beta-mercaptoethanol إلى تخفيف نهائي بنسبة 0.5% (V/V) أي 500 ميكروليتر لكل 100 مل:
1. تم اضمافة 50-100 ملغم (الوزن الرطب) من الخلايا الفطرية فيما يصل إلى 200 ميكروليتر من الماء أو isotonic buffer (PBs).
 2. تم المزج باستخدام خفافة انابيب سعة 2nm بالسرعة القصوى لمدة 5 دقائق.
 3. وضعت أنابيب التحلل ZR Bashing BeadTM في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10.000 xg لمدة دقيقة واحدة.
 4. تم نقل 400 مايكروليتر من المادة الطافية المتخلفة من الراشح Zymo-SpinTM IV Spin Filter (orange Top) انبوب التجميع ووضع جهاز الطرد المركزي بسرعة 7000 xg for 1 minute لمدة دقيقة واحدة.
 5. اضميف 1200 مايكروليتر Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer إلى الراسب في انبوب التجميع من الخطوة 4 ثم خلط جيداً.
 6. نقل 800 مايكروليتر من الخليط من الخطوة 5 إلى Zymo-SpinTM IIC Column2 في أنبوب التجميع ثم وضع في جهاز الطرد المركزي بسرعة 10.000 xg لمدة دقيقة واحدة.
 7. تم التخلص من الراشح من انبوب التجميع ثم إعادة تكرار الخطوة 6.
 8. اضميف 200 مايكروليتر من محلول الغسيل المسبق الحامض النووي إلى عمود Zymo-spinTM IIC Column في تجميع جديد ثم وضع في جهاز الطرد المركزي عند 10000 xg لمدة دقيقة واحدة.
 9. اضميف 500 مايكروليتر من محلول غسل Fungal/ Bacterial DNA Wash Buffer إلى عمود Zymo-SpinTM IIC column ووضع في جهاز الطرد المركزي عند 10000xg لمدة دقيقة واحدة.

10. نقل عمود Zymo-Spin™ IIC column إلى انابيب جهاز الطرد المركزي بحجم 1.5 ml ثم اضيف 100 ml من محلول غسل الحامض النووي DNA Elution Buffer (35 مايكروليتر كحد ادنى) ووضعه في جهاز الطرد المركزي 10000 xg لمدة 30 ثانية.

3-6-2 تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل PCR

الجدول (3-3) البادئات التي استخدمت في هذه الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي ونتائج فحص الـ PCR.

3-6-3 الكشف عن الجين (ITS) The specific primer of gene

تم الكشف عن جين ITS باستخدام البادئات للتضخيم ثم تضخيم جزء من ITS باستخدام البادئ الاساسي F(ITS1) (3-TCCGTAGGTGAACCTGCG-5) وبادئ العكسي (ITS4) R:5' TCCTCCGCTATTGATATGC-3.

تم اجراء تضخيم PCR في حجم اجمالي قدره 25 مايكروليتر يحتوي على 1.5 مايكروليتر من الحامض النووي DNA 5 مايكروليتر (Taq PCR premin (Intron, Korea) ، 1 مايكروليتر من كل البادئ الامامي والعكسي (bpmol) ثم تمت اضافة الماء المقطر في الانبوب إلى الحجم الكلي من 25 مايكروليتر وتم اجراء التفاعل بالظروف الحرارية التالية:

الجدول (3-3) يمثل تضخيم الـ PCR بالظروف الحرارية

ت	الدورة	درجة الحرارة	المدة
1.	مسح اولي Initial denaturation	94 °م	3 دقائق
2.	المسح النهائي Final denaturation	94 °م	45 ثانية
3.	ارتباط البوادئ Primer annealing	52 °م	60 ثانية
4.	استطالة اولية Initial extension	72 °م	60 ثانية
5.	الاستطالة النهائية final extension	72 °م	7 دقائق

تم استخدام الدورة الحرارية (Gene Amp. PCR System 9700; Applied Biosystem)، تم فصل منتجات PCR بنسبة 1.5% agarose gel electrophoresis وتصور بعد التصبغ بصبغة (red stain staining (intron Korea).

3-6-4 اعداد هلام الاكاروز Prepare of the Agarose gel

تم عملية الترحيل الكهربائي وفقاً لـ Sambrook (1989) :

1. حضر هلام الاكاروز بنسبة % 1.5 عن طريق اذابة 1.5 غرام من هلام الاكاروز Agarose gel في 100 مل من محلول TBE buffer الدائري المحضر مسبقاً وقد تم تسخين الاكاروز ليغلي ثم ترك ليبرد عند (45-50°م).
2. سكب الجل في قالب الصب وثقب المشط لعمل الثقوب المخصصة لحمل العينات. وسكب الجل برفق حتى لا يصنع فقاعات هواء وترك 30 دقيقة ليبرد.
3. وتمت ازالة المشط بلطف من الاكاروز الصلب وتم تثبيت اللوحة على حاملها في الوحدة الافقية لجهاز التوصيل الكهربائي ممثلة بالخزان المستخدم في الجهاز.
4. ملئ الخزان بمحلول TBE Buffer الذي يغطي سطح الهلام.
5. تم تحميل 3 مايكروليتر من (Intron/Rovea) وقد تم خلطها مع 5 مايكروليتر من الحامض النووي DNA المفترض ترحيله كهربائياً (لتحميل الصبغة Loading dye) . وبعد عملية خلط واكتمال عملية التحميل.
6. غمر هلام الاكاروز للثقوب وغلق غطاء الترحيل وبعدها تم تشغيل جهاز الترحيل باستخدام تيار 7 فولت/سم² 7V/e² لمدة 1-2 ساعة حتى وصلت الصبغة إلى الجانب الآخر من الهلام واكتمال عملية الترحيل.
7. تم اختبار الهلام من قبل مصدر للأشعة فوق البنفسجية مع 336 نانومتر بعد وضع الهلام في بركة تحتوي على 3 مايكروليتر من صبغة Red Safe Nucleic Acid Staining Solution و 500 مل من الماء المقطر.

3-6-5 تحليل تسلسل القواعد النروجينية للحامض النووي (DNA) المضاعف

1. تم ارسال نواتج الحامض النووي PCR-amplified Products المضاعفة من تفاعل البلمرة المتسلسل للعيينة فطر المشروم مع البوادي الامامية والخلفية (ITS1 , ITS4) والتي استخدمت في المضاعفة الكاملة لمنطقة ribosomal internal transcribed spacer (Its) region المهمة

في تشخيص فطر المشروم إلى شركة Macro gene في كوريا الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النتروجينية.

2. تم تسجيل فطر المشروم المشخص لأول مرة في البنك الجيني العالمي.

3. تحليل الشجرة الوراثية Phylogenetic tree analysis والتمائل symmetry لفطر المشروم Agaricus bisporus، تم تحديد الشجرة الوراثية لفطر المشروم قيد الدراسة باستخدام برنامج MEGA multiple لغرض معرفة التشابه لفطر المشروم قيد الدراسة والانواع المسجلة عالمياً، حيث تم تحديد الشجرة الوراثية لفطر المشروم بتتابع القواعد النتروجينية " Nucleotide sequence حزم الحامض النووي المضاعفة بالاستعانة ببرنامج Basic Local Alignment search Tool (BLAST) التابع لموقع المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National center for Biotechnology Information (NCBI) والعائدة لنفس الفطريات المشخصة عالمياً.

3-6 تحضير المركبات النانوية من المستخلصات المائية والكحولية

للمشروم

3-6-1 اختزال نترات الفضة من المستخلصات المائية والكحولية للمشروم

باستخدام AgNo3

أضيف 2 غرام من المستخلص المجفف للمحاليل المائية والكحولية للمشروم إلى 2 مل من محلول نترات الفضة (المحضر من اذابة 0.168 غرام بتركيز 0.01 مولاري) في 100 ml من الماء منزوع الايونات والمعروف بـ (DM) water Dematerialized water وتم استخدام جهاز المحرك المغناطيسي بدرجة حرارة 40 م° وعند ملاحظة التغيير اللوني للمحلول المائي من البني إلى البني - المحمر. تم قياس النفاذية للمحلول في مقياس الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer، وتمت القراءة ما بين 190-500 nm، بدأت الحزمة بالنهوض عند 300 نانومتر ووصلت إلى أعلى قيمة عند 400 نانومتر وعند الـ 500 نانومتر هبطت الحزمة مما تشير إلى الطيف الخاص بالفضة النانوية واختزال الفضة ووضع المحلول في الحاضنة الهزازة Shaker incubator لمدة 24 ساعة ثم فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي Centrifuge

(500 دورة لمدة 20 دقيقة) ثم غسل بالماء منزوع الايونات عدة مرات بعدها جفف عند درجة حرارة 50 م ثم طحن جيداً للحصول على مسحوق ناعم وخزن في الثلاجة لحين استخدامه في التجارب اللاحقة (Poiuera. 2014)، وعند الاستخدام تم اذابة المسحوق المستحصل عليه بمادة Dimethyle Sulfoxide(DMSO) حيث يعمل إما على اذابة 95 – 99% من المادة أو يعمل على تحويلها إلى مادة شبه ذائبة تم عمل تخافيف بتركيز مختلفة حسب الغرض من التجربة (Reeda, 2021).

3-6-2 تحضير اوكسيد الزنك من المستخلصات الكحولية المائية باستخدام Zinc Oxide

أضيف 1 غرام من المستخلص الفطري للمشروم المجفف إلى محلول اوكسيد الزنك (الناتج من اذابة أو من اوكسيد الزنك في 50 ml من الماء منزوع الايونات وحرك المزيج بواسطة المحرك المغناطيسي بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة تم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 40 م لمدة 18 ساعة وتم فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي (500 دورة لمدة 20 دقيقة)، ثم غسل بالماء المنزوع للايونات عدة مرات وبعدها جفف الراسب بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 50 م ثم طحن بالهاون الخزفي للحصول على مسحوق ناعم وتم خزنه في الثلاجة لحين استخدامه في التجارب اللاحقة. وعند الاستخدام يتم اذابة المسحوق بمادة (DMSO) حيث يعمل على اذابة 95-99% من المادة ، تم عمل تراكيز مختلفة حسب الغرض من التجربة اتبعت طريقة التحضير الموصوفة من قبل (Bashi *et al.*, 2013) مع بعض التحوير لتحضير المركب النانوي (Reeda, 2021).

3-6-3 الاختبارات التي تم اجراها لكشف عن تكوين المركبات النانوية لزنك والفضة وهي:

1. مطياف الاشعة تحت الحمراء (Fourier transform infrared spectrophotometer)FTIR:

ان مبدأ عمل مطياف الاشعة تحت الحمراء هو التعرف على المجاميع الوظيفية او الفعالة في المركبات الكيميائية كما يمكن بواسطتها التعرف على المركبات المختلفة (B.Samiha, 2016)، تهتز الجزيئات الطبيعية تبعاً لجميع مخططات اهتزازها ولكن بسعات ضعيفة جداً،

اذ كان توتو اهتزاز يوافق توتر اهتزاز المخططات العادية للجزيء فان الجزيء سيتجاوب معه ويهتز عندئذ بسعة كبيرة جداً

2. طيف حيود الاشعة السينية (X-Ray diffraction) XRD: هي تقنية تحليلية تدرس البنية الدقيقة للمادة وتوفر معلومات حول التركيب البلوري (J.André N'Diaye, 2016.) تُتيح طريقة حيود الاشعة السينية تحديد المسافات الفاصلة اثناء دراسة الجسم البلوري يتمثل مبدأ تحليل حيود الاشعة السينية من تفاعل هذه الاشعة مع المادة المراد تحليلها (B.D.eddine, 2012).
3. المجهر الالكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope) SEM : هو المجاهر الحديثة يعتمد مبدأ عمله على اظهار صورة الالكترونات المرتدة من على سطح العينة لتظهر على شاشة تلفزيونية وعادة ما يستخدم المجهر الالكتروني الماسح في دراسة لعينة كاملة او جزء منها (Postek, M.T. 1980).
4. مطياف الأشعة فوق البنفسجية (UVL) (Spectrophotometer UV-VIS) للكشف عن نترات الفضة النانوية كاختبار اولي.

7-3 الصفات المظهرية والمجهرية للفطرين *Trichophyton*

Microsporum Canis و rubrum بعد المعاملة

اتبعت طريقة Kady & El- Maveghy 1993 إذ تم مزج المستخلص الفطري للمشروم (المائية والكحولية) والمضاد الفطري كلوتريمازول والمركبات النانوية المحضرة من (نترات الفضة واوكسيد الزنك) كل على حدة مع الوسط الزراعي سابروييد دكسترويد اكار SDA وبأربعة تراكيز (10%, 20%, 30%, 40%) وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز إضافة إلى معاملة السيطرة Control (وسط زرع فقط بدون أي إضافة) وبعد تصلب الوسط تم عمل حفرة في وسط على طبق بواسطة ثاقب الفلين Cork borer بقطر 8 ملم وتم تلقح الاطباق بلقاح الفطريات المدروسة والنامية على وسط SDA وبعمر اسبوعين لكل منها عن طريق زراعة قرص بقطر 8 ملم لكل منها في الحفرة التي عملت في وسط الطبق وحضنت الأطباق جميعها بدرجة حرارة 25 م لمدة اسبوعين وقيست اقطار المستعمرة النامية (بمعدل قطرين متعامدين) وسجلت النتائج. كما تم تحضير شرائح زجاجية لدراسة شكل الغزول الفطرية والكونيديات من حيث شكلها وعددها قبل وبعد المعاملة .

3-8 قياس معدل الوزن الجاف للمستعمرات الفطرية النامية على وسط SDB

لغرض اختبار تأثير المستخلص الفطري للمشروم (المائية والكحولية) والمضاد الفطري كلوتريمازول والمركبات النانوية المحضرة من (نترات الفضة واوكسيد الزنك) كل على حدة مع الوسط الزرعي المعقم (SDB) Subroid Dextoid broth بعد اخراجه من الموصدة بدرجة حرارة 50 م° وبأربعة تراكيز 10% , 20% , 30% , 40% بمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز إضافة إلى معاملة السيطرة control (وسط زرعي فقط بدون اي إضافة) حيث استعملت أنابيب سعة 50 مل في كل منها 20 مل من الوسط الزرعي لثحت الانابيب بلقاح الفطريات عن طريق زراعة قرص بقطر 8 ملم وحضنت بدرجة حرارة 25 م° لمدة اسبوعين بعدها تم حساب الوزن الجاف بعد ترشيع المزارع السائلة خلال ورقة ترشيع معلومة الوزن بعد ذلك جففت اوراق الترشيع مع الفطريات في خزن بدرجة حرارة 40 لمدة 24 ساعة بعده تم حساب الوزن الجاف للفطر باستعمال ميزان كهربائي حساس ذي اربع مراتب عشرية باستخدام المعادلة التالية (Arey 2010).

Weight mycelium=(Weight of filter paper + Weight of Mycelium) – (Weight of filter paper)

3-9 التعبير الجيني

3-9-1 التعبير الجيني للجين الانزيم Serine protease الخاصة الفطرين

Trichophyton rubrum , *M.canis*

3-9-1-1 استخلاص الحامض النووي الرايبي RNA

باستخدام العدة Quick – RNAtm Fungal/Bacterial Miniprep المجهزة من شركة

Macrogene في كوريا الجنوبية وتتم بخطوتين رئيسيتين هما:

1. اعداد محلول بفر مؤقت Buffer preparation تم اضافة 96 مل 100% ايثانول (104 مل

95% الايثانول) إلى 24 مل من RNA wash Buffer.

2. جمع الحامض النووي الرايبي RNA (11) Total RNA purification تم تنفيذ جميع

الخطوات في درجة حرارة الغرفة كذلك الطرد المركزي (g 10.000 – 16.000) لمدة 30 ثانية

كحد ادنى.

1. تم اعادة تعليق الخلايا المضغوطة الطازجة أو المجمدة في 800 مايكرو ليتر من RNA Lysis Buffer ونقل إلى انبوب المزج ZR Bashing, Bead Lysis Tube (0.1 and 0.05 mm).
تم المزج باستخدام خفاقه مزودة بحامل انابيب سعة 2 ml.
3. وضعت انبوبة التحلل ZR Bashing Bead في جهاز الطرد المركزي لمدة دقيقة واحدة لتحطيم الخلايا.
4. تم نقل 400 مايكرو ليتر من المادة الطافية إلى مرشح Zymo-spintm III CG Column2 في انبوب التجميع ووضع في جهاز الطرد المركزي وحفظ الراسب.
5. اضيف إلى الراسب حتى اكتمل الحجم الإيثانول (95-100) (1:1) ومزج جيداً.
6. نقل الخليط إلى Zymo-spintm III CG Column2 إلى انبوب التجميع ثم وضع في جهاز الطرد المركزي.
7. تم اضافة 400 مايكرو ليتر من RNA Prep Buffer إلى العمود ثم وضع في جهاز الطرد المركزي.
8. تم اضافة 700 مايكرو ليتر من RNA Wash Buffer إلى عمود التجميع ثم جهاز الطرد المركزي التخلص من الراشح.
9. تم اضافة 400 مايكرو ليتر من RNA Wash Buffer ووضع عمود التجميع في جهاز الطرد المركزي لمدة 1 دقيقة للتأكد من ازالة جميع محلول الغسل RNA Wash Buffer ثم نقل انبوب التجميع الحاوي على الانوبة الحرة بحذر.
10. تم اضافة 50 مايكرو ليتر من DNAs/RNAs خالية من الماء مباشرةً على انبوب التجميع ثم جهاز الطرد المركزي .
- بدلاً من ذلك لشطف التركيز العالي RNA يستخدم ≤ 25 مايكرو ليتر.

- RNA المزال يمكن استخدامه على الفور أو تخزينه مجمداً.

3-10 طريقة تحليل بيانات - Real - Time PCR data analysis

نقوم بتحليل البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلمرة في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة Livak Method التي وضعت من لدن Livak, Schmittgen (2001) والتي تعتمد على استخراج الكمية النسبية (Relative Quantitative) من خلال عملية تصحيح ومعادلة الجينات الهدف مع جينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بايولوجي لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي، تم الحصول على النتائج في جدول اعلاه باستخدام طريقة Livak $(2^{-\Delta\Delta ct})$ method) وتحتاج هذه الطريقة إلى وجود جين هدف والذي تمثل بالجين Serine protease جين محافظ أو معياري (Housekeeping Gene (HKG) وتمثل في الجين $(\beta\text{-TUBULIN})$ ، وكما في المعادلات الآتية:

1- معادلة CT - للجين الهدف بالنسبة إلى الجين المعياري لكل من العينات المعاملة وعينات السيطرة (غير المعاملة)، باستخدام القوانين الآتية :-

$$\Delta Ct (test) = Ct (test) mean - Ct (reference) mean$$

$$\Delta Ct (Control) = Ct (Control) mean - Ct (reference) mean$$

(CT target , test): يشير إلى عتبة الدورة (الجين الهدف ، العينة المعاملة).

(CT ref , test): يشير إلى عتبة الدورة (الجين المحافظ ، العينة المعاملة).

(CT target , control): يشير إلى عتبة الدورة (الجين الهدف ، عينة السيطرة).

(CT ref , control): يشير إلى عتبة الدورة (الجين المحافظ ، عينة السيطرة).

لعينة السيطرة باستخدام القانون CT للعينة المعاملة بالنسبة إلى $CT - 2$ معادلة.

2- معادلة ΔCT للعينة المعاملة بالنسبة إلى ΔCT لعينة السيطرة باستخدام القانون التالي:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (test) - \Delta Ct (control)$$

3- ايجاد نسبة التعبير الجيني (Fold change)، باستخدام القانون:-

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

- Statistical analysis : التحليل الاحصائي 11-3

اعتمد التصميم التام العشوائي وقورنت متوسطات المعاملات باستعمال اقل فرق معنوي

(LSD) Least Significant Difference عند مستوى احتمال 0.05 و 0.01

(d Steel and Torrie, 1986) واستعمل برنامج Genstat في التحليل الاحصائي.

الفصل الرابع النتائج

النتائج

The Results

الفصل الرابع

Results النتائج

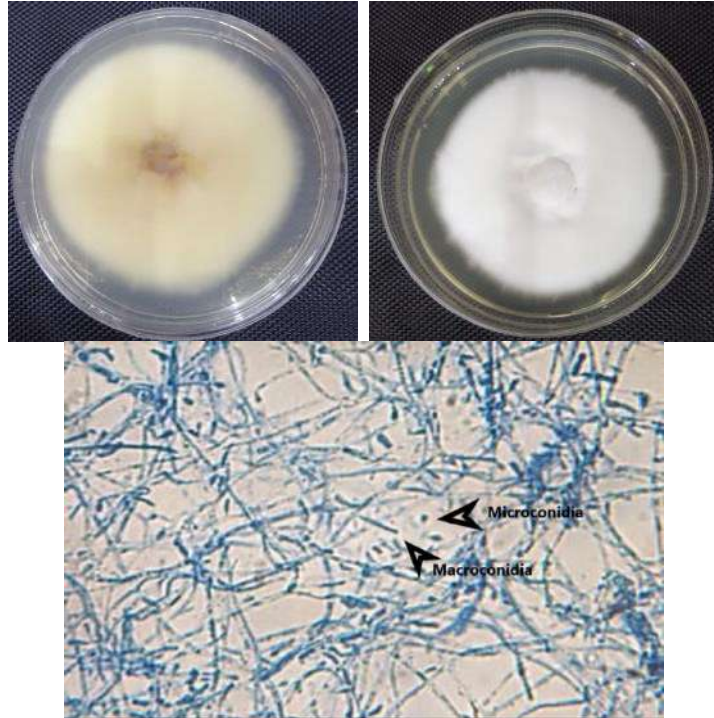
1-4 الخواص المظهرية والمجهرية للفطرين

Microsporium canis, Trichophyton rubrum,

Trichophyton rubrum isolate IQT-Na الفطر 1-1-4

1-1-1-4 الصفات المظهرية

أظهر الفطر مستعمرات بيض مسطحة تميل إلى الإرتفاع قليلاً فوق سطح الوسط الزرعي SDA ذات انسجة قطنية ناعمة إلى مخملية Fluffy مفككة كما ظهرت الجهة الخلفية من المستعمرة بلون بني مصفر إلى بني محمر بلغ معدل النمو الفطري للمزرعة الفطرية 7 سم بعد 14 يوماً من الحضان بدرجة حرارة 25 م. (Al-Masoodi, et al., 2020b; Mohammed, et al., 2021) ، الشكل (1-4).



الشكل (1-4) الوجه الامامي والخلفي لفطر الـ *Trichophyton rubrum* والصور المجهرية

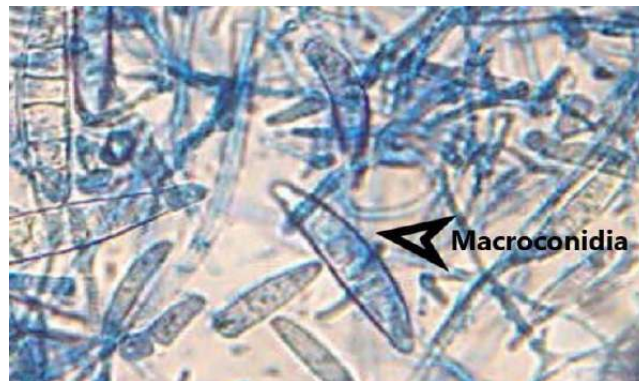
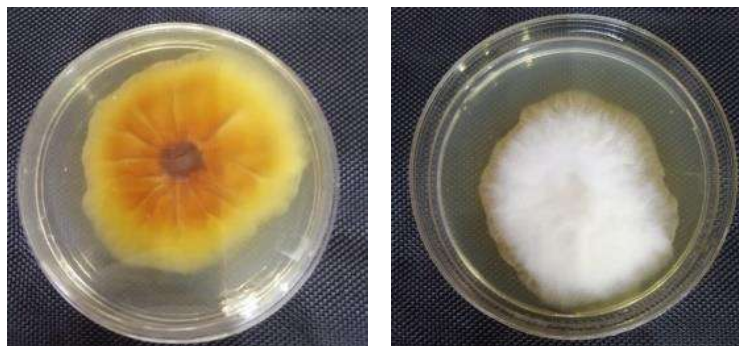
2-1-1-4 الصفات المجهرية

اظهر الفحص المجهرى غزارة انتاج الكونيدات الصغيرة Microconidia ذات الشكل الكروي إلى الكمثري الشكل وبترتيب حلزوني على طول العزل الفطري، وانتاج الكونيدات الكبيرة Macroconidia الشكل الاسطواني يشبه السيكار مع جدران سميكة ملساء متعددة الخلايا بين 6-8 خلايا. (Al-Masaoodi, 2021; Mohammed, et al., 2021). الشكل (2-4) صورة مجهرية).

2-1-4 الفطر *M.canis* isolate IQM No.3

1-2-1-4 الصفات المظهرية

اظهر الفطر مستعمرات ذات لون كريمي تتحول إلى الاصفر البرتقالي على الوسط SDA كما ظهرت الجهة الخلفية من المستعمرة بلون ذهبي مصفر إلى البرتقالي ومع تقدم عمر المستعمرة يتحول إلى اللون البني بلغ معدل النمو الفطري للمستعمرة الفطرية 6سم بعد 14 يوماً من الحضن بدرجة حرارة 25 م°. (Al-Masaoodi, et al., 2020; Mohammed, et al., 2012). الشكل (2-4).



الشكل (2-4) الوجه الامامي والخلفي لفطر ال *M.canis* والصور المجهرية

4-2-1-2 الصفات المجهرية

أظهر الفحص المجهرى غزارة انتاج الكونيدات الكبيرة Macro conidia ذات الشكل المغزلي المدبب سمكة الجدران ومغطاة بأشواك تحتوي على 4-7 حازراً عرضياً والابواغ الصغيرة Microconidia قليلة العدد وحيدة الخلية ذات شكلاً كمشياً، (Al-Masoodi, 2021; Mohammed, et al., 2021). الشكل (3-4).

4-2 الخصائص المظهرية والجزئية للفطريات الجلدية الخاص بالجنسين *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*

ينتمي كلا الجنسين *M. Canis* و *T. rubrum* إلى مجموعة الفطريات الجلدية Dermatophytoa التي تمتاز بكونها محبة للكيراتين Keratinophilic ، تصيب الجلد وملحقاته كالشعر والاذافر (Aneja et al., 2012)، وهي ذات انتشار واسع وخاصة في البلدان النامية وخاصة في المناطق الاستوائية والمعتدلة بسبب الظروف الحارة والرطوبة وقلة إجراءات النظافة (Karan et al 2009).

ان اعادة تنشيط الفطرين *M. Canis* و *T. rubrum* لم يؤثر على الصفات المظهرية والمجهرية، حيث لوحظ احتفاظهما بصفاتهما كما تم وصفهما من قبل (Al-Masoodi, 2021)

4-3 الصفات المظهرية والجزئية لفطر المشروم *Agaricus bisporus*

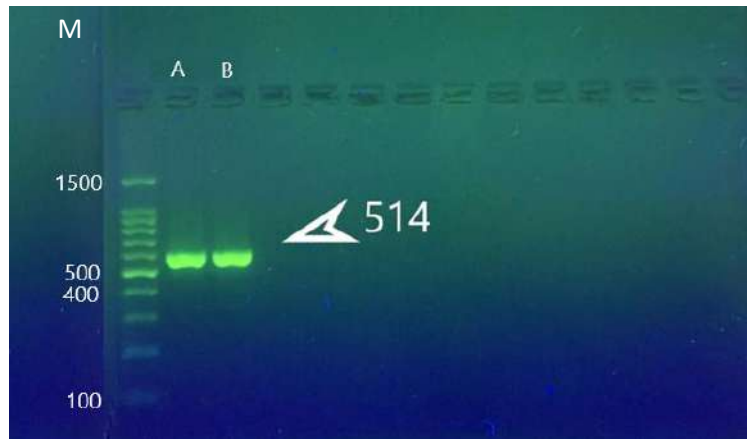
4-3-1 الصفات المظهرية

يمكن تمييز فطر المشروم بسهولة ويرجع ذلك لكونها بسيطة التركيب ويتكون هيكلها من قبة مستديرة قلنسوة Pileus السطح الداخلي للقلنسوة يحتوي على صفائح غلصمية أو خياشيم Gills تحمل القلنسوة على ساق Stipe قصير، ويحيط بالساق زوائد جلدية رقيقة ويحاط الساق من الأعلى تركيب حلقي الشكل من زوائد جلدية تسمى الطوق (Geovges, 2007).

2-3-4 الصفات الجزيئية

1-2-3-4 التشخيص الجزيئي لفطر المشروم *Agaricus bisporus*

بينت نتائج تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain Reaction ان فطر المشروم المستخدم في الدراسة والذي شخص مظهرياً احتوت على حزمة مفردة من الحامض النووي المستخلص والتي صورت عند التعرض للضوء (ultra violet light 320nm) نانوميتر بعد التصبغ بصبغة Red stain staining. حيث انها تسبب طفرات اقل بكثير من اختبار Ames فضلاً عن ان لديها نتيجة Negative في نخاع الفئران في اختبار الخلايا الحمراء والخلايا الحمراء الدقيقة واختبار انحراف الحيوانات المنوية للحيوانات المنوية للفئران لذلك من الحكمة اختيارها بدلاً من EtBr للكشف عن حامض النيوكليك في المادة الهلامية Agarose gels (Cat.No.21141) وكان Marker ladder 1500-100 bp ايجابي لعزلات الفطر عند 514bp كما في الشكل (3-4)، وتم تسجيل العزلتين في البنك الجيني العالمي بعد ان نجحت في جينوماتها بالتفاعل مع البادئ وبارقام تسلسلية ID: MZ619063 و ID: MZ798947.1 على التوالي. ويعد التسجيل الاول لهذا النوع من الفطريات العراقية في البنك الجيني العالمي الجدول (1-4) وينظر الملحق (1، 2).



الشكل (3-4) الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لفطر المشروم

الجدول (1-4) العزلة العراقية لفطر المشروم *Agaricus bisporus* ونسبة التطابق بينهما

Gene: 18S ribosomal RNA gene						
No.	Type of substitution	Location	Nucleotide	Sequence ID with compare	Source	Identities
A	Transition	196	C\T	ID: MZ619063.	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
	Transversion	354	A\C			
B	Transition	484	A\G	ID: MZ798947.1	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
	Transversion	604	T\A			

ووضح الجدول (1-4) ان العينة (A) ذات الرقم التسلسلي MZ619063 تحتوي تغايرين، الأول من Transtion في الموقع 196 (C/T)، والثاني من نوع Transversion في الموقع 354 (A/C)، وكانت نسبة التطابق مع للعينة (B) ذات الرقم التسلسلي MZ798947.1 99%، اما عند مقارنة العينة (B) ذات الرقم التسلسلي MZ798947.1 مع العينة (A) ذات الرقم التسلسلي MZ619063 بنسبة التطابق 99%، كما إنها تحتوي تغايرين الاول من نوع Transtion في الموقع 484 (A/GT)، والثاني من نوع Transversion في الموقع 604 (T/A). ملحق 5.

يبين الجدول (2-4) النسبة المئوية للتشابه الوراثي بين العزلة المحلية قيد الدراسة مع العزلات العالمية لفطر المشروم المشخصة والمسجلة بالبنك الجيني العالمي وأرقام تسلسلها، وتم مقارنة العزلة العراقية لفطر المشروم *Agaricus bisporus* var. *bisporus*. IRAQ بالبنك المركزي الجيني Genbank التابع للمركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية Natinal center of biotechnology Information-(NcBI) مع الدول المسجلة.

تم مقارنة العينة A ذات الرقم التسلسلي MZ619063.1 والعينة B ذات الرقم التسلسلي MZ798947.1 وكلاهما يعودان للنوع المحلي قيد الدراسة وقد وجد اختلاف بين العينتين في الموقع 159 (T/C) و 316 (C/A) و 447 (G/A) و 566 (T/A) وكانت نسبة التقارب 99%-100% مما يؤكد التشخيص الدقيق للفطر. اعتمدت الشجرة الوراثية لتحديد الأنواع جزيئياً والمسافة التطورية بين الأنواع العراقية وباقي الأنواع في الدول حسب الجدول (2-4).



الشكل (4-4) يبين الفطر المشروم (الاول بالعراق)

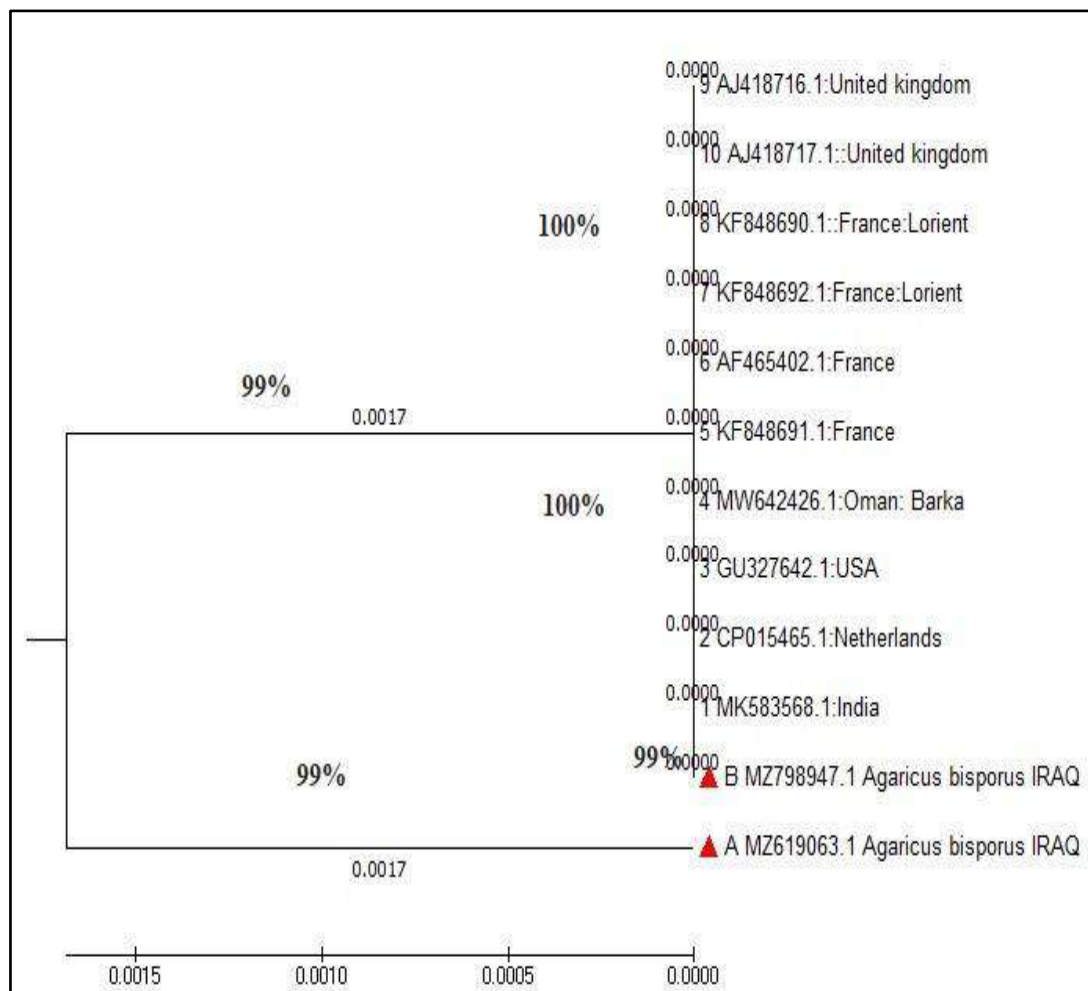
الجدول (2-4) نسبة التقارب بين الانواع العراقية والعالمية.

No.	Accession	Country	Source	Compatibility
1.	ID: MZ619063.	Iriq	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
2.	ID: MZ798947.1	Iriq	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
3.	ID: MK583568.1	India	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
4.	ID: CP015465.1	Netherlands	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
5.	ID: GU327642.1	USA	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
6.	ID: MW642426.1	Oman: Barka	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
7.	ID: KF848691.1	France	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
8.	ID: AF465402.1	France	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
9.	ID: KF848692.1	France: Lorient	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
10.	ID: KF848690.1	France: Lorient	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
11.	ID: AJ418716.1	United kingdom	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%
12.	ID: AJ418717.1	United kingdom	<i>Agaricus bisporus</i> var. <i>bisporus</i>	99%

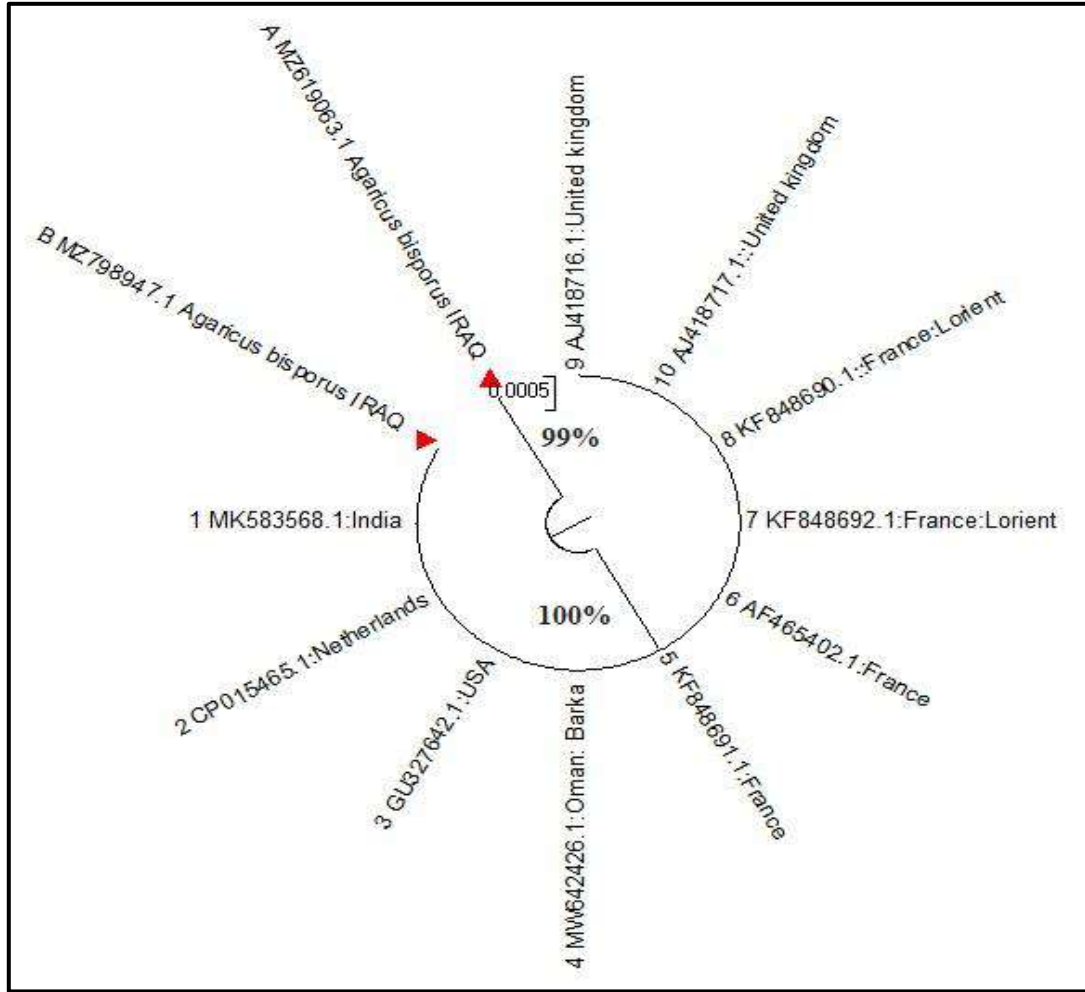
يوضح الجدول اعلاه الاختلاف بين العينتين المحليتين ذات التسلسلي MZ619063.1 و MZ798947.1 مع باقي دول العالم وتم مقارنة الاختلاف مع العينة KF848690.1 العائدة لدولة France. Lorient في الموقع 2(A/T) و 121(T/C) و 123(C/T) و 455(A/G) و 492(C/T) و 497(T/C) و 533(T/C) وعلى التوالي . أما العينة ذات الرقم التسلسلي KF848692.1 العائدة لدولة France. Lorient فكان الاختلاف في الموقع 22(C/T) و 444(C/T) على التوالي. اما العينة ذات الرقم التسلسلي AJ418717.1 العائدة لدولة United Kingdom فكان الاختلاف في المواقع 2(G/T) ونسبة التطابق 99%، كما لوحظ تشابه العينة العراقية ذات الرقم التسلسلي BMZ798947.1 مع باقي العينات العالمية في الموقع 15(C/C) و 316(A/A) على التوالي، وهذا

يدل على إن درجة التقارب بين الأنواع العراقية والأنواع العالمية المسجلة في البنك الجيني .NcBI

إن نسبة التقارب بين الأنواع العراقية والأنواع العالمية هي 99%، كما في الجدول (4-2)، اما بين الأنواع العالمية التي تعود إلى الدولة التالية (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient - United Kingdom) الأنواع التي تعود لهذه الدول 100%.



الشكل (4-5) تحليل الشجرة الوراثية للعينة *Agaricus bisporus* A, B وتطابق بنسبة 99% مع العينات للدول (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient - United Kingdom) والنسبة العشرية والمئوية.



الشكل (4-6) تحليل الشجرة بالنسبة المئوية لفطر *Agaricus bisporus* A, B وكانت نسبة التوافق 99% مع العينات للدول (India – Netherlands – USA - Oman: Barka –France - France: Lorient - United Kingdom)

4-4 مواصفات المركبات النانوية المحضرة من المشروم بواسطة XRD

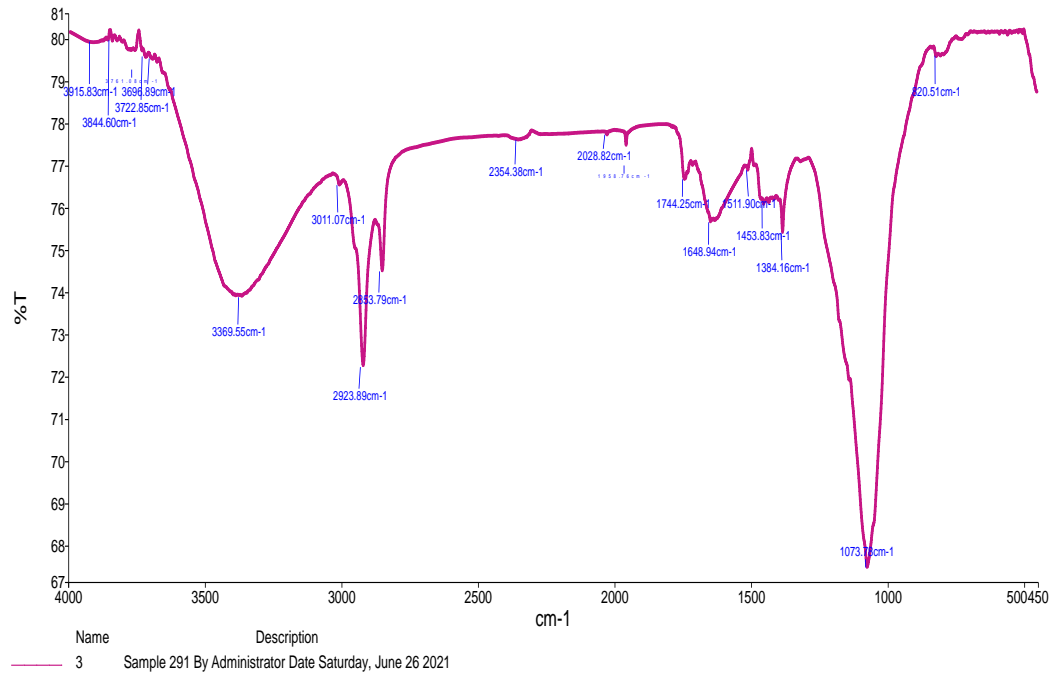
FTIR. SEM. و UVL. لنترات الفضة النانوية فقط

1-4-4 فحص FTIR

1-1-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaNps الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

الشكل (4-7) يشاهد حزم FTIR من الزنك النانوي ZnOaNps من المستخلص الكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* بشكل مسحوق تبتداء حزم FTIR بمدى بمقدار

من 4000-450 عند القمة الحزمة 3369.5 تدل على وجود جزيئات الماء أو الكحولات أو الفينولات وهذه جزيئات (O-H) والحزمة 2853.7 دلالة على وجود المجموعة الأروماتية والحزمة 2923.5 دلالة على وجود المجموعة الأليفاتية أي مجموعة الأصرة C-H

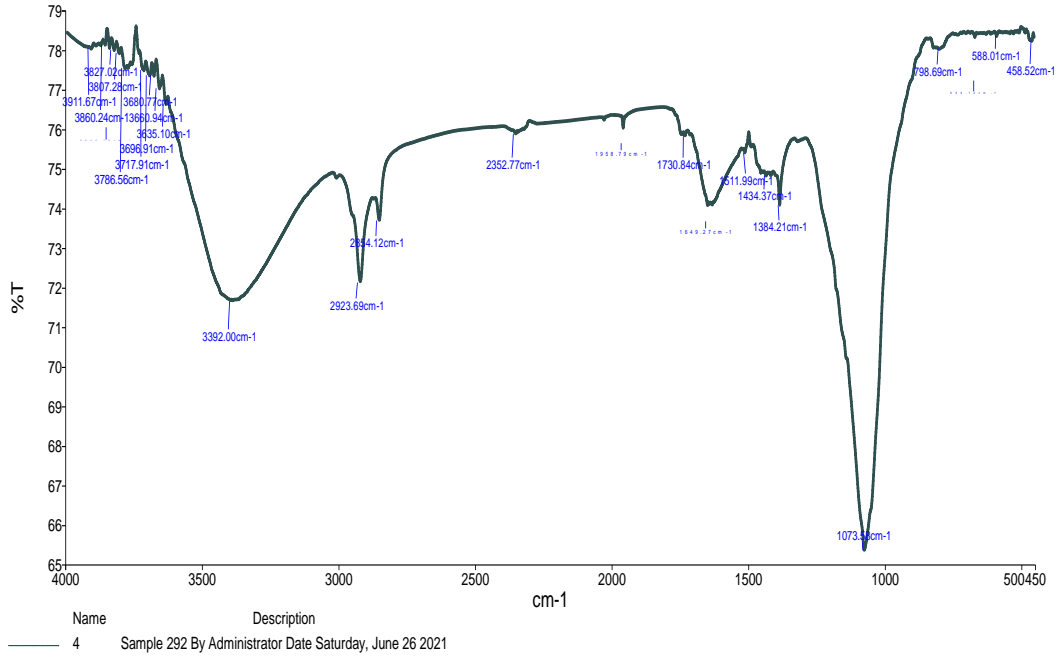


الشكل (4-7) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

أما المجموعات الوظيفية المتقابلة لوضع التمدد المتناظر فتظهر في الحزمة 1073.7 وغير المتناظر فتظهر في الحزمة 1384.1، أما الحزمة الزنك النانوي فتبدأ بالظهور عند 520.5 .

2-1-4-4 خصائص المركب النانوي لأكسيد الزنك ZnO من المستخلص المائي لفطر المشروم مع أكسيد الزنك

الشكل (4-8) يمثل حزم FTIR من الزنك النانوي ZnO من المستخلص المائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* والذي يكون بشكل مسحوق بني غامق اللون تبدأ الحزم بالظهور بمدى 4000-450 عند القمة الحزمة 3392 تدل على وجود جزيئات الماء أو الكحول والتي تمثل مجموعة الكاربوكسيل والتي تمثل وجود جزيئات الماء على سطح جسيمات أكسيد الزنك النانوية وهذه النتائج متوافقة مع ما ذكره الباحثين Kulkarni & Shirsat 2015 ، والحزمة 2854.1 تدل على وجود المجموعة الأروماتية والحزمة 2923.6 تدل على وجود الأصرة C-H.

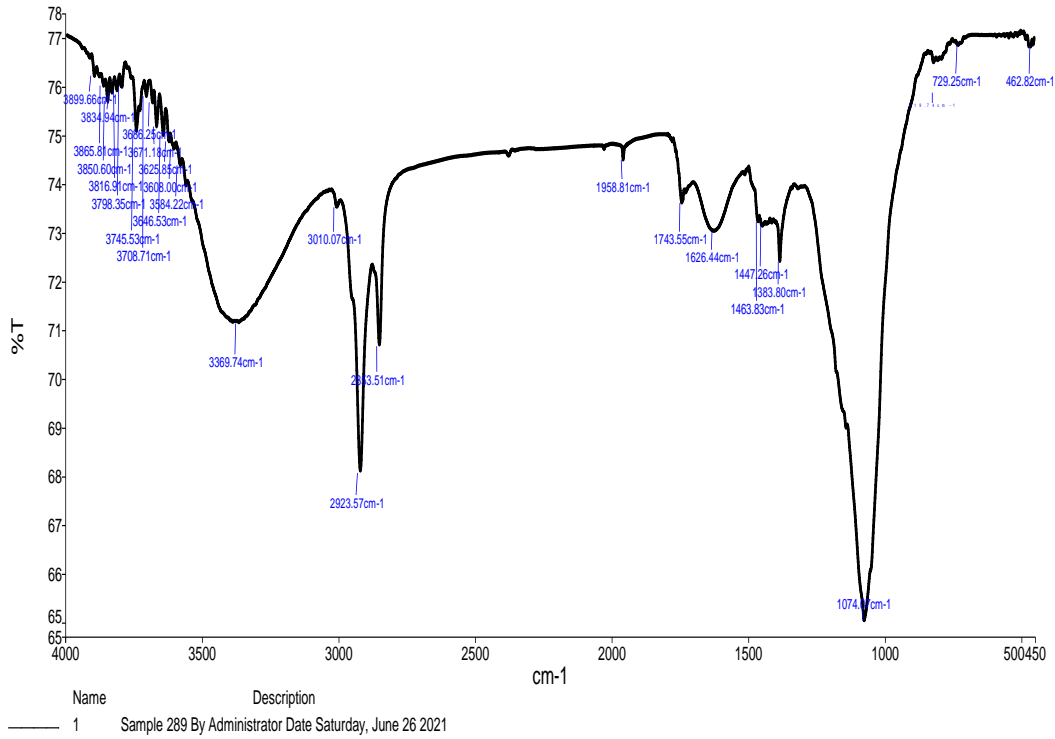


الشكل (4-8) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص المائي لفطر المشروم

اما المجموعات الوظيفية المتقابلة لوضع التمدد المتناظر فتظهر الحزمة 1073.5 وغير المتناظرة فتظهر في الحزمة 1384.2، أما حزمة الزنك النانوي فتبدأ بالظهور ما بين 458.5 - 588 .

3-1-4-4 المركب النانوي لنترات الفضة AgaNps الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

الشكل (4-9) يلاحظ حزم FTIR من مدى يبدأ 40000-450cm لجزيئات الفضة النانوية من المستخلص الكحولي لفطر المشروم. يشكل مسحوق عند القمة 3389.7 حزمة تدل على وجود الماء (جزئية الهيدروكسيد) تكون أما للماء أو الكحولات أو الفينولات (panigrahi, 2013) أي دلالة على وجود اصرة O-H . والحزمة 2813.5 دلالة على وجوده المجموعة الاروماتية. الحزمة 2923.5 تدل على وجود المجموعة الالفائية أي وجود الاصرة C-H .

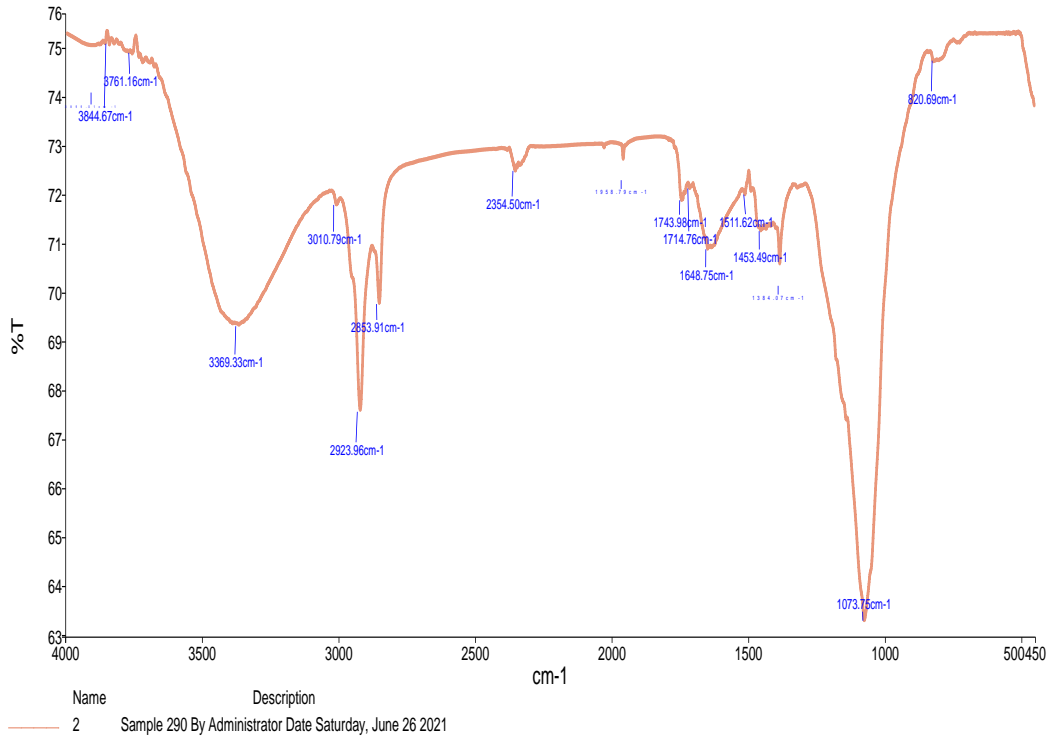


الشكل (9-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

أما المجموعات الوظيفية المقابلة لوضع التمدد المتناظرة تظهر في الحزمة 1074.6 وغير متناظرة تظهر في الحزمة 1463.8 وهما تمثلان أصرة التي تربط كاربون أو كسجين (C-O) ، اما حزمة الفضة النانوية AgawNps فظهرت 452.8.

4-1-4-4 المركب النانوي لنترات الفضة AgawNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus*

الشكل (10-4) يلاحظ حزم FTIR من الفضة النانوية AgawNps من المستخلص المائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* بشكل مسحوق اسود اللون يبدأ مدى الحزمة من 450 إلى 4000 عند القمة توجد الحزمة 3369.3 تدل على وجود جزيئات الماء أو الكحولات أو الفينولات وفي جزيئات الاصرة O-H. والحزمة 2853.9 دلالة على وجود المجموعة الارومانية والحزمة 2923.9 دلالة على وجود المجموعة الالفائية أي مجموعة الاصرة C-H.



الشكل (10-4) التحليل FTIR لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص المائي لفطر المشروم

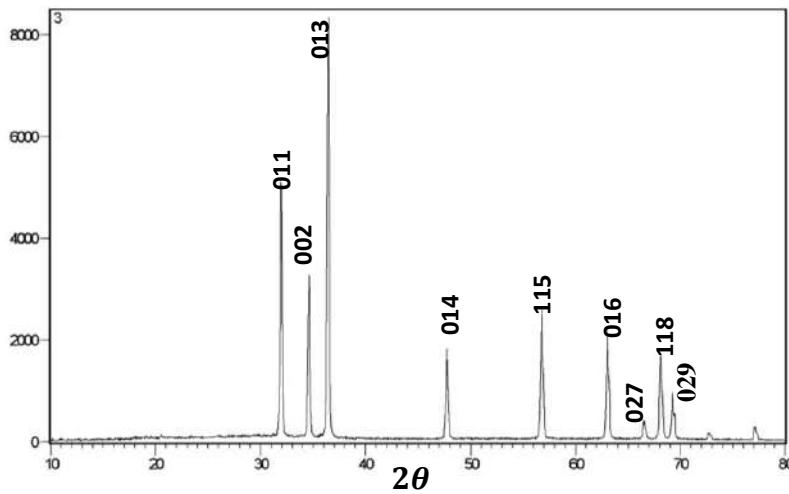
أما المجموعات الوظيفية المقابلة لوضع التمدد المتناظرة فتظهر في الحزمة 1073.7 وغير متناظرة فتظهر في الحزمة 1453.4 وهما تمثلان اصرة تربط كاربون أوكسجين (C-O)، أما حزمة الفضة النانوية AgawNps فظهرت بمدى يتجاوز 450.

2-4-4 طيف حيود الأشعة السينية XRD

1-2-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaaNps الناتج من المستخلص

الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

خضعت جسيمات اوكسيد الزنك النانوي المخلفة حيويًا من المستخلص الكحولي لفطر المشروم للفحص بجهاز حيود الأشعة السينية للحصول على التركيب البلوري ومتوسط حجم الجسيمات والشكل (11-4) يوضح طيف حيود الأشعة السينية XRD لجسيمات الزنك النانوي ويوضح ظهور القمم والزوايا التي تدل على حشر جسيمات الزنك النانوي بين طبقات المستخلص الكحولي لفطر المشروم حيث ظهرت القمم الرئيسية مع انعكاسات براك عند قيمة 2 θ).

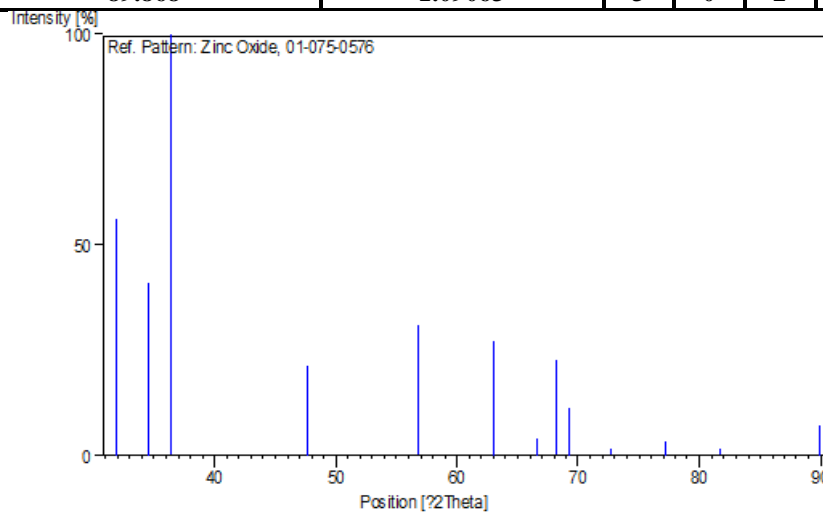


الشكل (4-11) طيف حيود الأشعة السينية لأكسيد الزنك الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

الجدول (4-3) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لأكسيد الزنك المتكون من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

Agaricus bisporus

No.	2θ	D	Hki			
			h	k	i	l
1.	31.840	2.80826	0	0	1	1
2.	34.503	2.59740	2	0	0	2
3.	36.337	2.47039	1	0	1	3
4.	47.653	1.90683	2	0	1	4
5.	56.731	1.62135	0	1	1	5
6.	63.016	1.47393	3	0	1	6
7.	66.541	1.40413	0	0	2	7
8.	68.120	1.37538	2	1	1	8
9.	69.261	1.35549	1	0	2	09
10.	72.759	1.29870	4	0	0	10
11.	77.162	1.23520	2	0	2	11
12.	81.610	1.17875	4	0	1	12
13.	89.868	1.09063	3	0	2	13



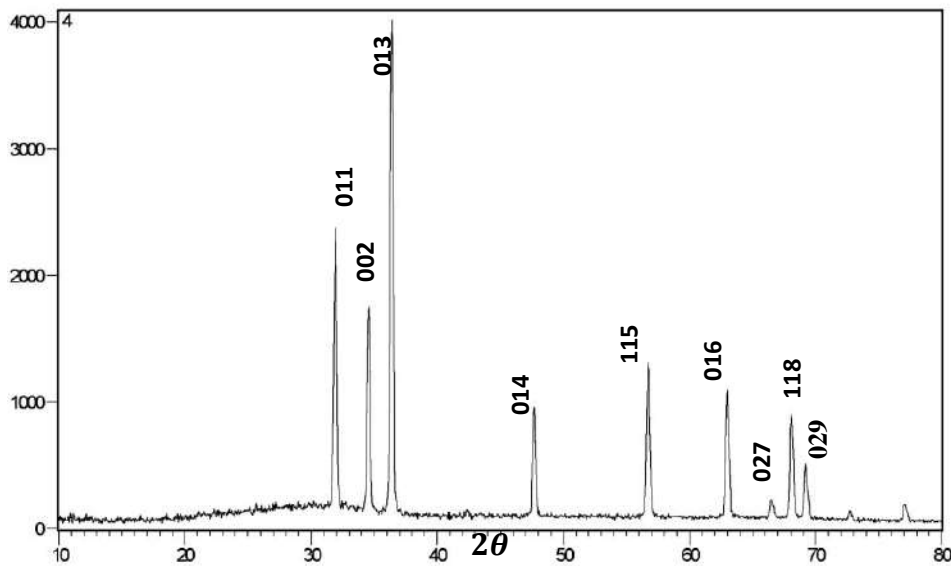
الشكل (4-12) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لأكسيد الزنك الناتج من المستخلص الكحولي لفطر

المشروم *Agaricus bisporus*

الشكل (4-12) يمثل قيم 2θ وكانت ابعاد الجسيمات $a(3.2427)$ و $b(3.2427)$ و $c(5.1948)$ كما يمكن الاستعانة بـ Reference coid بالرقم 01-075-0576 للأضلاع على Peak list.

4-2-4-2 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaaNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

جسيمات اوكسيد الزنك النانوي المخلفة حيويًا من المستخلص المائي لفطر المشروم خضعت لفحص حيود الأشعة السينية للحصول على البلورة أو متوسط حجم الجسيمات والشكل (4-13) يوضح طيف حيود الأشعة السينية XRD لجسيمات الزنك النانوي وظهور القمم والزوايا التي تدل على حشر جسيمات الزنك النانوي بين طبقات المستخلص المائي لفطر المشروم حيث ظهرت القمم الرئيسية مع انعكاسات براك عند قيمة 2θ ثيتا.



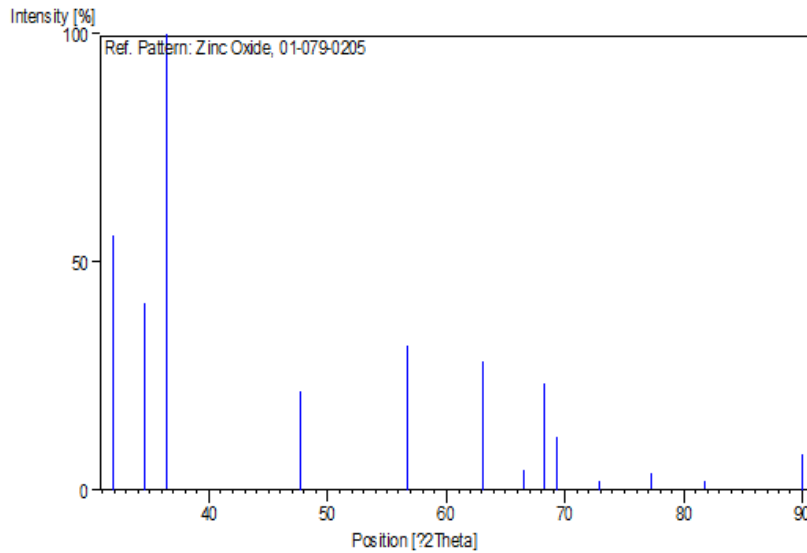
الشكل (4-13) طيف حيود الأشعة السينية لاوكسيد الزنك الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم

الجدول (4-4) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لاوكسيد الزنك المتكون من المستخلص المائي لفطر المشروم

Agaricus bisporus

No.	2θ	d	Hki			
1.	31.850	2.80739	0	0	1	1
2.	34.552	2.59380	2	0	0	2
3.	36.358	2.46903	1	1	1	3
4.	47.698	1.90514	2	0	1	4

No.	2θ	d	Hki			
5.	56.751	1.62085	0	0	1	5
6.	63.093	1.47232	3	1	1	6
7.	66.565	1.40370	0	0	2	7
8.	68.168	1.37454	2	0	1	8
9.	69.291	1.35497	1	0	2	9
10.	72.876	1.29690	4	0	0	10
11.	77.214	1.23451	2	0	2	11
12.	81.729	1.17734	4	0	1	12
13.	89.953	1.08982	3	0	2	13



الشكل (4-14) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لأكسيد الزنك الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم

الشكل (4-14) يمثل قيم 2θ وكانت ابعاد الجسيمات a(3.2417) و b(3.2417) و

c(5.1876) كما يمكن الاستعانة بـ Reference coid بالرقم 01-079-0205 للأضلاع على Peak

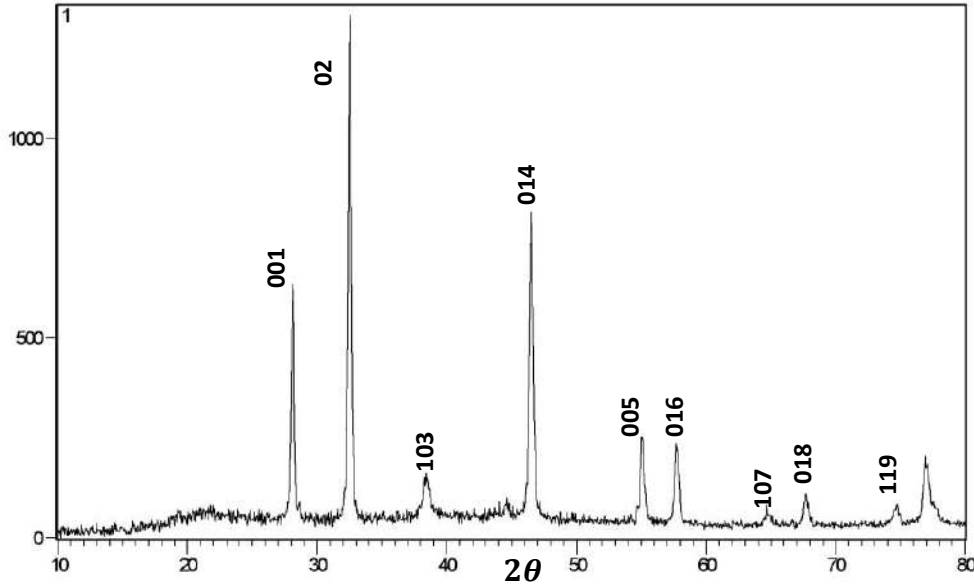
.list

3-2-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgaaNps الناتج من المستخلص

الكحولي لفطر المشروم نترات الفضة

تم فحص طبيعة الجسيمات النانوية للفضة المخلفة حيويًا من المستخلص الكحولي لفطر المشروم عن طريق فحص طيف حيود الأشعة السينية XRD ، حيث اظهر إن الجسيمات النانوية للفضة بلورية في مظهرها الشكل (4-15) وبين طيف حيود الأشعة السينية امتداد القمم

والزوايا التي تدل على وجود جسيمات الفضة النانوية ويبين القمم للـXRD ظهرت القمم الرئيسية مع انعكاسات براك عند قيمة 2θ 2 .

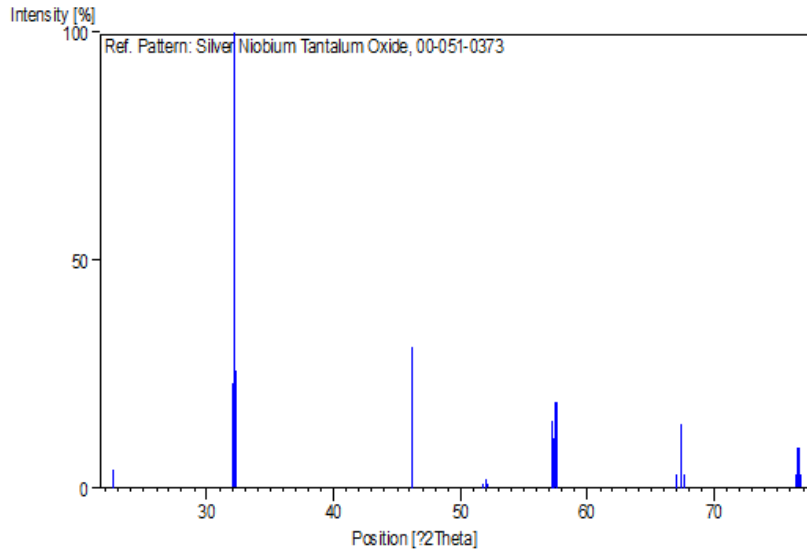


الشكل (4-15) طيف حيود الأشعة السينية لنترات الفضة الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

الجدول (4-5) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لنترات الفضة المتكون من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

Agaricus bisporus

No.	2θ	d	Hki			
			h	k	i	l
1.	22.614	3.92878	1	0	0	1
2.	32.05	2.79037	-1	0	1	2
3.	32.205	2.77729	1	1	0	3
4.	32.324	2.76734	1	0	1	4
5.	46.18	1.96417	2	0	0	5
6.	51.799	1.76353	-2	0	1	6
7.	52.024	1.75643	2	1	0	7
8.	52.189	1.75127	2	0	1	8
9.	57.229	1.60843	-2	1	1	9
10.	57.337	1.60566	-1	2	1	10
11.	57.525	1.60086	1	2	1	11
12.	57.57	1.59971	2	1	1	12
13.	67.022	1.39523	-2	0	2	13
14.	67.383	1.38863	2	2	0	14
15.	67.679	1.38327	2	0	2	15
16.	76.388	1.24578	-3	0	1	16
17.	76.617	1.24263	3	1	0	17
18.	76.671	1.24189	0	1	3	18
19.	76.85	1.23944	3	0	1	19

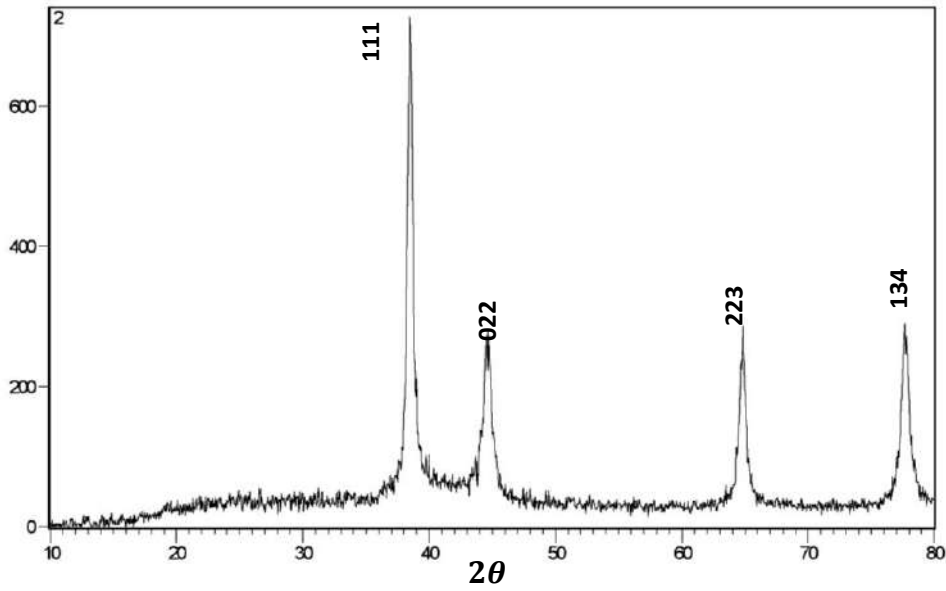


الشكل (16-4) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لنترات الفضة الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

الشكل (16-4) يمثل قيم 2θ وكانت ابعاد الجسيمات a(3.9286) و b(3.9259) و c(3.9302). كما يمكن الاستعانة بـ Refernce coid بالرقم 00-051-0373 للاطلاع على Peak .list

4-2-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgawNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع نترات الفضة

تم فحص طبيعة الجسيمات النانوية للفضة المخلفة حيويًا من المستخلص المائي لفطر المشروم وعن طريق فحص طيف حيود الأشعة السينية XRD، كانت جسيمات الفضة النانوية بلورية في مظهرها. الشكل (17-4) يبين قيم جسيمات الفضة النانوية المخلفة من المستخلص المائي لفطر المشروم القمم الرئيسية مع انعكاسات براك عند قيمة 2θ .

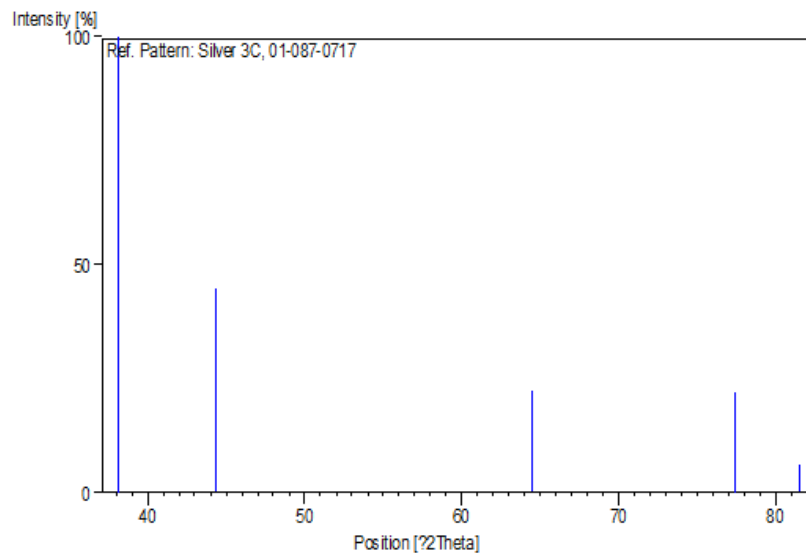


الشكل (4-17) طيف حيود الأشعة السينية لنترات الفضة الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم

الجدول (4-6) يبين قيمة 2θ ومعامل براك لنترات الفضة المتكون من المستخلص المائي لفطر

المشروم *Agaricus bisporus*

No.	2θ	d	Hki			
1.	38.119	2.35888	1	1	1	1
2.	44.305	2.04285	0	0	2	2
3.	64.452	1.44451	0	2	2	3
4.	77.409	1.23188	1	1	3	4
5.	81.552	1.17944	2	2	2	5



الشكل (4-18) يبين قيم انصاف اقطار الزاوية (2θ) لنترات الفضة الناتج من المستخلص المائي لفطر

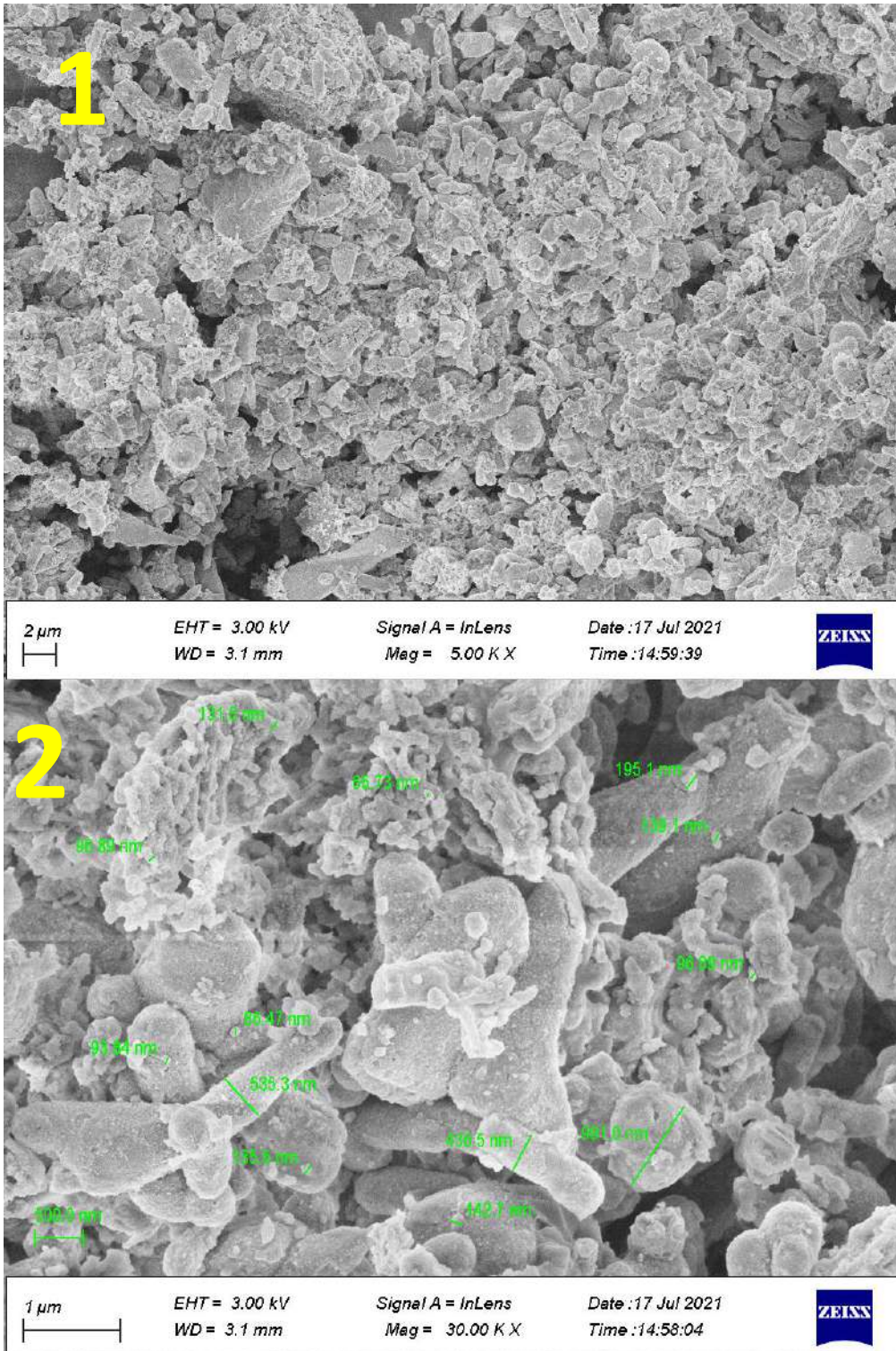
المشروم

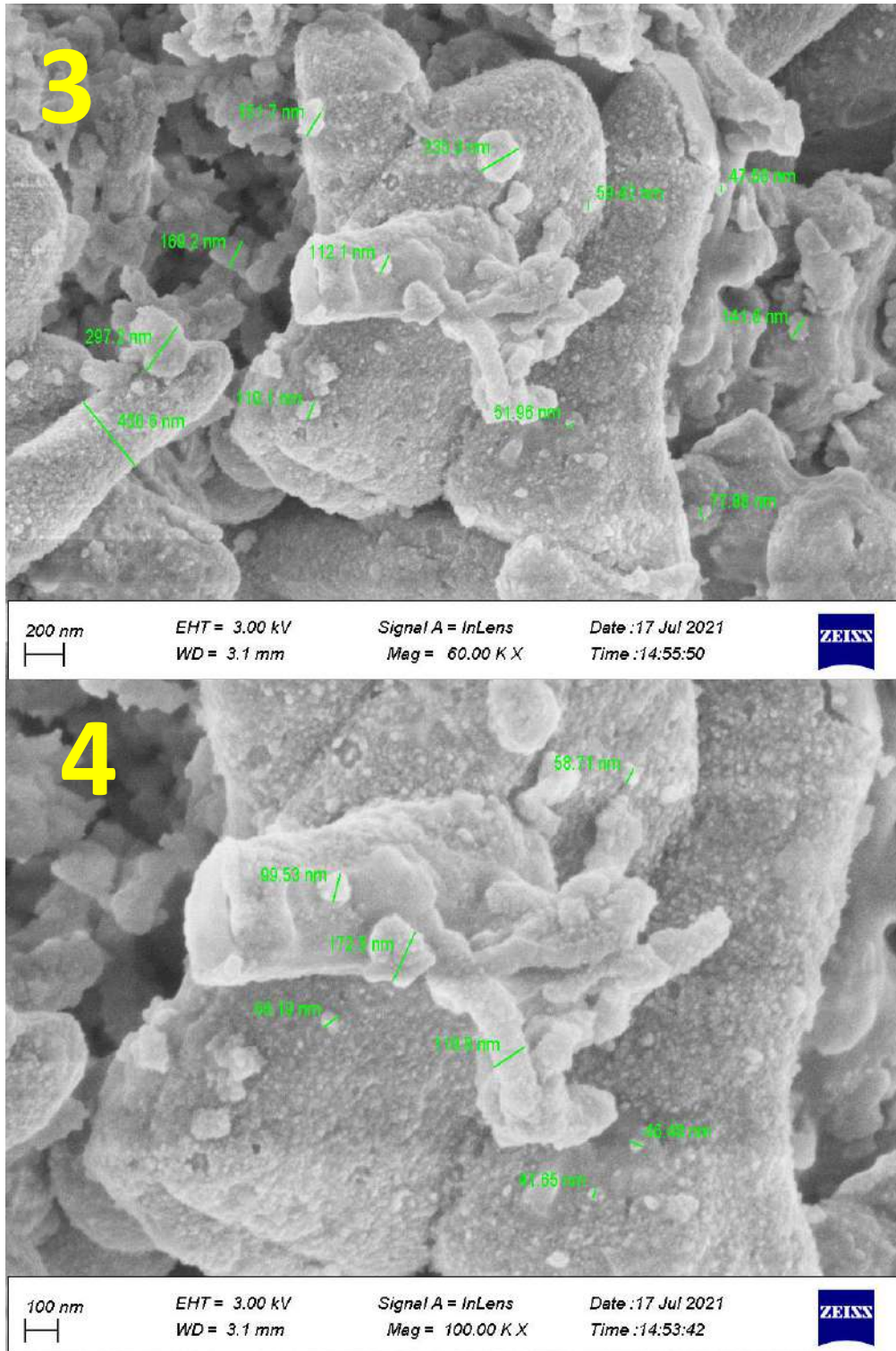
الشكل (4-18) يمثل قيم 2θ وكانت ابعاد الجسيمات $a(4.0857)$ و $b(4.0857)$ و $c(4.0857)$. كما يمكن الاستعانة بـ Refernce coid بالرقم 01-087-0717 للاطلاع على Peak list.

3-4-4 تحليل المجهر الالكتروني الماسح SEM

1-3-4-4 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaNps الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

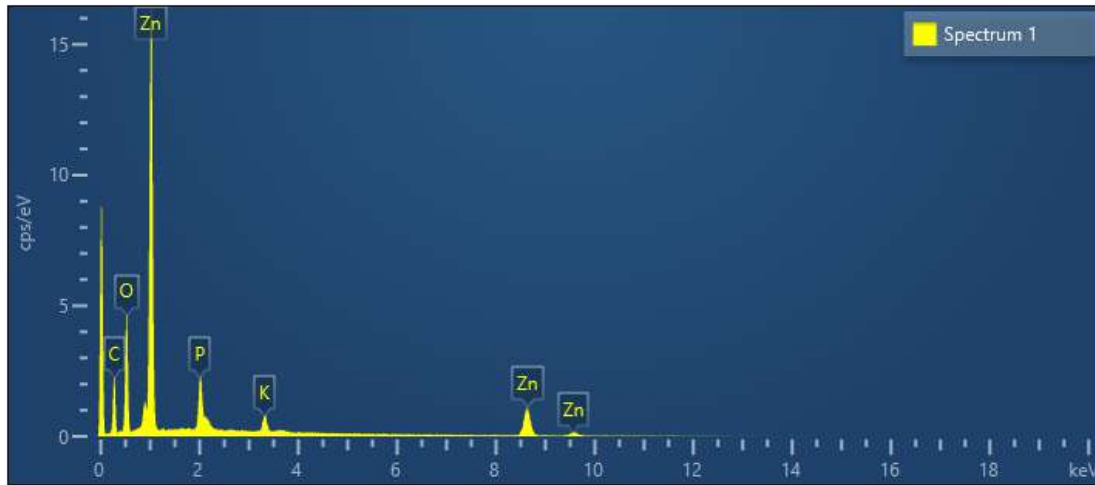
تم الكشف بواسطة المجهر الالكتروني الماسح SEM عن الشكل الظاهري السطحي لجسيمات اوكسيد الزنك النانوية المختلفة حيويًا من المستخلص الكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisoporus* الشكل (4-19-صورة 1) صورة غير واضحة المعالم إلا أنها تحتوي على بعض الأشكال الموشورية والإسطوانية بقوة تكبير بقوة (2) مايكرون ظهرت جسيمات الزنك النانوية محشورة بين طبقات المستخلص الكحولي لفطر المشروم كذلك تظهر اقطار بعض الجسيمات، الشكل (4-19-صورة 2) يوضح ان جسيمات الزنك النانوي واضحة ولكن غير منتظمة ومتعددة الاشكال إذا تنوعت الاشكال البلورية لهذه الجسيمات ما بين الهياكل المستطيلة والكروية والشعاعية والاسطوانية، حيث تختلف أحجامها الشكل (4-19-صورة 3) تظهر مجموعة ضيقة من بلورات اوكسيد الزنك النانوي وذات اقطار تتراوح 51.96، 77.88، 59.42 نانوميتر، الشكل (4-19-صورة 4) كبرت الصورة بمسافة (100) نانوميتر لتوضيح جسيمات الزنك النانوي، وتظهر جسيمات الزنك النانوي واضحة وذات اقطار (41.05، 46.48، 58.71، 66.19) نانوميتر.





الشكل (4-19) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة



الشكل (4-20) يوضح تكون مواد نانوية اخرى فضلاً عن اوكسيد الزنك النانوية من مستخلص المشروم الكحولي

الشكل (4-20) يبين القمم التي تكونت نتيجة تكون الجسيمات النانوية فضلاً عن تكون جسيمات الزنك النانوي، حيث يبين الجدول (4-7) ان أعلى قمة تكونت في جسيمات الزنك النانوي وقد تكررت أكثر من قمة الجسيمات الزنك النانوي كذلك وجود جسيمات نانوية لعناصر اخرى وهي كاربون واوكسجين والفسفور وبوتاسيوم.

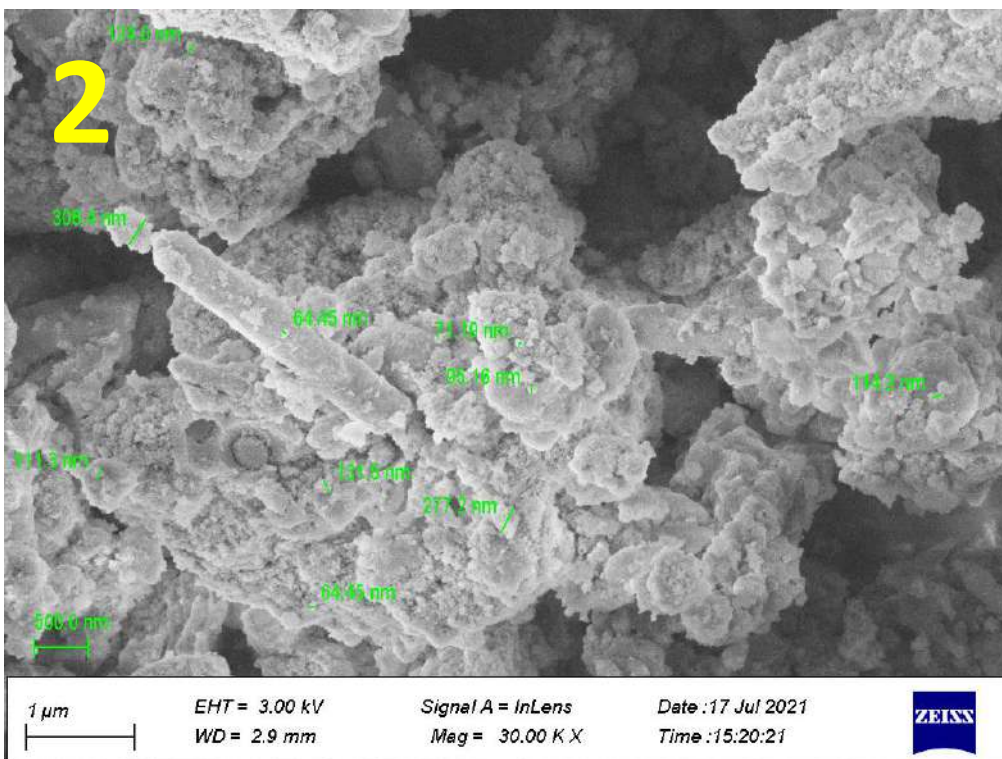
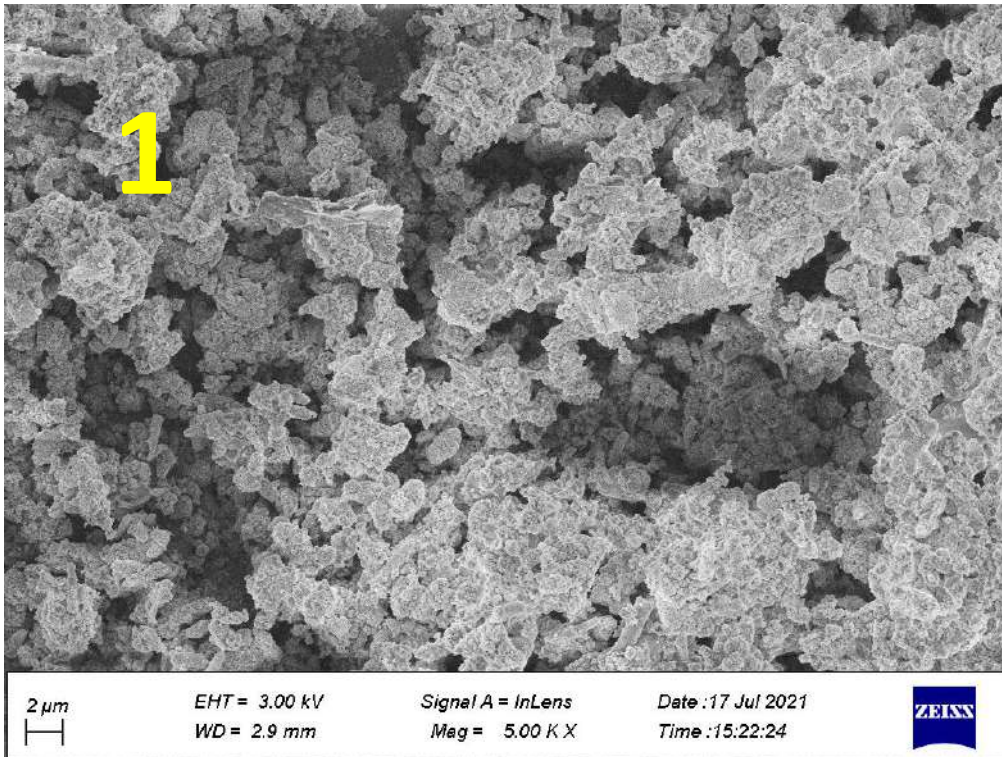
الجدول (4-7) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم الكحولي

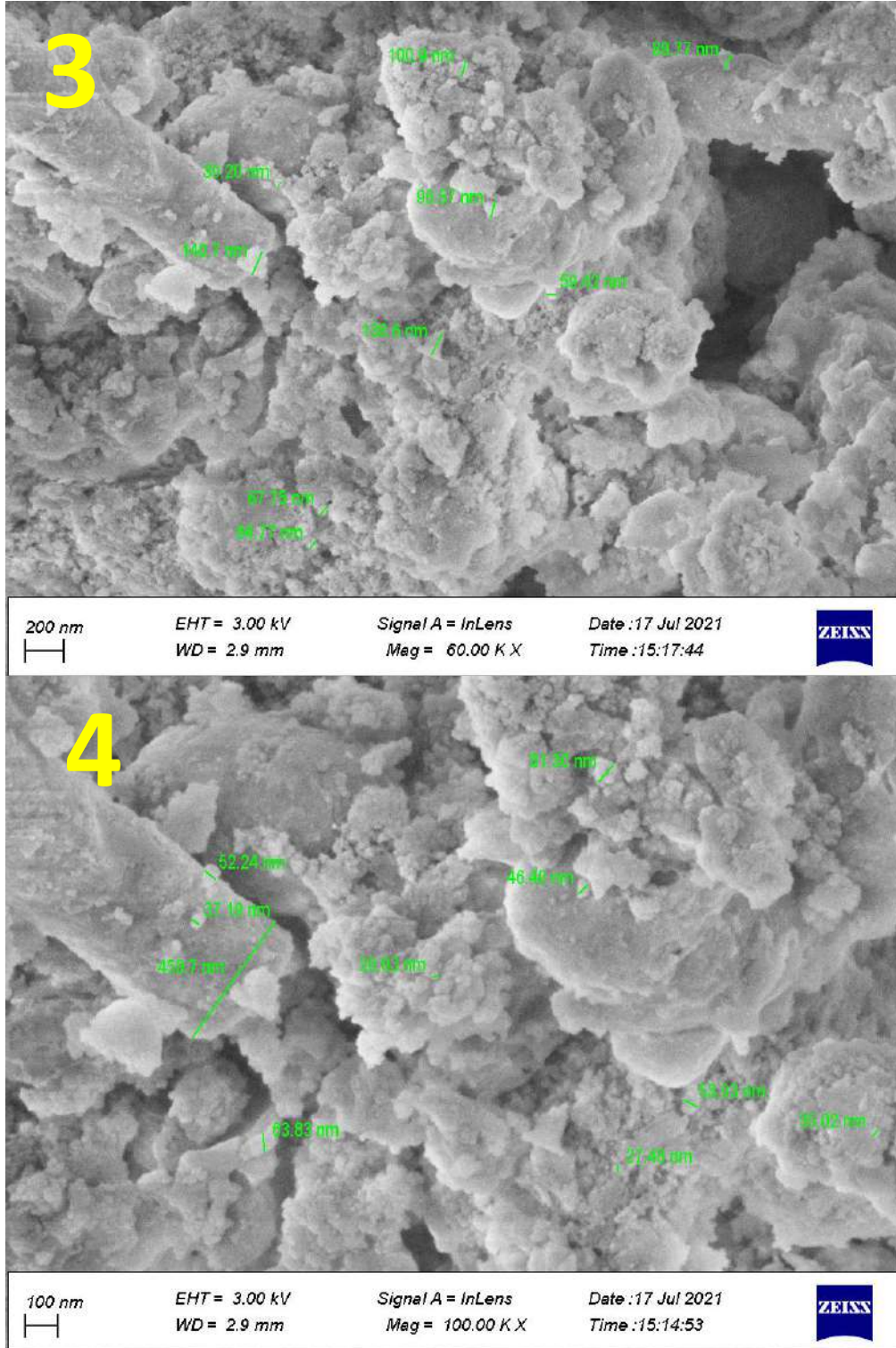
Spectrum 1				
Element	Line Type	Weight %	Weight % Sigma	Atomic
C	K series	31.43	0.52	54.42
O	K series	22.69	0.29	29.49
P	K series	3.32	0.08	2.23
Zn	K series	41.07	0.36	13.07
K	K series	1.48	0.05	0.79
Total	K series	100.00		100.00

الجدول (4-7) يبين أوزان المواد النانوية التي تكونت فضلاً عن جسيمات الزنك النانوي حيث وجد وزنه 41.07% أي أعلى نسبة مقارنة بباقي العناصر النانوية الأخرى (كاربون واوكسجين وفسفور وبوتاسيوم).

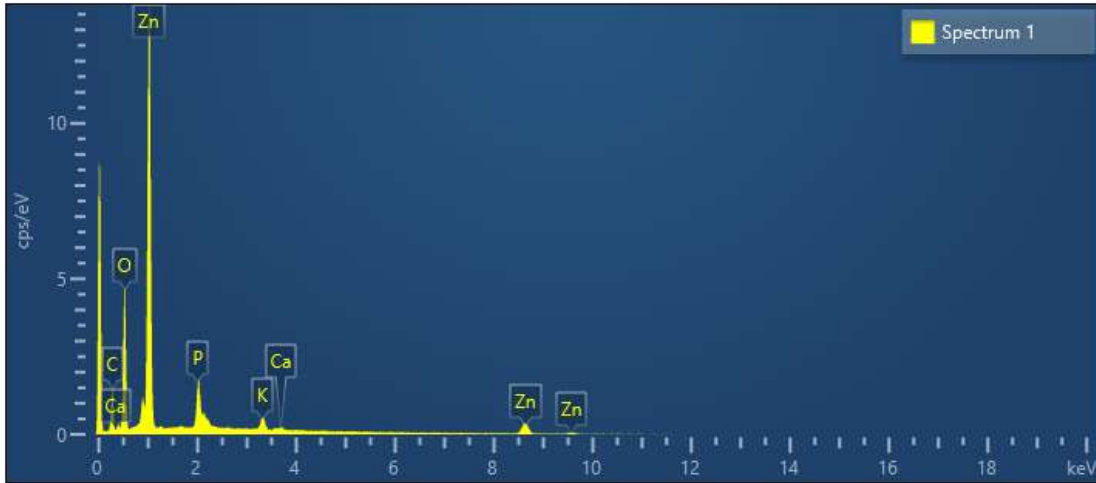
4-3-3-2 خصائص المركب النانوي اوكسيد الزنك ZnOaaNps الناتج من المستخلص المائي لفطر المشروم مع اوكسيد الزنك

يشير الشكل (4-21- صورة 1) صورة غير واضحة بشكل كبير ولكنها بينت تكون جسيمات نانوية باشكال موشورية واسطوانية بينت اقطار جسيمات الزنك النانوي المخلفة حيويًا من المستخلص المائي لفطر المشروم وهذه الاقطار تتراوح ما بين 140.2-39.20 نانوميتر، كما يلاحظ أن جسيمات الزنك النانوي محشورة بين طبقات المستخلص الكحولي لفطر المشروم، الشكل (4-21- صورة 2) تظهر الجسيمات الزنك النانوية واضحة ولكن غير منتظمة ومتعددة الأشكال مستطيلة وكروية واسطوانية، كما يبين اقطار الجسيمات الشكل (4-21- صورة 3) تظهر جسيمات الزنك النانوي واضحة كذلك اقطارها تظهر بخط ذو لون اخضر، الشكل (4-21- صورة 4) تظهر أعلى قوة تكبيلا لجسيمات الزنك النانوي، كما يلاحظ قطر بلورة موشورية 140.7 نانوميتر تعمل على سطحها جسيمات زنك نانوية كروية الشكل ذات اقطار 39.20 نانوميتر .





الشكل (4-21) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لأكسيد الزنك من المستخلص المائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة



الشكل (4-22) يوضح تكون مواد نانوية اخرى فضلاً عن اوكسيد الزنك النانوية من مستخلص المشروم المائي

الشكل (4-22) يبين القمم التي تكونت نتيجة تكون جسيمات الزنك النانوي التي تظهر باكثر من قمة موزعة ونلاحظ تكون قمم لعناصر اخرى وهي أوكسجين وكاربون وفسفور وبوتاسيوم وكالسيوم.

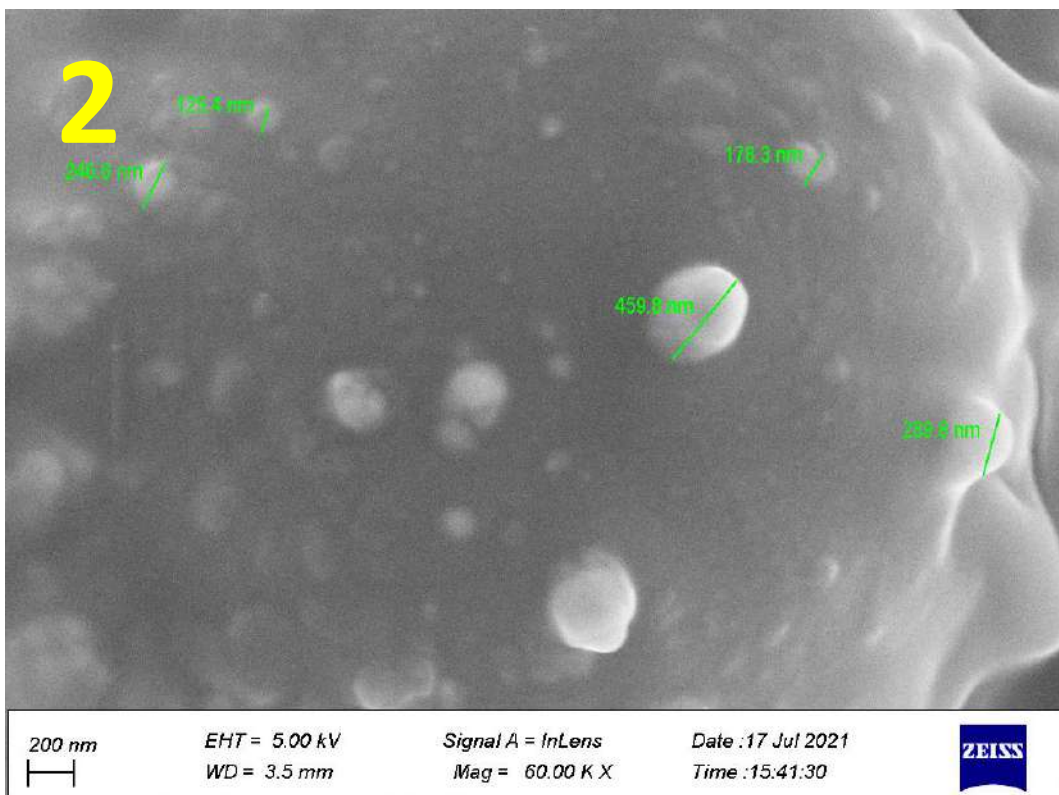
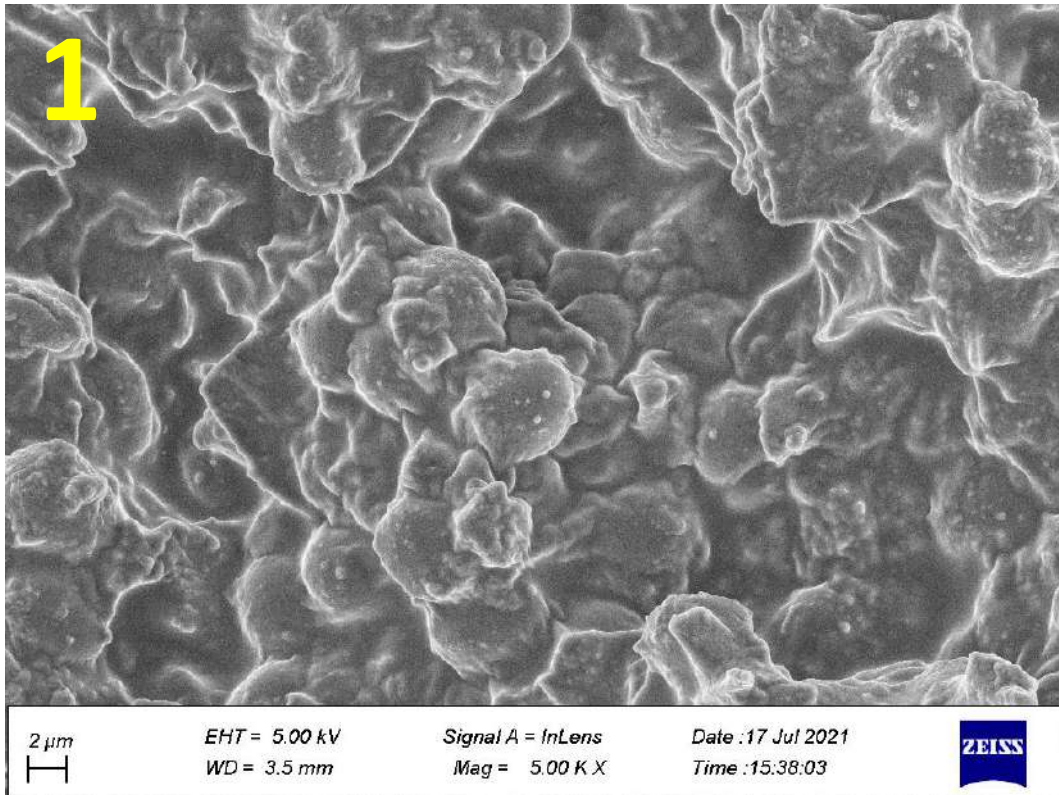
الجدول (4-8) يبين الأوزان التي تم الحصول عليها من المستخلص المائي لفطر المشروم اثناء عملية التخليق الحيوي لجسيمات الزنك النانوية ومقارنته مع بقية العناصر الأخرى التي تكونت اثناء عملية التخليق الحيوي، حيث كان وزن الزنك النانوي 43.28% وهي الأكبر مقارنة مع بقية العناصر .

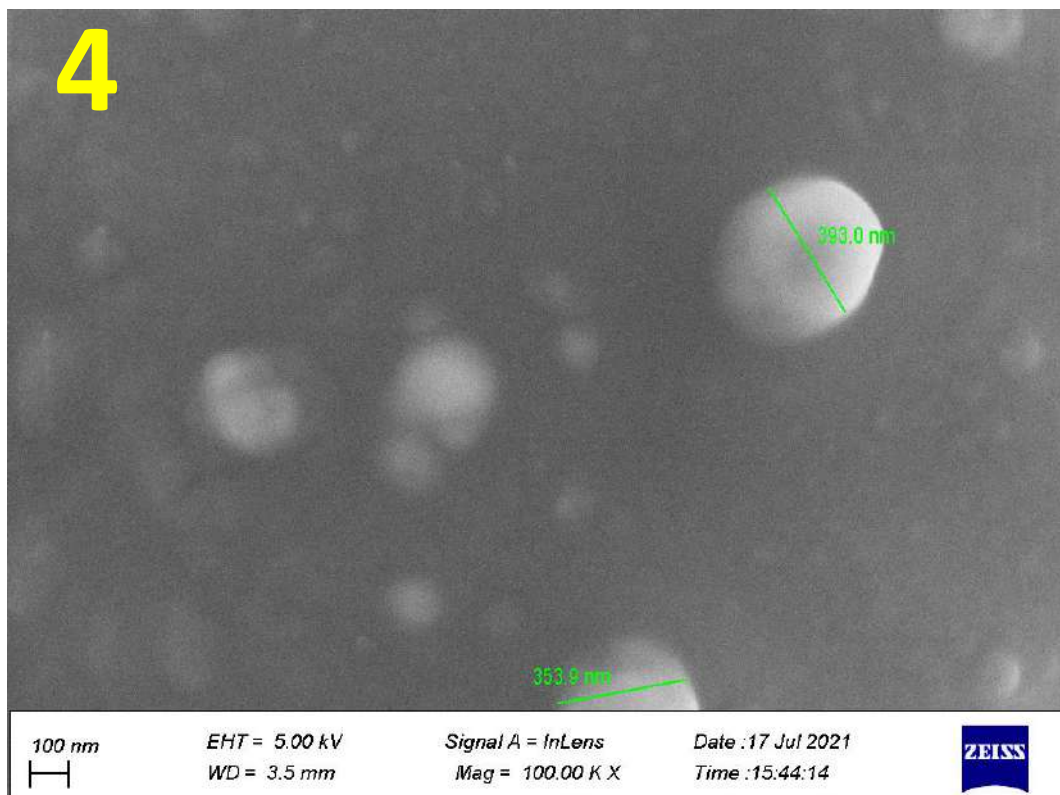
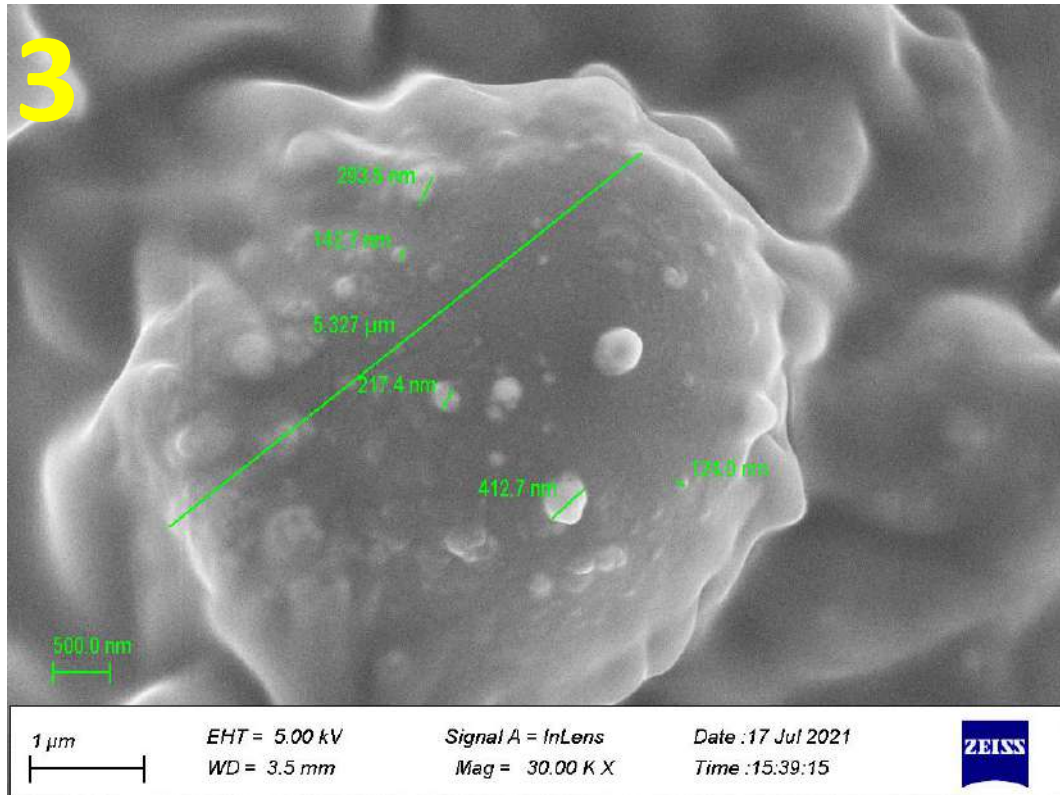
الجدول (4-8) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم المائي

Spectrum 1				
Element	Line Type	Weight %	Weight % Sigma	Atomic
C	K series	25.68	0.61	46.54
O	K series	26.53	0.35	36.10
P	K series	3.02	0.09	2.12
K	K series	1.20	0.06	0.67
Zn	K series	43.28	0.42	14.41
Ca	K series	0.28	0.05	0.15
Total		100.00		100.00

4-4-3-3 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgaNps الناتج من المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع نترات الفضة

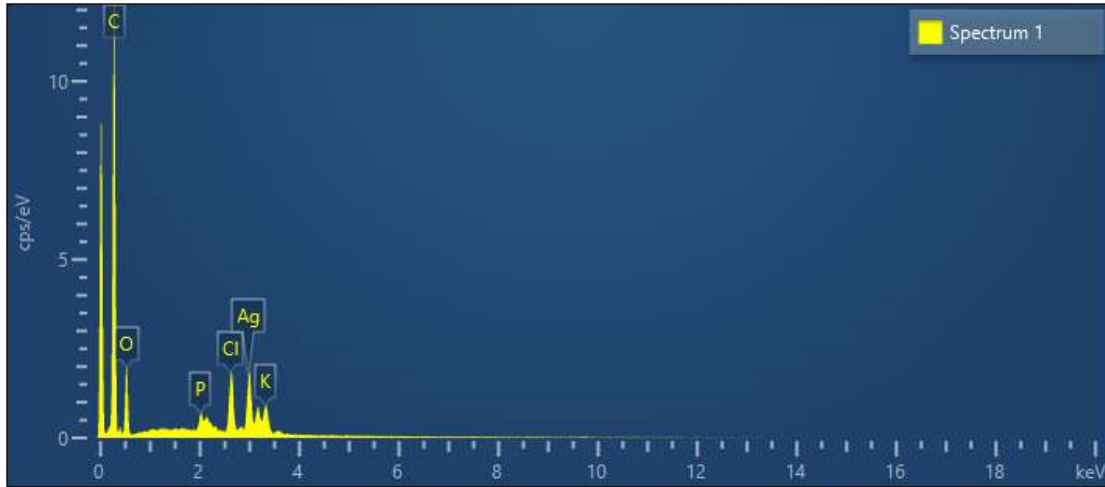
المجهر الالكتروني الماسح SEM هو تقنية أخرى تستخدم للكشف عن المركبات النانوية الخضراء كذلك شكلها وحجمها وتوزيعها ضمن المواد الطبيعية المصنعة منها الشكل (4- 23 - صورة 1) مخطط عام لا تظهر تفاصيل واضحة لجسيمات الفضة النانوية وتم تكبير الصورة واصبحت المسافة 2مايكرون تظهر الفضة النانوية بشكل أكثر وضوحاً، الشكل (4- 23 - صورة 2) تظهر جسيمات الفضة مع المستخلص الكحولي لفطر المشروم فتظهر بشكل جسيمات كروية الشكل وتكون جسيمات الفضة متجانسة نسبياً وتتوزع فوق المستخلص الكحولي المتبقي لفطر المشروم (Verma. 2018) تبين جزيئة المستخلص الكحولي لفطر المشروم حاملة على سطحها الفضة النانوية ذات ابعاد تتراوح (124.0، 142.7، 217.4، 293.5، 412.7) نانومتر، الشكل (4- 23 - صورة 3) فتظهر جسيمات الفضة بالشكل الكروي الواضح مع زيادة قوة التكبير للمجهر الالكتروني الماسح SEM، الشكل (4- 23 - صورة 4) كبرت الصورة بمسافة 100 نانوميتر لتظهر جسيمات الفضة النانوية بشكل مفرد، وتظهر جسيمات الفضة واضحة ذات قطر يظهر بلون اخضر وتم قياس جسيميتين 393، 353.9 نانوميتر.





الشكل (4-23) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص الكحولي لفطر المشروم

Agaricus bisporus وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة



الشكل (4-24) يوضح تكون مواد نانوية اخرى فضلاً عن الفضة النانوية من مستخلص المشروم الكحولي

الشكل (4-24) يبين القمم التي تكونت نتيجة تكون جسيمات الفضة النانوي التي تظهر باكثر من قمة موزعة ونلاحظ تكون قمم لعناصر أخرى وهي أوكسجين وكاربون وفسفور وبوتاسيوم وكالسيوم.

يبين الجدول (4-9) تكون جسيمات الفضة النانوية فضلاً عن جسيمات عناصر اخرى وهي (الكاربون، الاوكسجين، البوتاسيوم، الفسفور)، وقد بين الجدول (4-9) العناصر النانوية لمعادن اخرى غير الفضة النانوية المتكونة من المستخلص الكحولي لفطر المشروم والنسب المئوية للوزن ويلاحظ تكون جسيمات الفضة النانوية بوزن 9.29%، كذلك أوزان كل من (كاربون، والاوكسجين، والكلور، والبوتاسيوم، والفسفور).

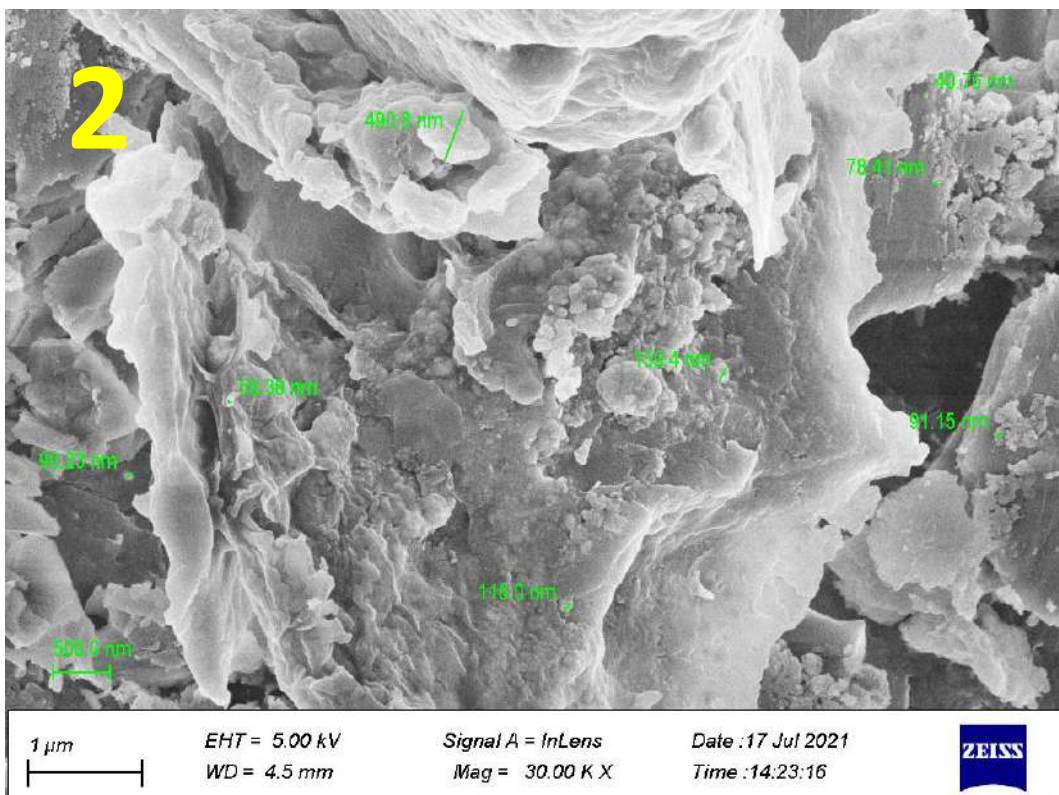
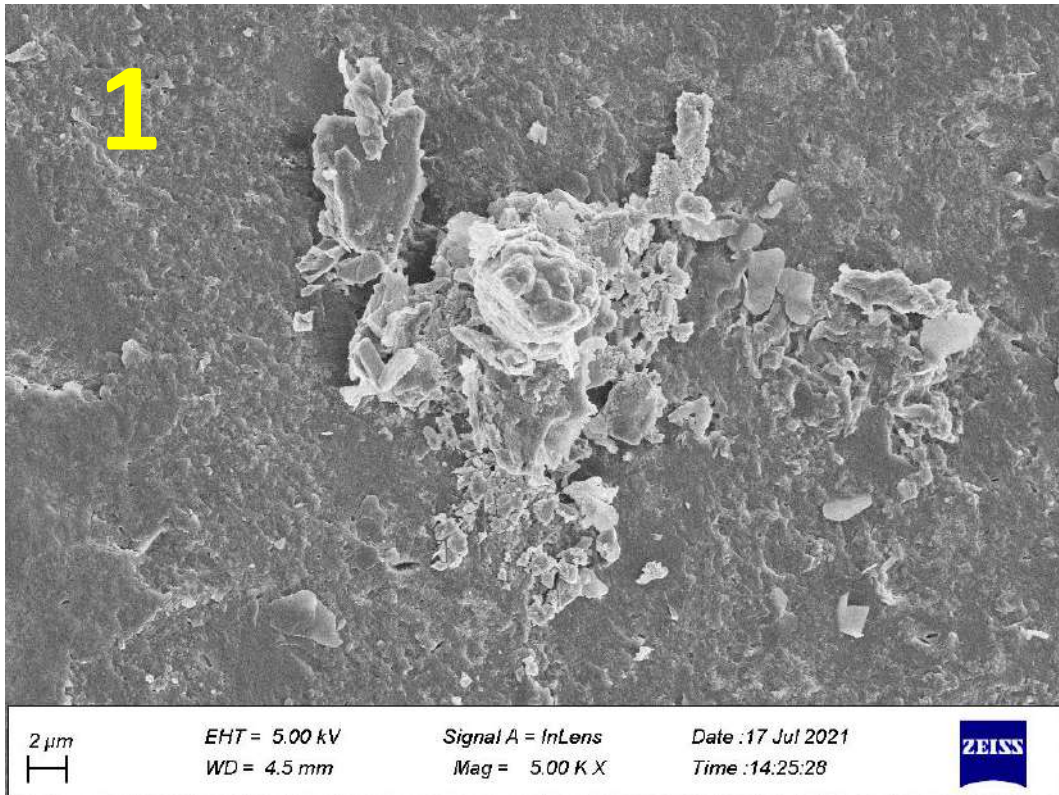
الجدول (4-9) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم الكحولي

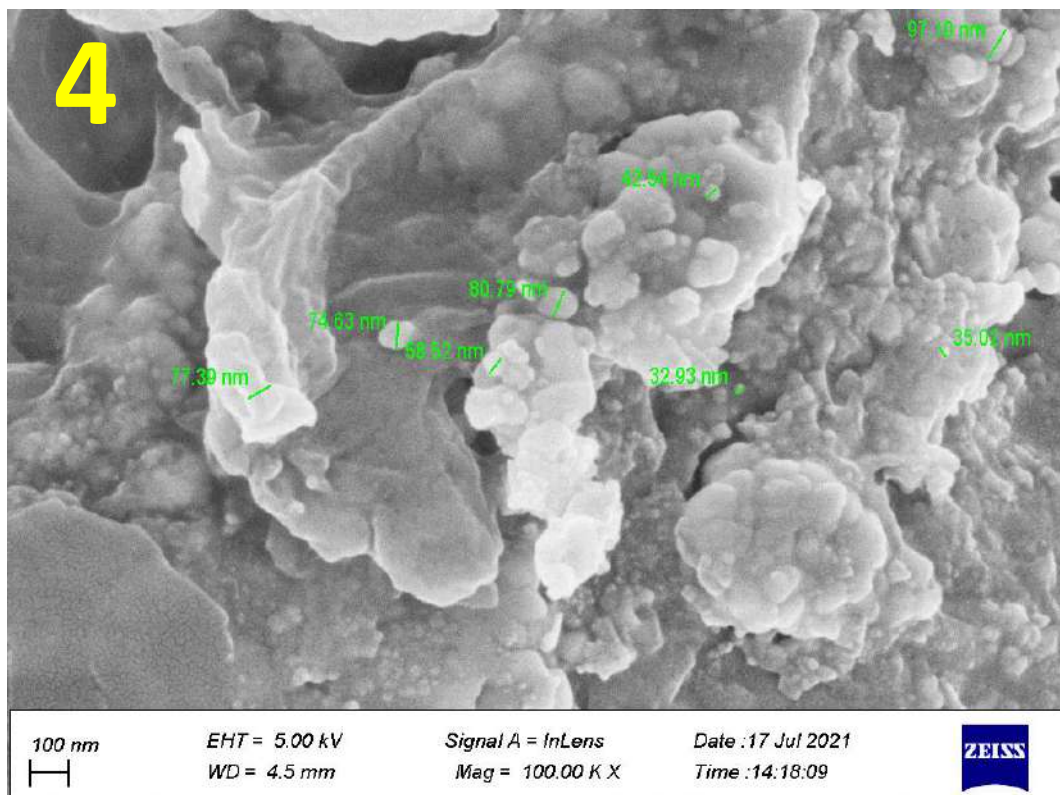
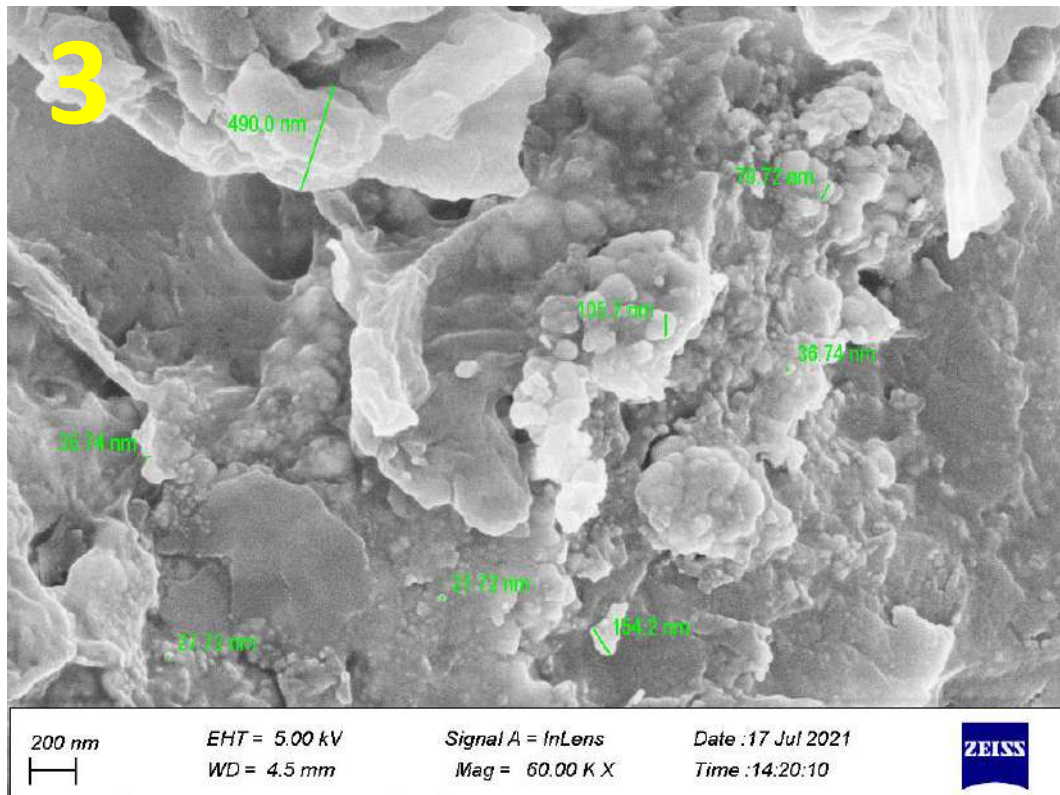
Spectrum 1				
Element	Line Type	Weight %	Weight % Sigma	Atomic
C	K series	69.49	0.36	82.28
O	K series	16.41	0.32	14.59
Cl	K series	2.77	0.06	1.11
K	K series	1.50	0.06	0.54
Ag	K series	9.29	0.18	1.23
P	K series	0.54	0.04	0.25
Total		100.00		100.00

4-3-4-4 خصائص المركب النانوي لنترات الفضة AgawNps الناتج من المستخلص

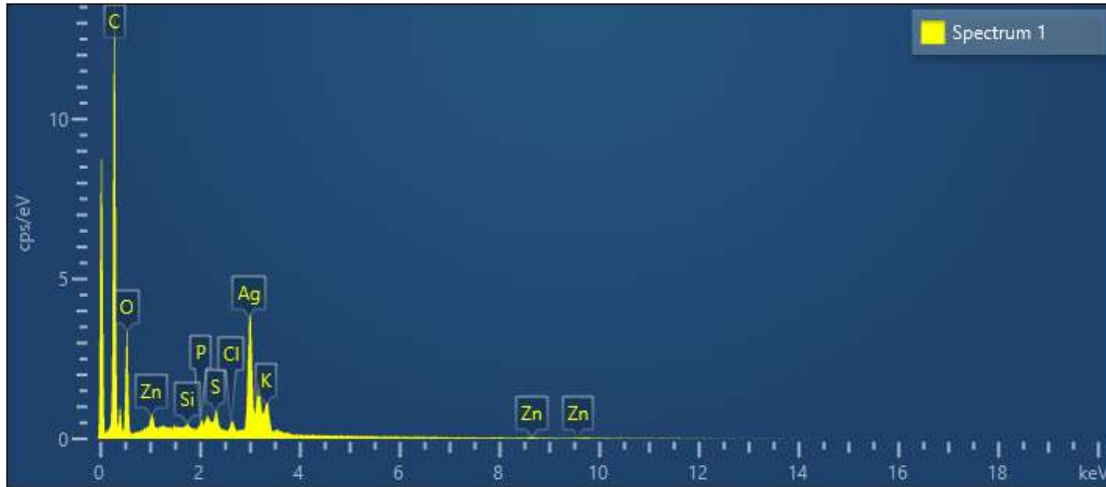
المائي لفطر المشروم مع نترات الفضة

الشكل (4- 25- صورة 1) مقطع عام غير واضح المعالم بالنسبة لجسيمات الفضة النانوية بقوة تكبير 2 مايكرون ، تظهر الفضة النانوية على شكل زهرة، الشكل (4- 25- صورة 2) كبرت الصورة بمسافة 1 مايكرون وتظهر اقطار جسيمات الفضة النانوية حيث تتفاوت اقطارها ما بين 40.76-116 نانوميتر وما بينها تختلف اقطار هذه الجسيمات كما يلاحظ وجود بقايا المستخلص الكحولي لفطر المشروم. الشكل (4- 25- صورة 3) زادت قوة التكبير 200 نانوميتر حيث ظهرت جسيمات الفضة النانوية بشكل كروي وتكون متراسة. الشكل (4- 25- صورة 4) ظهرت جسيمات الفضة النانوية بأعلى قوة تكبير ، حيث ان اقطار جسيمات نترات الفضة النانوية ما بين (20-55) نانوميتر 27.72، 36.74، 54.2 نانو ميتر.





الشكل (4-25) تحليل SEM لتحضير المركب النانوي لنترات الفضة من المستخلص المائي لفضر المشروم *Agaricus bisporus* وتشير الصور من 1-12 إلى قوة تأثير مختلفة



الشكل (4-26) يوضح تكون مواد نانوية أخرى فضلاً عن الفضة النانوية من مستخلص المشروم المائي

الشكل (4-26) يبين القسم التي تكونت نتيجة تكون جسيمات نترات الفضة النانوية من المستخلص الكحولي لفطر المشروم من خلال فحص المجهر الإلكتروني كما يبين قمم بعض العناصر الأخرى التي تكونت بصورة نانوية وهذه العناصر كاربون واوكسجين والكلور والبوتاسيوم الفسفور والكبريت وسيليكون وزنك .

الجدول (4-10) يبين العناصر النانوية الأخرى بالنسبة المئوية المتكونة من مستخلص فطر المشروم المائي

Spectrum 1				
Element	Line Type	Weight %	Weight % Sigma	Atomic
C	K series	57.87	0.36	75.10
O	K series	21.51	0.31	20.96
Zn	L series	1.06	0.08	0.25
Ag	L series	16.69	0.20	2.41
K	K series	1.32	0.06	0.52
S	K series	0.80	0.04	0.39
Si	K series	0.12	0.02	0.07
P	K series	0.34	0.04	0.17
Cl	K series	0.29	0.03	0.13
Total		100.00		100.00

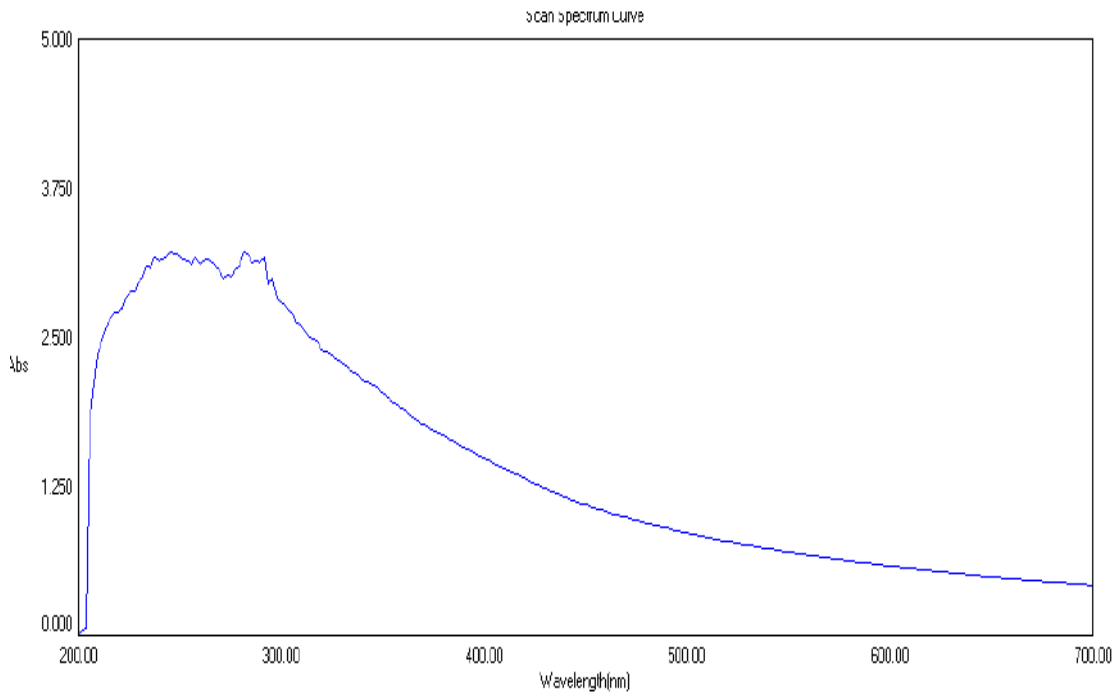
الجدول (4-10) يبين أوزان العناصر النانوية الأخرى التي تكونت بالإضافة لنترات الفضة النانوية من المستخلص الكحولي لفطر المشروم. وهذه العناصر تترتب حسب الجدول من أعلى وزناً إلى أقل وزناً يلاحظ أن الفضة النانوية ذات وزن 16.69% كما لوحظ وزن الزنك النانوي بوزن 1.06% .

4-5 بواسطة جهاز مقياس الأشعة فوق البنفسجية UVL

4-5-1 خصائص المركب النانوي لجسيمات نترات الفضة AgaNps الناتجة من

المستخلص الكحولي لفطر المشروم مع نترات الفضة

درس استقرار جزيئات نترات الفضة النانوية في السائل الغروي بواسطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية UV-Vis Spectrophotometer. (Krishmarj *et al.* 2010)، أثبت الفحص بالمطياف أن ذروة الامتصاص عند مدى بطول موجي 282 نانومتر، وهذه النتيجة تشير إلى التخليق العضوي الناجح لجسيمات نترات الفضة بواسطة المستخلص الكحولي لفطر المشروم. حيث ظهرت القمة بالطول 282 نانومتر ومدى امتصاص 0.4 خط الطول بين (400- 200) نانومتر (Ponarulselvam *et al.*, 2011)



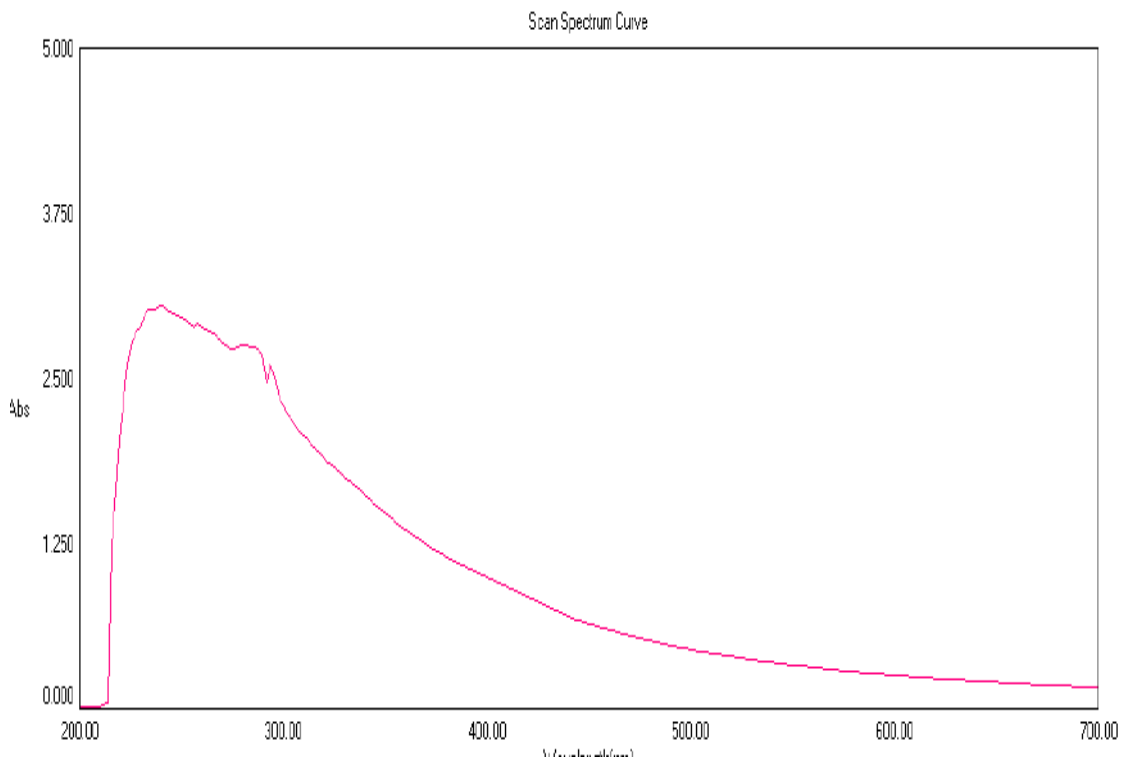
الشكل (4-27) منحنى الطيف لجسيمات نترات الفضة النانوية AgaNps بواسطة جهاز المطياف الأشعة

فوق البنفسجية UV-VIS Spectrophotometer

4-5-2 خصائص المركب النانوي لجسيمات نترات الفضة AgawNps الناتجة من المستخلص المائي لفطر المشروم مع نترات الفضة

درس استقرار جزيئات نترات الفضة النانوية في السائل الغروي بواسطة جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer UV-VIS. (Narayanan Skthivel. 2011)

الشكل (4-28) يوضح رسم الطيف المرئي للأشعة فوق البنفسجية كجسيمات نترات الفضة النانوية المخلفة بواسطة المستخلص المائي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* اثبت الفحص بالمطياف أن ذروة الامتصاص عند مدى 0.15 بطول موجي 240 نانومتر وهذه النتيجة تشير إلى التخليق الحيوي الناجح لجسيمات نترات الفضة بواسطة المستخلص المائي لفطر المشروم، حيث ظهرت القمة بالطول 240 نانومتر مدى امتصاص 0.15 خط الطول بين (410-200) (Bijanzadeh.et al., 2012) ، والشكل (4-28) منحني الطيف المرئي لجسيمات نترات الفضة .



الشكل (4-28) منحني الطيف المرئي لجسيمات نترات الفضة AgawNps بواسطة جهاز مطيافية الأشعة فوق البنفسجية Spectrophotometer UV-VIS

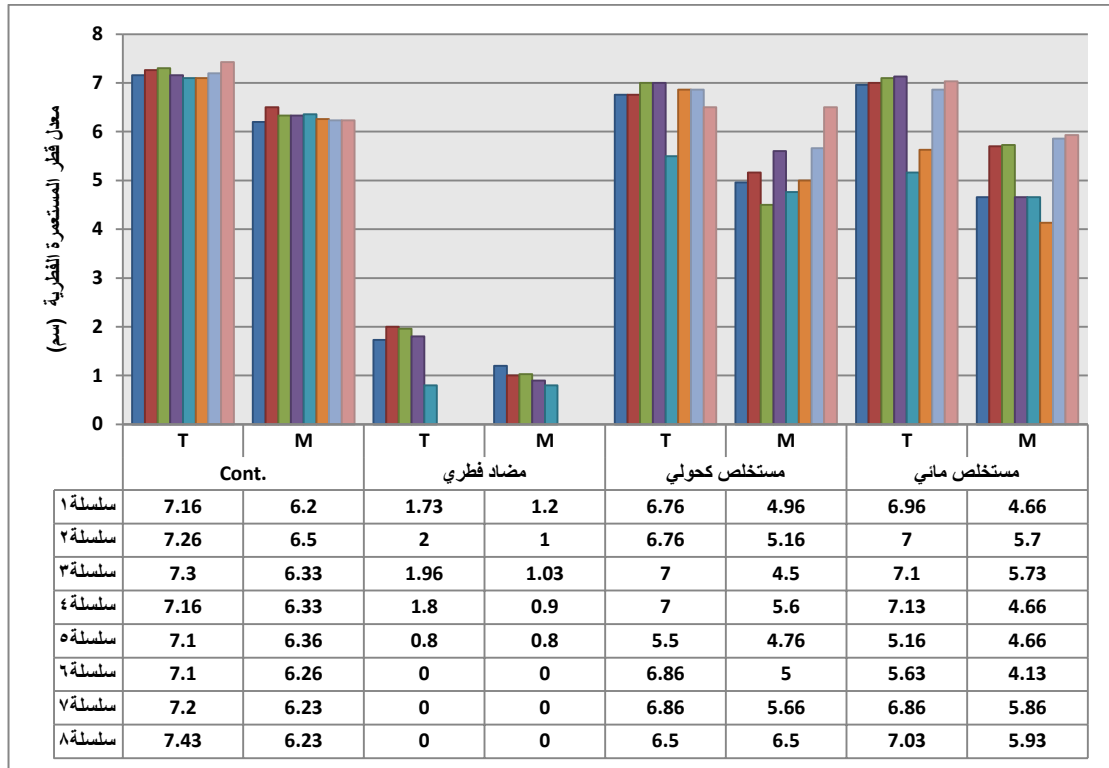
6-4 تقييم المركبات النانوية المحضرة في نمو الفطرين

Microsporium Canis و *Trichophyton rubrum*

4-6-1- تقييم المركبات النانوية المحضرة في معدل قطر المستعمرات الفطرية

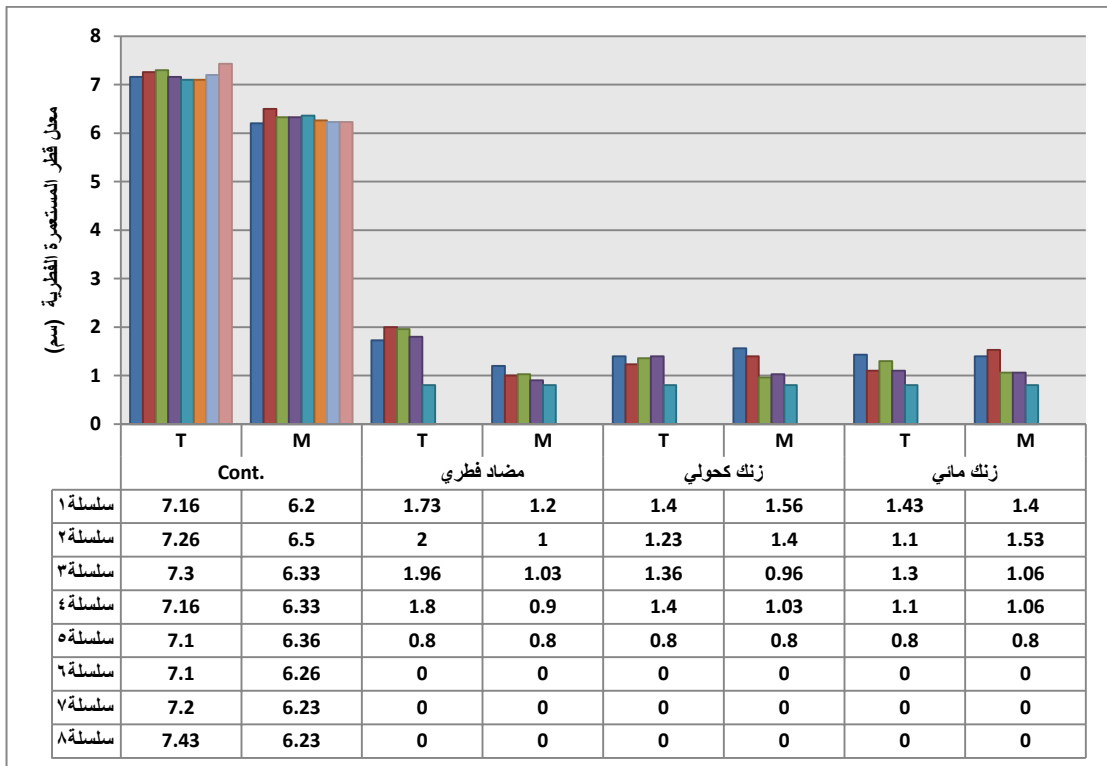
هناك اهتمام متزايد بالموارد الطبيعية غير العضوية لأنها توفر تنوعاً طبيعياً إذ تعد جسيمات النانو المعدنية من أهم العوامل الحيوية والطبية مثل الزنك والذهب والفضة والكربون والتيتانيوم والحديد والبلاديوم والنحاس التي تستعمل في الغالب لتخليق هذه الجسيمات لذا يتم تطوير عمليات تخليق وإنتاج لهذه الجسيمات بطرائق صديقة للبيئة من خلال النهج البايولوجية (Reeda, et al., 2021; Reeda, 2021)، إذ تعد اقل كلفة واقل سمية من الطرائق الأخرى الكيميائية والفيزيائية (Vadlapudi & Kaladhar. 2014)، أدى الاستعمال المفرط والمتكرر للمضادات الحيوية الكلاسيكية إلى خفض قدرتها أمام الأمراض المعدية واسعة الانتشار وأصبح من الضروري القيام بتدخلات طبية جديدة لتقادي هذه الحالة ان المضادات الحيوية لم تعد فعالة في السيطرة على الأمراض المعدية (Yassin, 2020)، لذا قد يخلق قلقاً وتحدياً في قطاع الرعاية الصحية (Laxminaraya et al., 2013)، لذا فأن تطوير أنظمة جديدة مضادة للجراثيم حيث تعد جسيمات النانو مهمة في العديد من المجالات ولاسيما الطبية (Yassin & Mohammed, 2020b).

فطر المشروم *Agaricus bisoporus* من الفطريات القابلة للأكل edible mushrooms والتي تمتاز كونها ذات سمية قليلة وهي مادة غذائية، وسجلت لأول مرة في البنك الجيني العالمي النوع العراقي، واستخدمت كدواء (Safwat & al Khali 2006)، وقد جاءت اعظم التطورات في زراعة الفطر على الأوساط الزراعية المعدة خصيصاً لهذا الغرض (Chang & Miles 2004). يمتلك فطر المشروم بعض الخصائص العلاجية المعروفة في جميعها انحاء العالم كمضادات علاج السرطان، مضاد الأورام الدوائية، خفض الكوليسترول، محفز للمناعة، مضادات الميكروبات المضادة للالتهابات، مضادات الاكسدة (Sani, et al., 2021)، كما يعد من الاطعمة المفيدة في الوقاية من الأمراض مثل ارتفاع ضغط الدم .

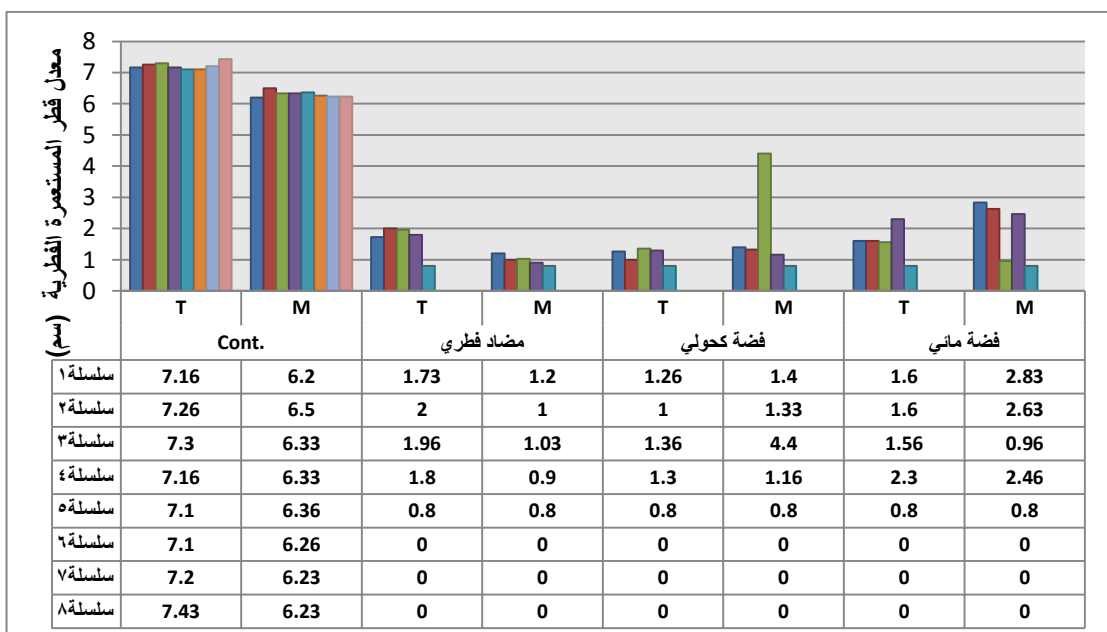


الشكل (4-29) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ولمدة 14 يوم.

أظهرت النتائج في الشكل (4-29، 30، 31) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص وتركيزه انخفاضاً في قطر المستعمرات الفطرية للفطرين مع زيادة تركيز AgaaNps، ZnoaaNps وكذلك المضاد الفطري Clotrimazole و AgawNps و ZnoawNps

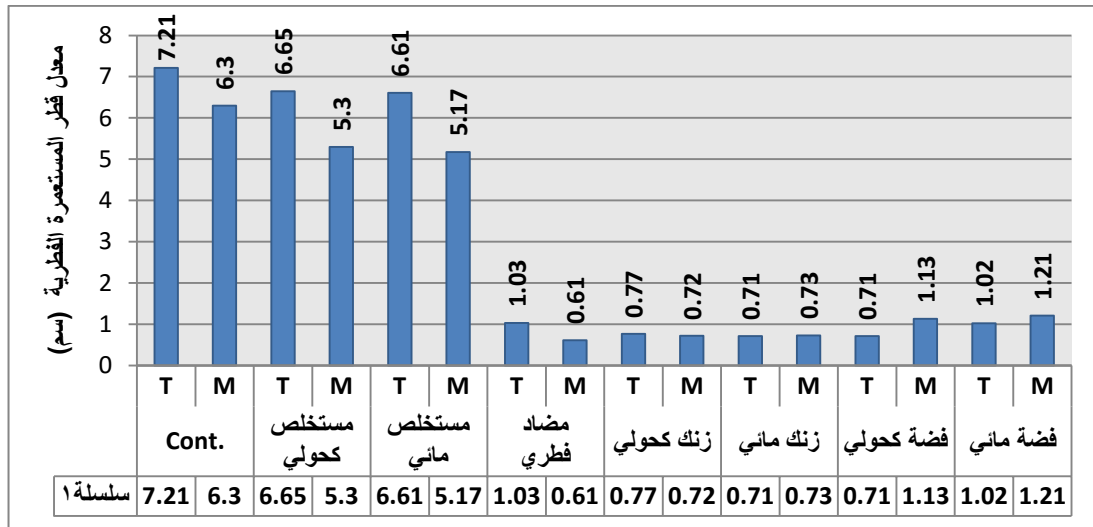


الشكل (4-30) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة 14 يوم.



الشكل (4-31) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة 14 يوم.

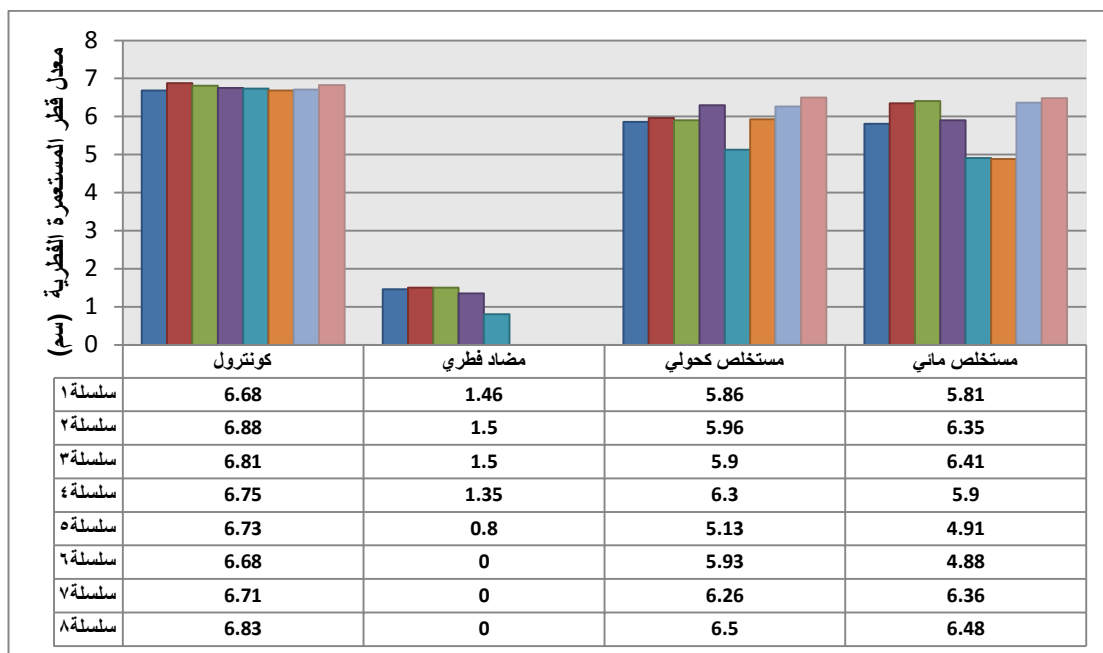
وان التركيز 50% من الـ AgawNps و ZnoaaNps و AgawNps و ZnoawNps و Clotrimazole انعدم فيه النمو الفطري لكلا الفطرين .



الشكل (4-32) التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع والمستخلص في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة 14 يوم.

أظهر الشكل (4-32) التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع المستخلص تأثيراً معنوياً في معدل قطر المستعمرات الفطرية وسجل ZnoawNps و ZnoaaNps على الفطر *Microsporium* (0.73, 0.72) واختلف عن AgawNps و AgawNpa (1.21, 1.13) على مستوى معنوي 0.01 و 0.05 كما أظهر Clotrimazole تأثيراً معنوياً بمعدل قطر 0.61 للفطر *Microsporium* وسجلت جميع المعاملات اختلافات معنوية عن عينة المقارنة control للفطرين.

النتائج التي ظهرت في الشكل (4-32) وجد هناك تقارب كبير في التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع المستخلص في معدل قطر المستعمرة، حيث وجد ان قيم السيطرة هي (7.21, 6.30) للفطرين *Trichophyton*, *Microsporium* على التوالي عبر الجدول نلاحظ ان نمو الفطر *Trichophyton* يتناقص تدريجياً باستخدام المستخلص مقارنةً مع السيطرة Clotrimazole حيث كانت القيم (6.65, 6.61, 5.17, 1.03, 0.77, 0.71, 0.73, 0.71) باستخدام مستخلص كحولي مستخلص مائي (AgawNps و ZnoaaNps و AgawNps و ZnoawNps و Clotrimazole) حيث نلاحظ نزول تدريجي ما عد AgawNps وكانت أعلى نسبة تأثير في ZnoawNps و AgawNps.

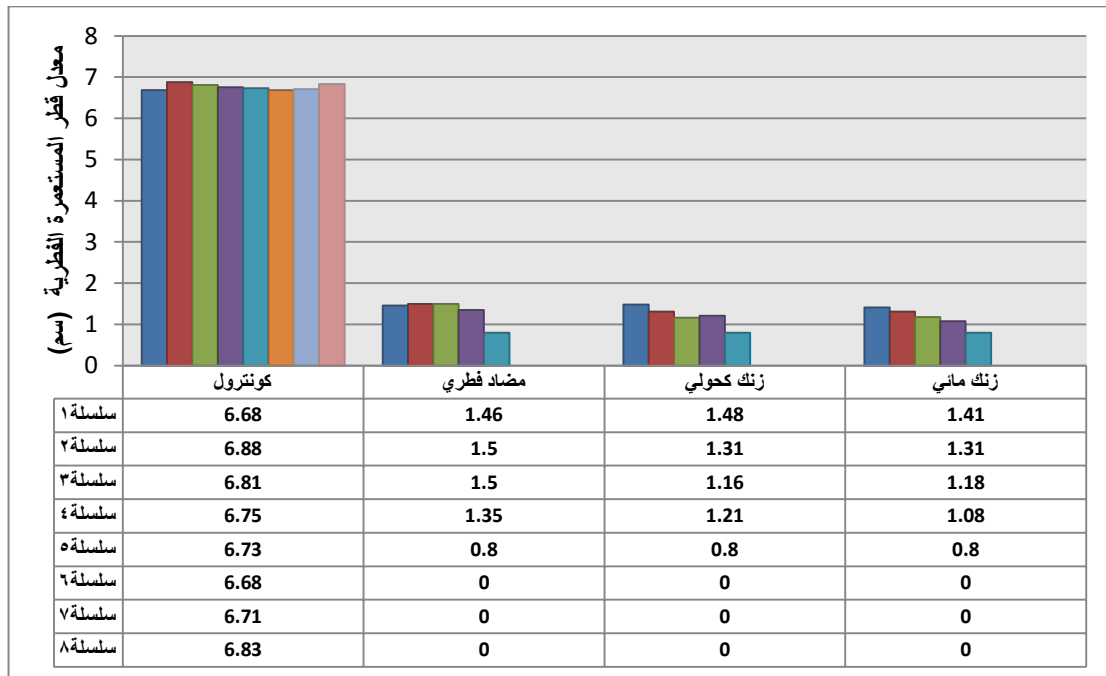


الشكل (4-33) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ \text{C}$ ولمدة 14 يوم.

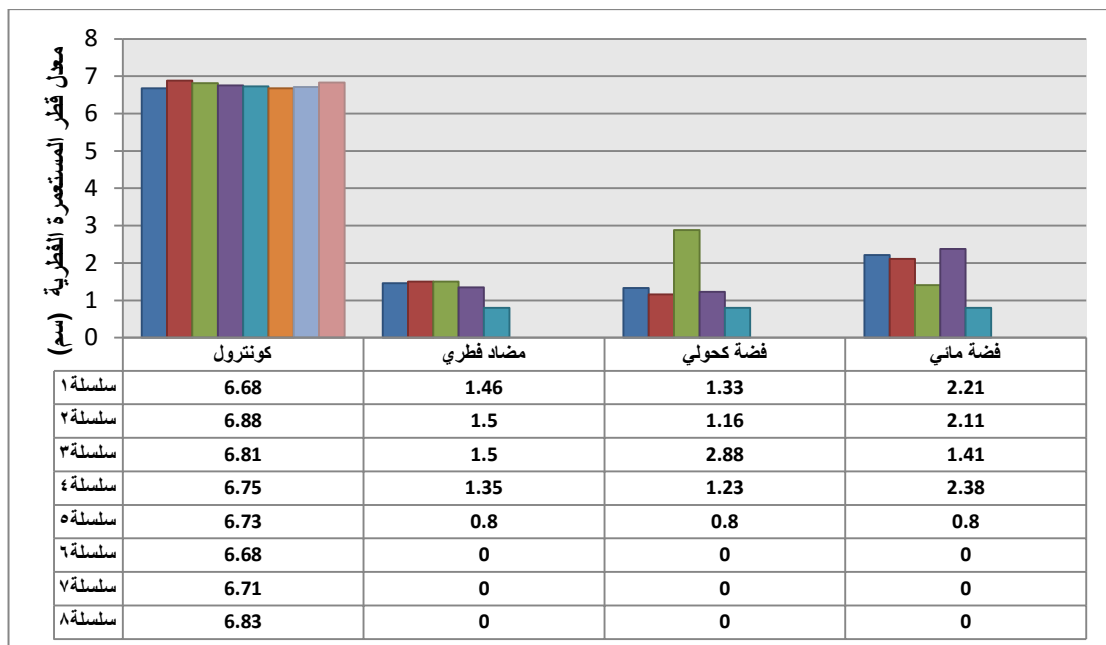
ان المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم لم يكن له تأثير معنوي على نمو قطر المستعمرات الفطرية للفطرين *T.rubrum* و *M.Canis* حيث لوحظ زيادة في نمو قطر المستعمرات يبدأ عند تركيز 60% ليقارب قطر المستعمرات الفطرية لمعاملة السيطرة .

تم تحضير مستخلص مائي ومستخلص كحولي من فطر *Agaricus bisporus* حيث اظهر المستخلص الكحولي فعالية في تثبيط الفطرين *Trichophyton* و *Microsporium* أعلى من المستخلص المائي، ولكن هذه الفعالية للمستخلصين الكحولي والمائي توقفت عند تركيز 40 ملغم/مل حيث قل معدل نمو اقطار المستعمرات كذلك أوزانها ولكن بعد ذلك لوحظ زيادة في النمو لكل من مستعمرات الفطرين *Trichophyton* و *Microsporium*. وزيادة في اقطار المستعمرات كذلك أوزانها موازياً بذلك لعينة السيطرة وبعد ذلك إلى ان فطر *Agaricus bisporus* هو فطر غذائي أو قابل للأكل كما أنه غني بالعناصر الغذائية كاربوهيدرات دهون الياف فيتامينات (Irazoqul, et al., 1997)، وعناصره (Macro and micro elements) (Owaid & Ibraheem 2017)، وتستخدم مستخلصات فطر *Agaricus bisporus* في إنتاج المركبات الثانوية لبعض العناصر المهمة كالفضة والزنك والنحاس وغيرها ، وتعتمد بصورة رئيسية على الأجسام الثمرية للفطر وهي طرق رخيصة وامنة (Owaid & Ibraheem 2017)، وتم استخدام الفطر البازيدي

الحصول في تثبيط نمو الفطرين الجلديين *M. Canis*, *T. rubrum* في *Marasmius Palmivorus* (Al-Masoodi, 2021).

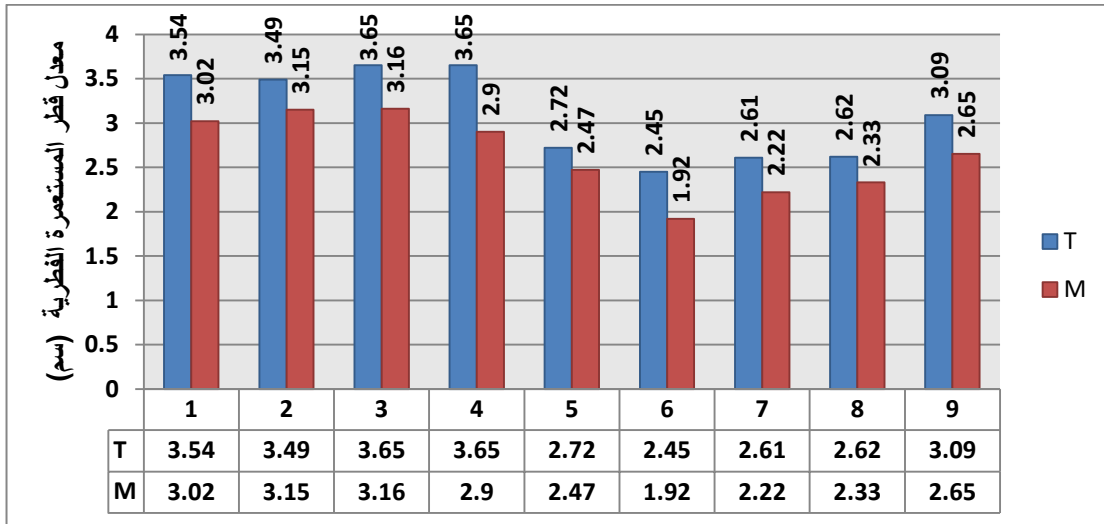


الشكل (4-34) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 °م ولمدة 14 يوم.



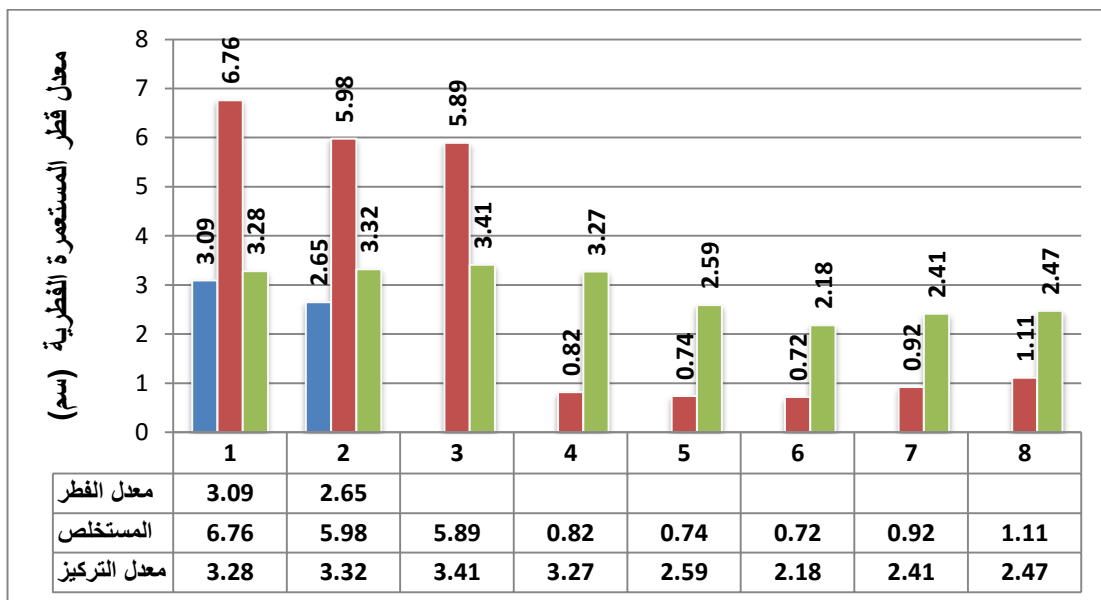
الشكل (4-35) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 °م ولمدة 14 يوم.

ويشير الشكل (4-30) إلى التداخل الثنائي بين نوع المستخلص وتركيزه وإن هنالك انخفاضا في قطر المستعمرات الفطرية مع زيادة تركيز كل من (AgawNps و ZnoaaNps و AgaaNps) و ZnoawNps (Clotrimazole) بتركيز 30% اعطى أقل قطراً للمستعمرات الفطرية 1.08 .



الشكل (4-36) التداخل الثنائي بين نوع الفطر وتركيز المستخلص في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم.

تشير النتائج التي ظهرت في الشكل (4-36) بين نوع الفطر وتركيزه إلى حصول انخفاض في معدل قطر المستعمرات الفطرية عند تركيز 50% لكل من الفطرين *Trichophyton* و *Microsporium* (1.90, 2.45) .



الشكل (4-37) تأثير كل من معدل الفطر، نوع المستخلص، تركيز المستخلص % في معدل قطر الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم.

يشير الشكل (4-37) إلى تأثير كل من العوامل المفردة الداخلة في التجربة حيث أظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين الفطرين في معدل قطر المستعمرة الفطرية في المستويين 0.01 و 0.05 في تثبيط قطر المستعمرات الفطرية والتي اختلفت معنوياً عن كل من المستخلص النانوي مع الفضة على مستوى معنوية 0.05 و 0.01. كما بين نفس الشكل بأن الملخص النانوي مع الزنك ZnOaaNps و ZnOawNps اعطت تأثيراً معنوياً على مستوى معنوي 0.1 و 0.05 في تثبيط قطر المستعمرات الفطرية والتي اختلفت معنوياً عن كل من المستخلص النانوي مع الفضة على مستوى معنوي 0.1 و 0.05 كما يبين نفس الشكل ان هناك انخفاضاً معنوياً للتركيز وعلى مستوى معنوية 0.05 و 0.01 مع زيادة تركيز المستخلص وخاصة عند تركيز 50%.

4-6-2 تقييم المركبات النانوية المحضرة في الصفات المظهرية والمجهريّة للفطرين

Trichophyton rubrum و *Microsporium Canis*



كونترول خلف



كونترول امام



كحولي 10% - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10% - خلف



مائي 10% - امام



كحولي 20% - خلف



كحولي 20% - امام



مائي 20% - خلف



مائي 20% - امام



كحولي 30% - خلف



كحولي 30% - امام



مائي 30% - خلف



مائي 30% - امام



كحولي 40% - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40% - خلف



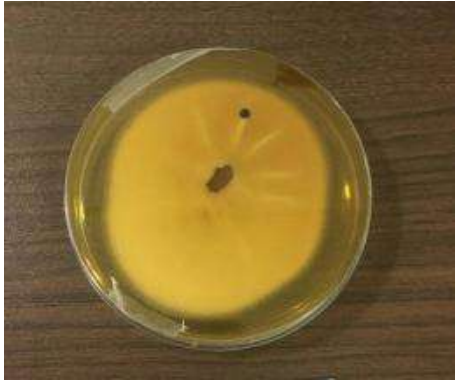
مائي 40% - امام



كحولي 50% - خلف



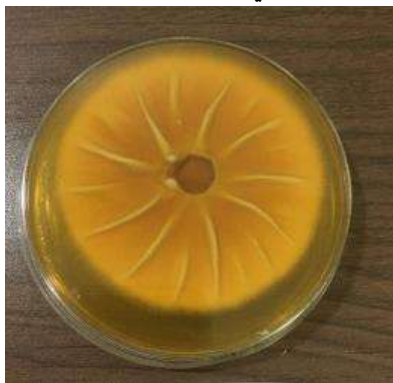
كحولي 50% - امام



مائي 50 % - خلف



مائي 50% - امام



كحولي 60 % - خلف



كحولي 60% - امام



مائي 60 % - خلف



مائي 60% - امام



كحولي 70 % - خلف



كحولي 70% - امام



مائي 70 % - خلف



مائي 70% - امام



كحولي 80 % - خلف



كحولي 80% - امام



مائي 80 % - خلف



مائي 80 % - امام

الشكل (4-38) تأثير مستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة على

معدل نمو المستعمرات فطر *Trichophyton* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م



مضاد فطري 10 % - خلف



مضاد فطري 10% - امام



مضاد فطري 20 % - خلف



مضاد فطري 20 % - امام



مضاد فطري 30 % - خلف



مضاد فطري 30% - امام



مضاد فطري 40 % - خلف



مضاد فطري 40 % - امام

الشكل (39-4) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر

Trichophyton على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م



كحولي 10 % - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10 % - خلف



مائي 10 % - امام



كحولي 20 % - خلف



كحولي 20% - امام



مائي 20 % - خلف



مائي 20 % - امام



كحولي 30 % - خلف



كحولي 30% - امام



مائي 30 % - خلف



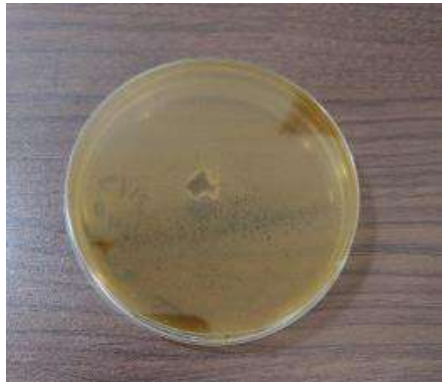
مائي 30 % - امام



كحولي 40 % - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40 % - خلف



مائي 40 % - امام

الشكل (4-4) تأثير الزنك الكحولي والمائي من مستخلص المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة

على معدل نمو المستعمرات فطر *Trichophyton* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 °م



كحولي 10 % - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10 % - خلف



مائي 10 % - امام



كحولي 20 % - خلف



كحولي 20% - امام



مائي 20 % - خلف



مائي 20 % - امام



كحولي 30 % - خلف



كحولي 30% - امام



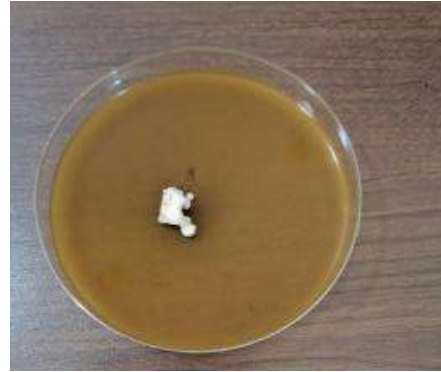
مائي 30 % - خلف



مائي 30 % - امام



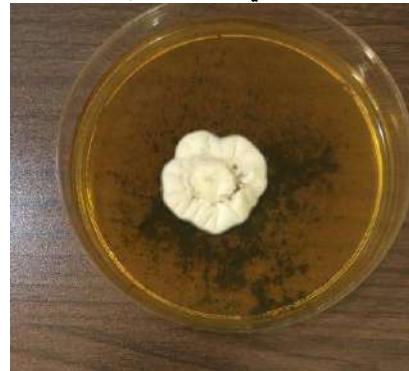
كحولي 40 % - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40 % - خلف



مائي 40 % - امام

الشكل (4-41) تأثير الفضة الكحولي والمائي من مستخلص المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة

على معدل نمو المستعمرات فطر *Trichophyton* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م



كونتروال - خلف



كونتروال - امام



كحولي 10% - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10% - خلف



مائي 10% - امام



كحولي 20% - خلف



كحولي 20% - امام



مائي 20% - خلف



مائي 20% - امام



كحولي 30 % - خلف



كحولي 30% - امام



مائي 30 % - خلف



مائي 30 % - امام



كحولي 40 % - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40 % - خلف



مائي 40 % - امام



كحولي 50 % - خلف



كحولي 50% - امام



مائي 50 % - خلف



مائي 50 % - امام



كحولي 60 % - خلف



كحولي 60% - امام



مائي 60 % - خلف



مائي 60 % - امام



كحولي 70 % - خلف



كحولي 70% - امام



مائي 70 % - خلف



مائي 70 % - امام



كحولي 80 % - خلف



كحولي 80% - امام



مائي 80 % - خلف



مائي 80 % - امام

الشكل (4-42) تأثير مستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة على

معدل نمو المستعمرات فطر *Microsporium* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 ° م



مضاد فطري 10 % - خلف



مضاد فطري 10% - امام



مضاد فطري 20 % - خلف



مضاد فطري 20 % - امام



مضاد فطري 30 % - خلف



مضاد فطري 30 % - امام



مضاد فطري 40 % - خلف



مضاد فطري 40 % - امام

الشكل (43-4) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر

Microsporium على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25° م



كحولي 10% - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10% - خلف



مائي 10% - امام



كحولي 20% - خلف



كحولي 20% - امام



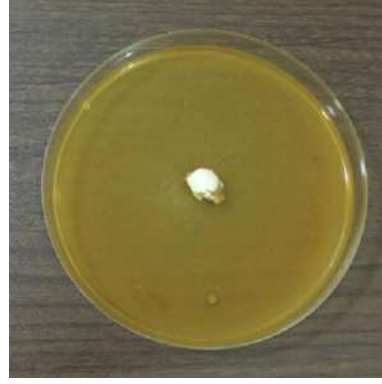
مائي 20% - خلف



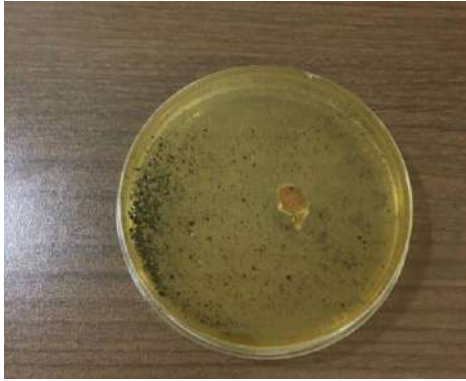
مائي 20% - امام



كحولي 30 % - خلف



كحولي 30% - امام



مائي 30 % - خلف



مائي 30 % - امام



كحولي 40 % - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40 % - خلف



مائي 40 % - امام

الشكل (4-4) تأثير الزنك الكحولي والمائي من مستخلص المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة

على معدل نمو المستعمرات فطر *Microsporium* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 °م



كحولي 10 % - خلف



كحولي 10% - امام



مائي 10 % - خلف



مائي 10 % - امام



كحولي 20 % - خلف



كحولي 20% - امام



مائي 20 % - خلف



مائي 20 % - امام



كحولي 30 % - خلف



كحولي 30% - امام



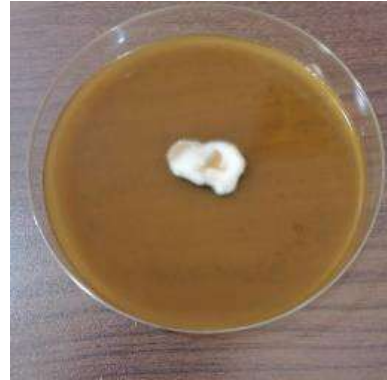
مائي 30 % - خلف



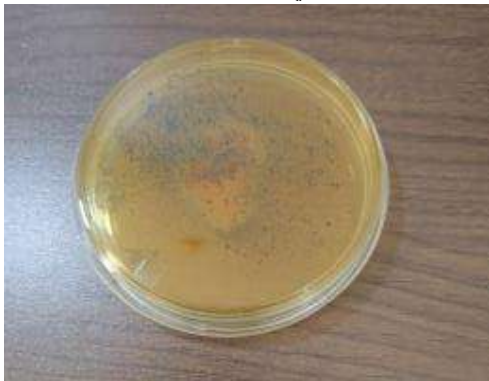
مائي 30 % - امام



كحولي 40 % - خلف



كحولي 40% - امام



مائي 40 % - خلف



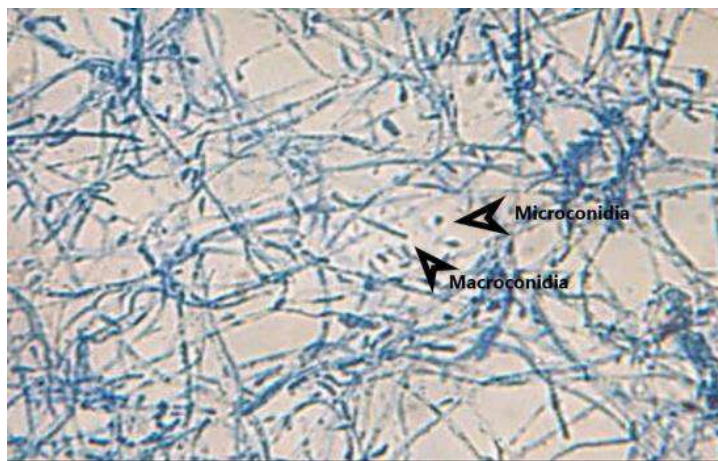
مائي 40 % - امام

الشكل (4-45) تأثير الفضة الكحولي والمائي من مستخلص المشروم *Agaricus bisporus* بتركيز مختلفة على معدل نمو المستعمرات فطر *Microsporium* على وسط SDA وبعمر 14 يوم وبدرجة حرارة 25 °م

3-6-4 تقييم المركبات النانوية المحضرة في الصفات والمجهرية للفطرين

Microsporium Canis و *Trichophyton rubrum*

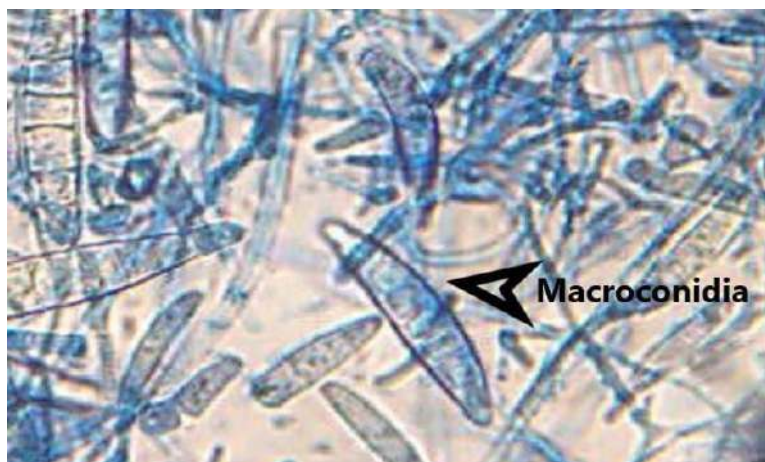
يبين الشكل (4-46) الصفات المظهرية والمجهرية للفطرين في حالة الControl ، تظهر المستعمرات الفطرية بيض اللون من الجهة الأمامية أما الجهة الخلفية المائلة إلى الاصفرار في كلا الفطرين.

فطر *T. rubrum*

يشير السهم:

.Microconidia -a

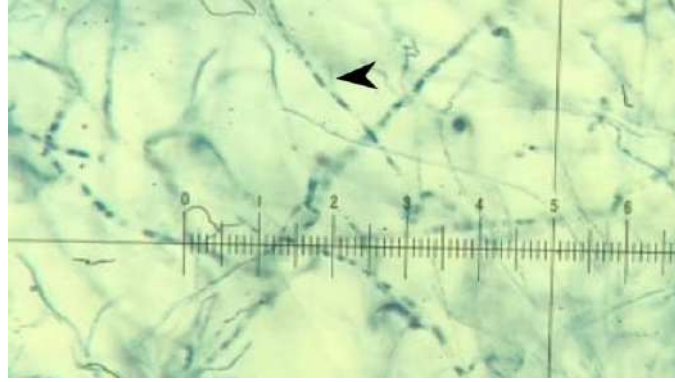
.Macroconidia -b

فطر *M. Canis*

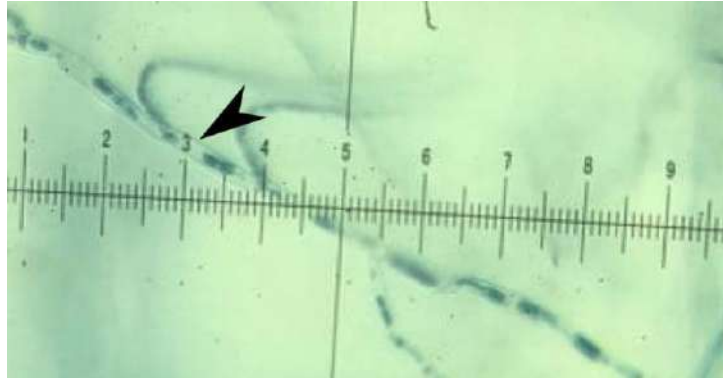
يشير السهم: .Macroconidia

أما من الناحية المجهرية فتظهر العزول الفطرية بالحالة الاعتيادية وتحتوي على

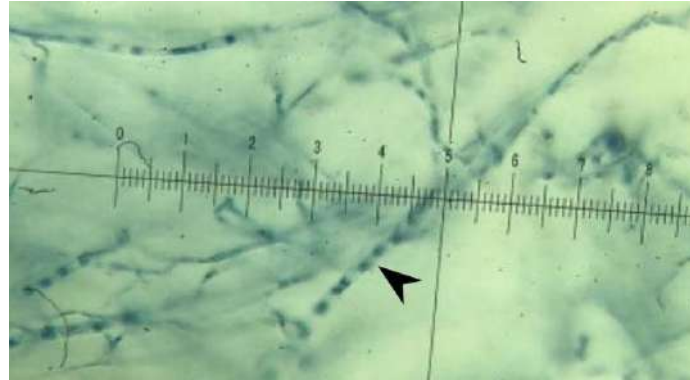
تقسيمات واضحة مع كونيدات صغيرة وكبيرة لكلا الفطرين *T. rubrum* و *M. Canis* .



10% مستخلص كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى انفصال الغشاء البلازمي وتجمع البروتوبلازم



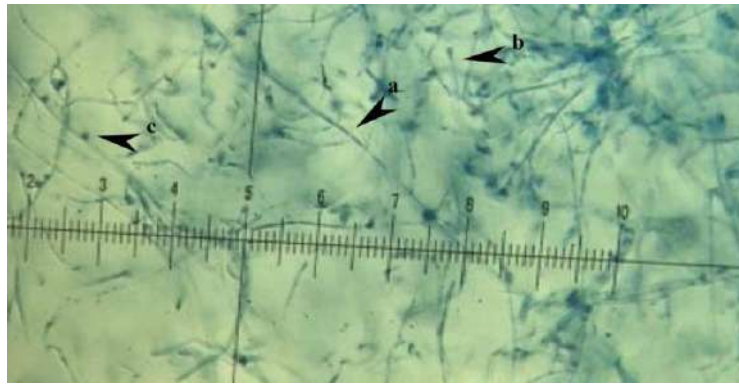
10 % مستخلص كحولي *M. Canis* يشير السهم إلى حصول تجمع البروتوبلازم وانفصال جدار الخلية ، كذلك اختفاء الكونيديات



20% مستخلص كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى انفصال الغشاء البلازمي وتجمع البروتوبلازم



20% مستخلص كحولي *M. Canis* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية

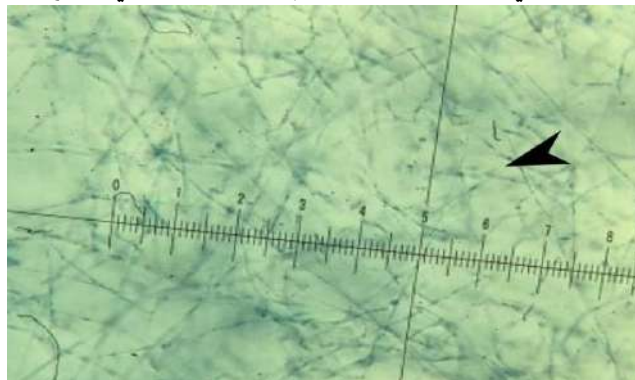


T. rubrum 30% مستخلص كحولي

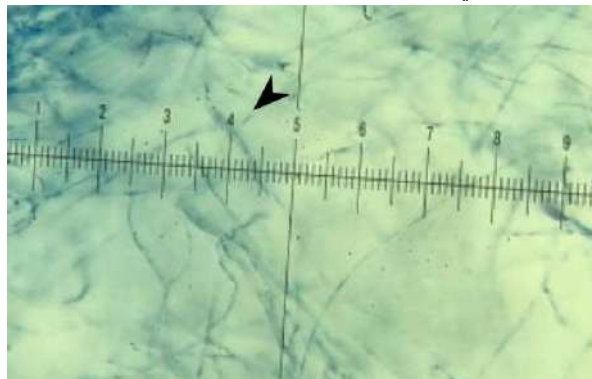
a = انفصال الغشاء البلازمي . b = تشوه الكونيديات الكبيرة c = قلة عدد الكونيديات الصغيرة



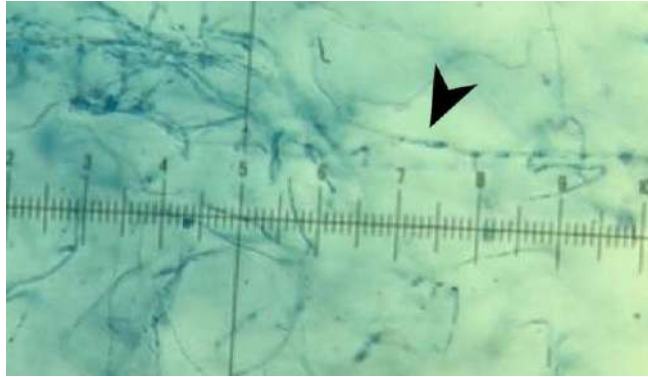
30% مستخلص كحولي *M. Canis* يشير السهم إلى الغشاء البلازمي وتجمع البروتوبلازم



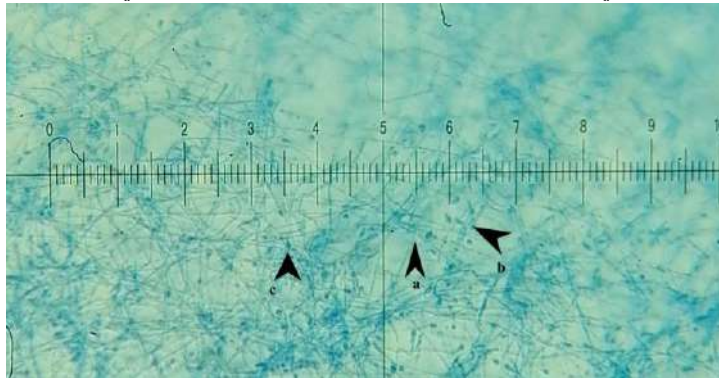
10% مستخلص كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية



10% مستخلص مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية

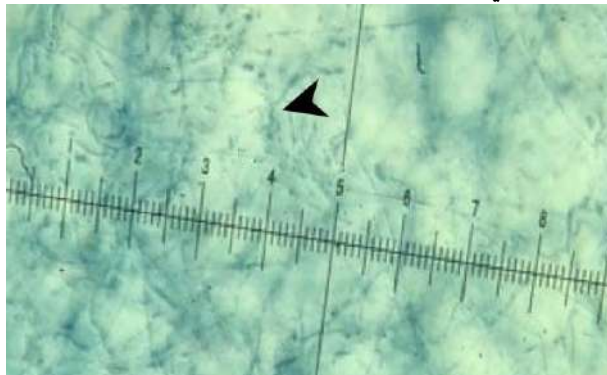


20% مستخلص مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى انفصال الغشاء البلازمي وتجمع البروتوبلازم

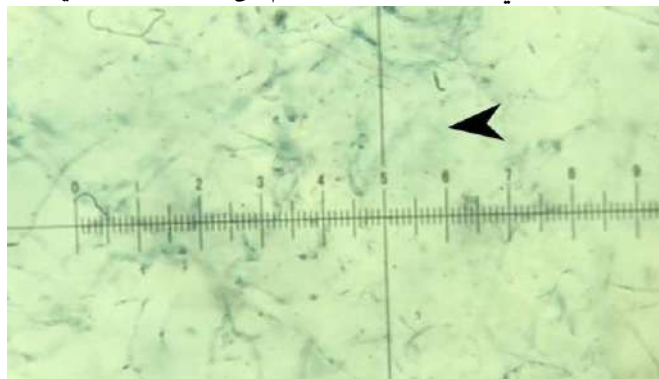


30% مستخلص مائي *T. rubrum*

a = انفصال الغشاء البلازمي b = تشوه الكونيديات الكبيرة c = قلة عدد الكونيديات الصغيرة



40% مستخلص مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى تحلل الغزول الفطرية بالكامل



60% مستخلص مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت الغزول الفطرية وتحللها بالكامل

الشكل (4-46) تأثير المستخلصات الكحولية والمائية لفطر المشروم *Agaricus bisporus* على الشكل المجهرى للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium Canis* بعد تصبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X

في الشكل (4-46) تظهر المستعمرات الفطرية عند المعاملة بالمستخلص الكحولي لفطر المشروم. وإن المستعمرات الفطرية من الناحية المظهرية غطت الطبقة تقريباً ولا توجد اختلافات مظهرية نذكر مقارنة بال Control. إلا أن الفحص المجهرى لفطر *T.rubrum* اظهر تجمع البروتوبلازم نتيجة: a. انفصال الغشاء البلازمي . b. تشوه الكونيدات الكبيرة. c. قلة عدد الكونيدات الصغيرة ثم موت وتحلل الغزول الفطرية مع زيادة تركيز المستخلص الكحولي. أما الفحص المجهرى لفطر *M.Canis* أظهر إلى حصول تجمع البروتوبلازم وانفصال جدار الخلية كذلك اختفاء الكونيدات ثم موت وتحلل الغزول الفطرية وذلك بزيادة التركيز.

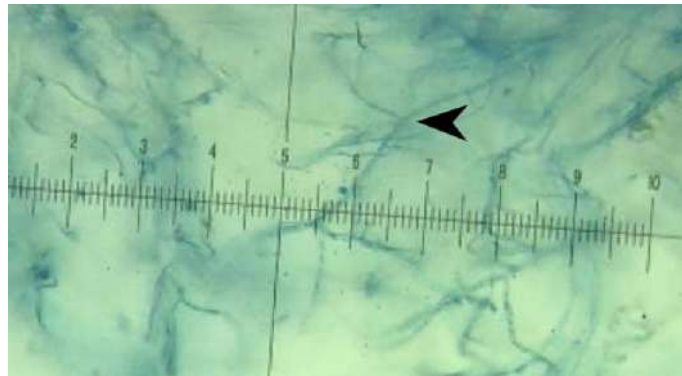
يظهر الشكل (4-46) عند المعاملة بالمستخلص المائي لفطر المشروم ان المستعمرات الفطرية من الناحية المظهرية غطت الطبقة تقريباً ولا توجد اختلافات مظهرية مقارنة ب Control إلا أن الفحص المجهرى أظهر اختلافات a. انفصال الغشاء البلازمي . b. تشوه الكونيدات الكبيرة. c. قلة عدد الكونيدات الصغيرة وكذلك موت الغزول الفطرية وتحللها بالكامل مع زيادة التركيز .

يظهر الشكل (4-47) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole على الفطرين ضمن الناحية المظهرية تبدو المستعمرات منحسرة وتميل للارتقاع نحو الشطح اما من الناحية الخلفية المستعمرة فيوجد تركيز أقل من الصبغة الصفراء مقارنة بال control، كما يظهر الفحص المجهرى موت وتحلل الغزول الفطرية بالكامل .

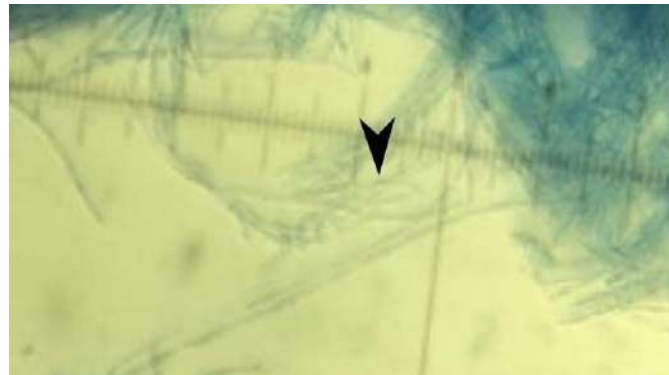
يعد Clotrimazole من مركبات الازول Azole يستخدم بشكل موضعي أو جلدي يستخدم في علاج الفطريات التي تصيب القدمين وبعض الخمائر التي تصيب الجسم أيضاً

يعمل Clotrimazole على الغشاء الخلوي للخلية الفطرية حيث يؤثر على النفاذية عن طريق تثبيط بعض المواد المهمة في عملية بناء الغشاء الخلوي للخلية حيث يعمل Clotrimazole بتكوين معقد الاركستول Ergosterol وهو من المكونات الرئيسية للغشاء البلازمي للفطريات إذ ينظم نفاذية وفعالية الانزيمات للغشاء الخلوي (Bossche et al 2003، ويعتبر علاج clotrimazole هو العلاج الأكثر سهولة وشمولاً لداء المبيضات (Kanr et al 2008). اظهر مؤخراً أن المستويات المنخفضة من Clotrimazole تقلل ولكن لا تمنع نمو الفطريات وبالتالي يمكن أن تمنع بشكل فعال الأضرار التي يسببها داء المبيضات للخلايا الظهارية المهبلية Wachtler 2011. ومن خلال دراستنا على المضاد الفطري Clotrimazole وجدنا أنه ذو تأثير على معدل نمو اقطار المستعمرات كذلك أوزانها حيث يقل عند تركيز 40 ملغم/مل ويقتل عند تركيز 50 ملغم / مل اي

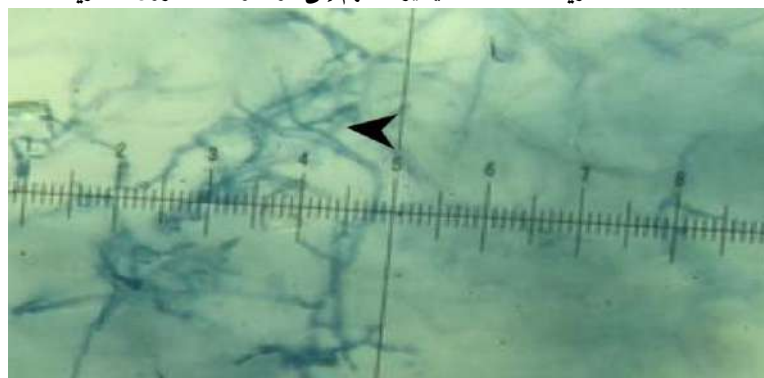
كلما زاد التركيز زاد معدل التثبيط لكلا الفطرين و *T.rubrum*، ولكن فطر *Trichophyton rubrum* أكثر مقاومة من فطر *M.canis*، إن حساسية Clotrimazole تحت ظروف محاكاة التجارب في المختبر في كثير من الأحيان لا تعكس الفسيولوجية الرئيسية لما يحصل فعلا في جسم الكائن الحي (Sosinska et al., 2008)، واليوم يتم استخدام العقاقير التي تعتمد على الاعشاب والتي تكون أكثر توافقاً مع الجسم خاصة مع عدم وجود مقاومة لها (Sheidaei et al., 2018)



10% مضاد فطري *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية



10% مضاد فطري *M.Canis* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية

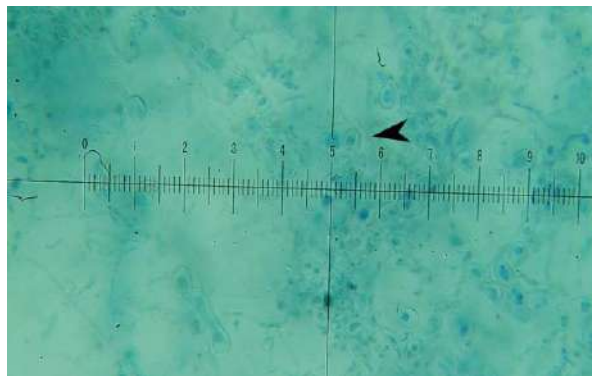


20% مضاد فطري *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الخلية الفطرية بالكامل

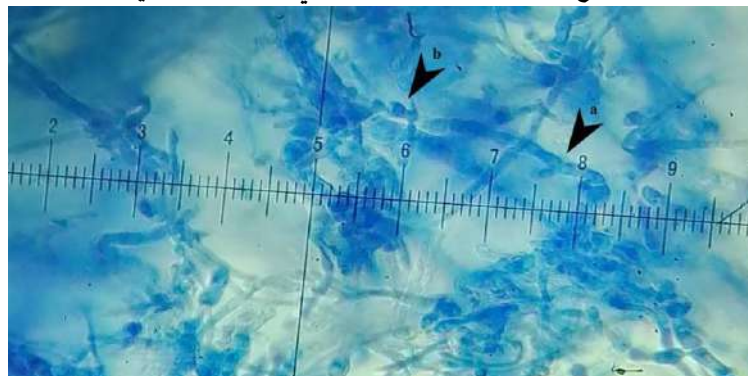
الشكل (4-47) تأثير المضاد الفطري Clotrimazole على الشكل المجهرى للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium Canis* بعد تصبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير

40X

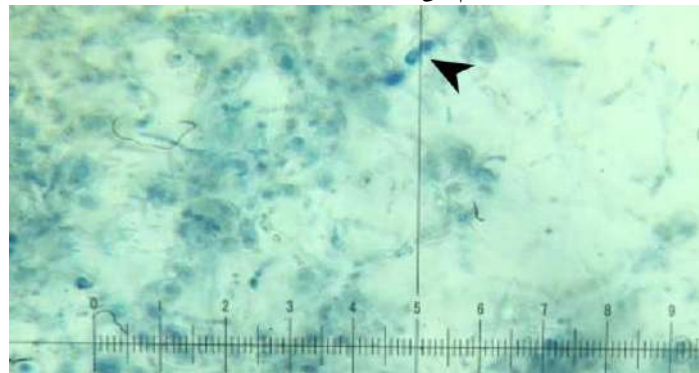
يشير الشكل (4-47) إلى تأثير المستخلص الكحولي مع الزنك ZnOaNps على الصفات المظهرية للمستعمرات الفطرية منحسرة وتميل إلى الارتفاع نحو السطح، أما من الناحية الخلفية فتميل المستعرة إلى اللون الأصفر المائل إلى البني، كذلك تلون المستعمرة الفطرية نتيجة تلون الوسط الزراعي بالمستخلص الزنك النانوي ZnOaNps إلا ان الفحص المجهرى اظهر a. تسرب المادة النانوية ودخولها إلى الغزل الفطري نتيجة اختلاف التركيز. b. تكون الكلاميديوسبور كرد فعل للمادة السامة ثم انفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي مؤدياً إلى موت وتحلل الخلية الفطرية بالكامل.



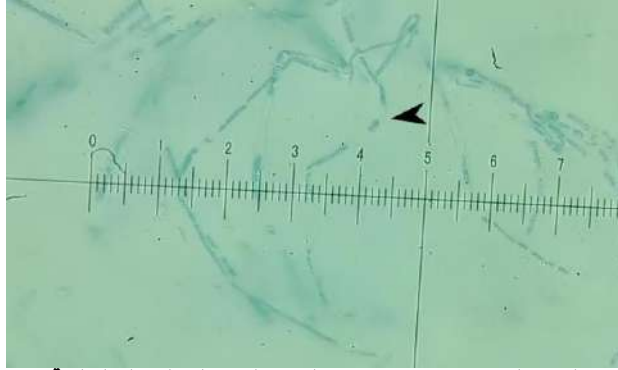
20% زنك كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت الخلية الفطرية نتيجة لتسرب المادة النانوية وانتفاخ الخلية وانفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي



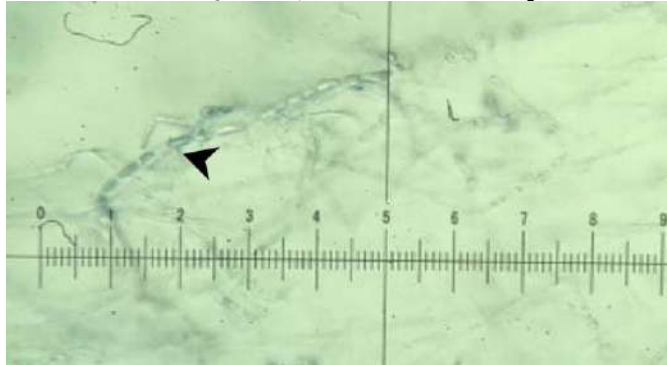
20% زنك كحولي *M. Canis* =a يشير السهم إلى تسرب المادة النانوية ودخولها إلى الغزل الفطري نتيجة اختلاف التركيز =b يشير السهم إلى بداية تكون الكلاميديوسبور كرد فعل للمادة السامة



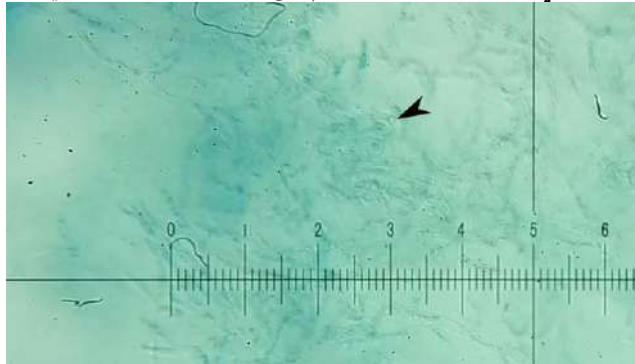
30% زنك كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت الخلية الفطرية نتيجة لتسرب المادة النانوية وانتفاخ الخلية وانفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي



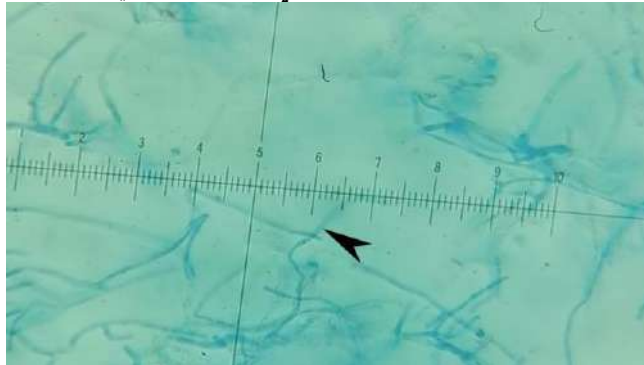
30% زنك كحولي *M. Canis* يشير السهم إلى تقطع الغزول الفطرية وموتها



10% زنك مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الخلية الفطرية بالكامل



20% زنك مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت الخلية الفطرية نتيجة لتشرب الخلية بالمادة النانوية وانتفاخ الخلية وانفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي



30% زنك مائي *M. Canis* يشير السهم إلى تقطع وتشوه وموت الغزول الفطرية

الشكل (4-48) تأثير المستخلص الكحولي والمائي مع الزنك $ZnoawNps$, $ZnoaaNps$ لفطر المشروم *Agaricus bisporus* على الشكل المجهرى للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium Canis*

بعد تصبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X

يشير الشكل (4-48) إلى تأثير المستخلص المائي لفطر المشروم مع الزنك ZnoawNps على الصفات المظهرية للمستعمرات الفطرية منحسرة وتميل إلى الإرتفاع نحن السطح ، أما من الجهة الخلفية فتتلون المستعمرة باللون الأصفر المائل إلى اللون البني.

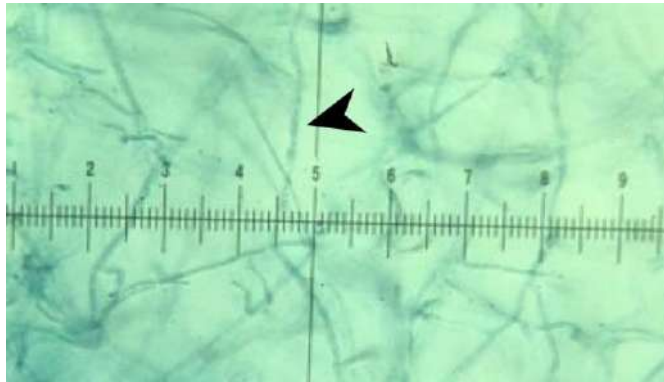
أظهر الفحص المجهرى للمستعمرات الفطرية المعاملة بالزنك النانوي ZnoawNps إلى موت الخلية الفطرية نتيجة لتسرب الخلية بالمادة النانوية وانتفاخ الخلية وانفصال الغشاء البلازمي عن الجدار الخلوي ثم تقطع وتشوه وموت الغزول الفطرية مع زيادة تركيز ZnoawNps .

تحقق جسيمات اوكسيد الزنك النانوية اهتماماً خاصاً فيما يتعلق بالعديد من المجالات لاسيما الطبية وذلك نظراً لمميزاتها الكيميائية والبصرية الفريدة (Jiang et. Al, 2009) تظهر جسيمات الزنك النانوية فعالية قوية ضد البكتريا المسببة للأمراض واسعة الطيف ومنها *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* (Ravishan Kar Rai & Jamuna Bai, 2011)، تختلف الآلية السمية في الوسائط المختلفة إذ قد يتغير نوع الزنك الذائب وفقاً لمكونات الوسط فضلاً عن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للجسيمات النانوية (Li et al. 2011)، ومن خلال النتائج التي حصلنا عليها إن أكبر تثبيط في نمو اقطار مستعمرات وأوزان فطري *T.rubrum* , *M.canis* كان بتركيز 40 ملغم / مل وموت كلا الفطرين بتركيز 50 ملغم / مل، وهنا اتفق مع أغلب الدراسات التي استخدمت الزنك النانوي znoNps كبديل ومضاد للفطريات وفعال واقتصادي وقابل للتطبيق حيث لاحظ الباحثون إن جسيمات النانوية بين 20 و45 نانومتر تظهر تثبيطاً في نمو الفطريات الممرضة حيث تعمل على تحليل محتوى الساسيتوبلازم وتلف جدار الخلية للفطر (De Ia Rosa – Garcia et al. 2018)، قد بين Murthy et al., 2011 أن الجسيمات النانوية لها القدرة على تقليل قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي وفي دراسة أخرى للباحث Lee et al., 2014 إذ أظهرت جسيمات اوكسيد الزنك فعالية ضد البكتريا وأيضاً ضد قابلية البكتريا على تكوين الغشاء الحيوي.

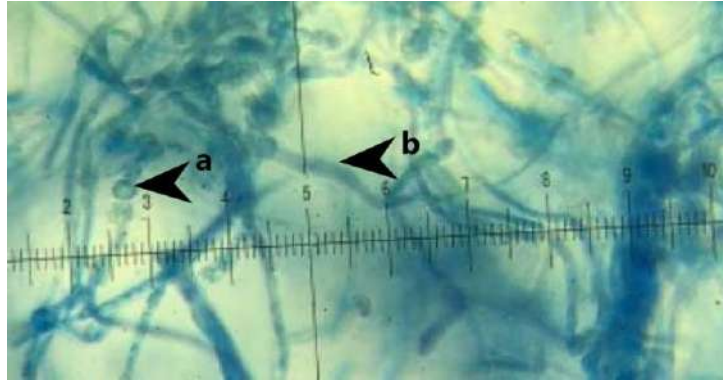
وهذا يوضح قدرة الجسيمات النانوية على تثبيط نمو الفطريات الجلدية لكن بحاجة إلى تراكيز أعلى، لكن تبقى الكائنات المجهرية على انتاج سلالات مقاومة للمضادات التقليدية ممكن ان تجعل الجسيمات النانوية بديل ناجح للمضادات التقليدية على المدى البعيد. وفي دراسة مشابهه اجريت من قبل Pereira et al., (2014) لمقارنة قدرة جسيمات الفضة النانوية المتنوعة حيويًا بواسطة الفطر *Penicillium chrysogenum* ضد فطر *T.rubrum* بالمقارنة إلى مضاد

terbinafine المستخدم لعلاج الاصابات الجلدية، وظهرت النتائج إن الجسيمات المصنعة حيويًا تكون أعلى فائدة وأكثر أمانًا في مقاومة الفطر والقضاء عليه.

الشكل (4-49) يشير إلى تأثير المستخلص الكحولي لفطر المشروم بالفضة النانوية على الصفات المظهرية للمستعمرات الفطرية عبر تلوّن الوسط الزرعي وخاصة من الجهة الخلفية باللون الأصفر المائل إلى البني إلا أن الفحص المجهرى أظهر a. تكون الكلاميدوسبور. b. انتفاخ الغزول لفطرية ثم موت وتحلل الغزول الفطرية وفقدان شكلها بالكامل.

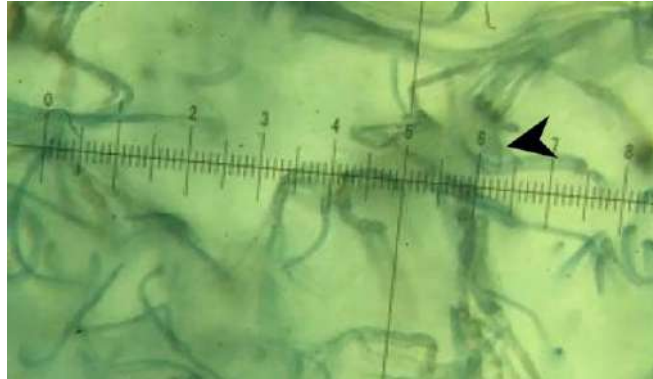


10% فضة كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية وفقدان شكلها بالكامل

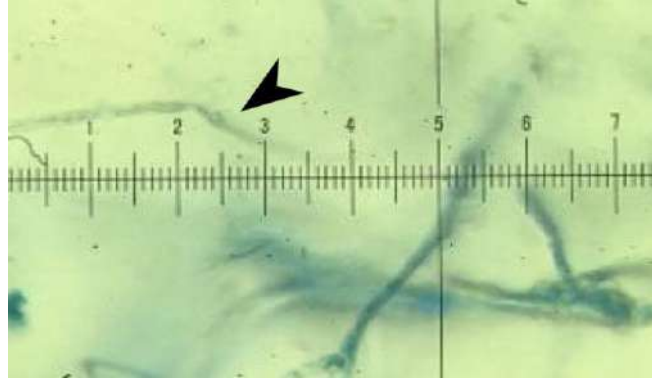


10% فضة كحولي *M. Canis*

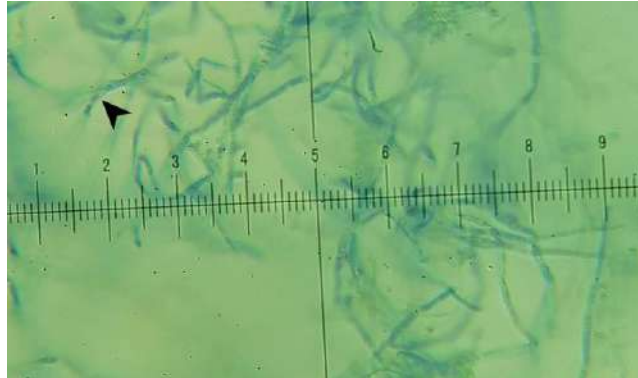
a = تكون الكلاميدوسبور b = انتفاخ الغزل الفطري



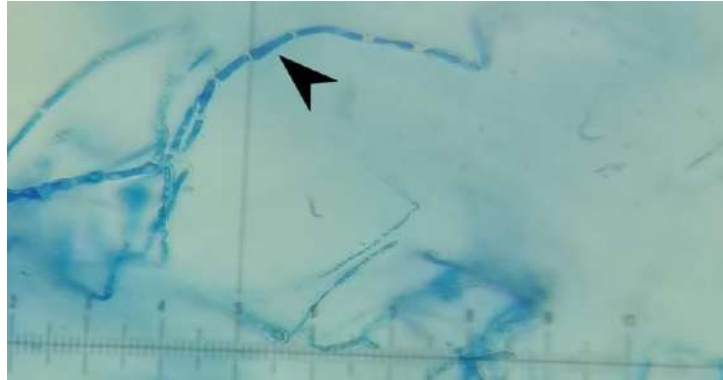
20% فضة كحولي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية وفقدان شكلها بالكامل



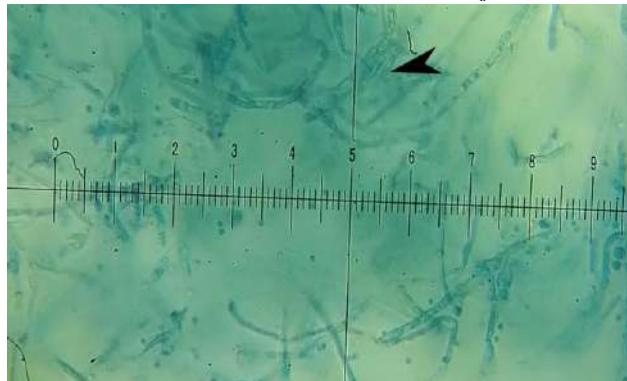
20% فضة كحولي *M. Canis* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية



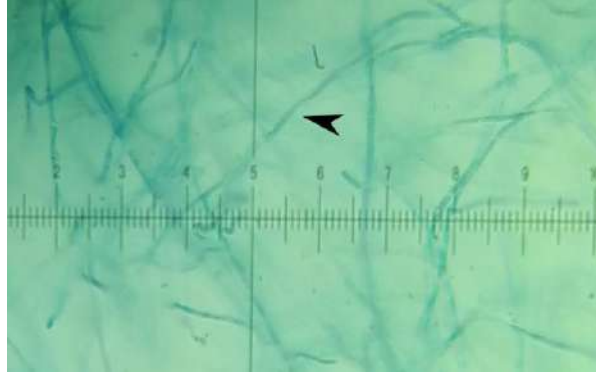
10% فضة مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى انتفاخ الخلية وانفصال الغشاء البلازمي



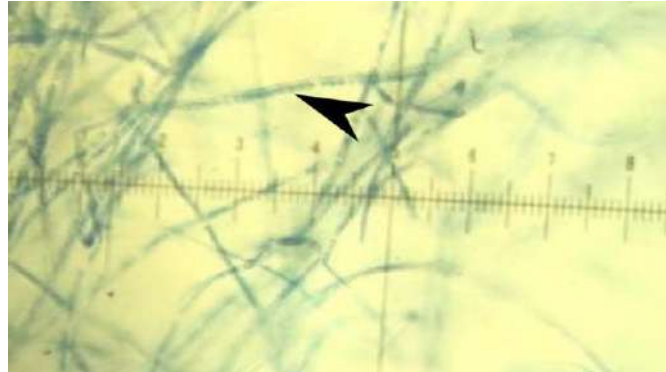
10% فضة مائي *M. Canis* يشير السهم إلى انفصال الغشاء الخلوي



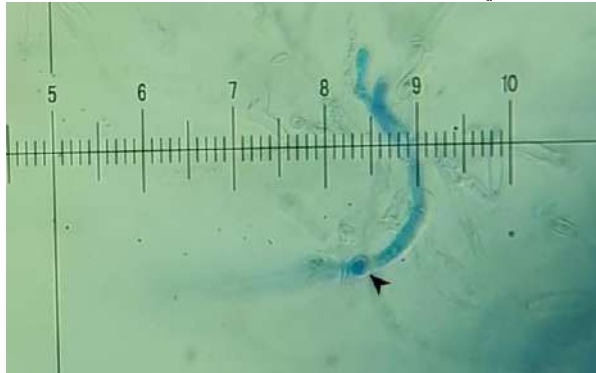
20% فضة مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت الغزول الفطرية وتحللها بالكامل



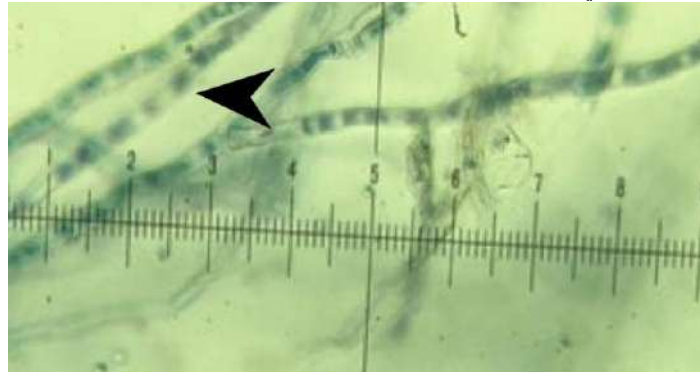
20% فضة مائي *T. rubrum* يشير السهم إلى موت وتحلل الغزول الفطرية ، واختفاء الكونيديات الكبيرة والصغيرة



20% فضة مائي *M. Canis* يشير السهم إلى نحل وموت الغزول الفطرية



30% فضة مائي *T. rubrum* بوادئ ظهور الكلاميدوسبور ، مع موت الغزول الفطرية



30% فضة مائي *M. Canis* يشير السهم إلى تجمع البروتوتيلوم وانفصال الغشاء البلازمي

الشكل (4-49) تأثير المستخلص الكحولي والمائي مع الفضة *AgawNps*, *AgaaNps* لفظر

المشروم *Agaricus bisporus* على الشكل المجهرى للفطرين *Trichophyton rubrum* و

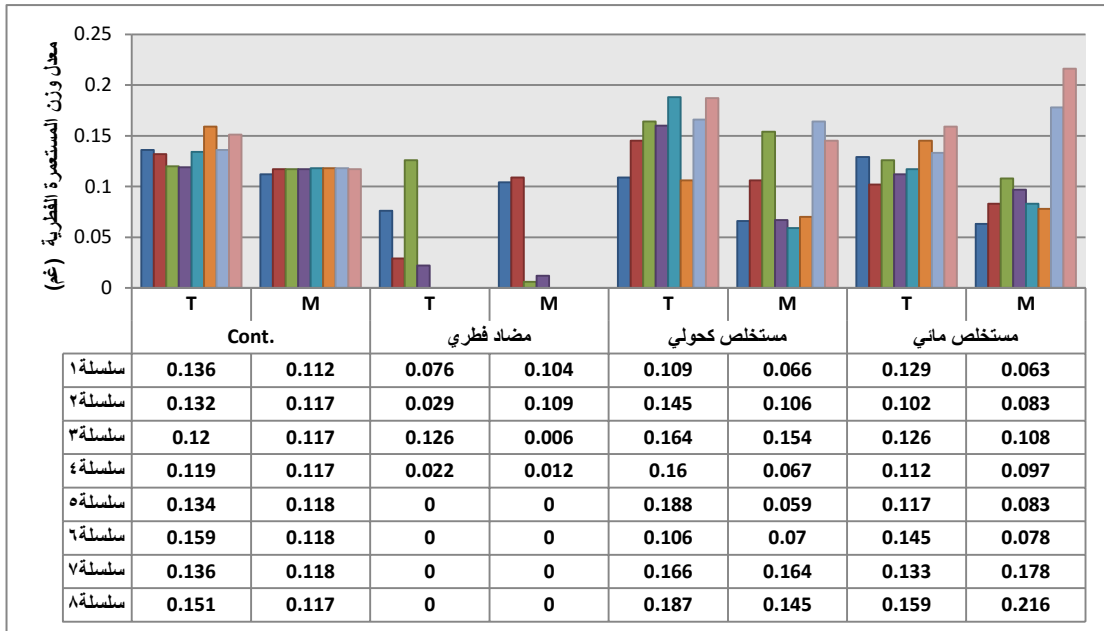
Microsporum Canis بعد تصبغ تراكيبه الفطرية بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء بقوة تكبير 40X

الشكل (4-49) يشير إلى تأثير المستخلص المائي لفطر المشروم مع الفضة النانوية AgawNps على الصفات المظهرية المزعة الفطرية عبر تلون الوسط الزرعي وخاصة من الجهة الخلفية باللون البني ، كما أن الفحص المجهرى لفطر *Trichophyton* فظهر الفحص المجهرى إلى انتقال الخلية وانفصال الغشاء البلازمي ، كذلك موت وتحلل الغزول الفطرية. واختفاء الكونيدات الكبيرة والصغيرة ثم يؤدي ظهور الكلامبوسبور مع موت الغزول الفطرية وبعد ذلك إلى موت الغزول الفطرية وتحللها بالكامل، اما بالنسبة لفطر *M.Canis* إلى تجمع الروتوبلازم وانفصال الغشاء البلازمي ثم تحلل وموت الغزول الفطرية.

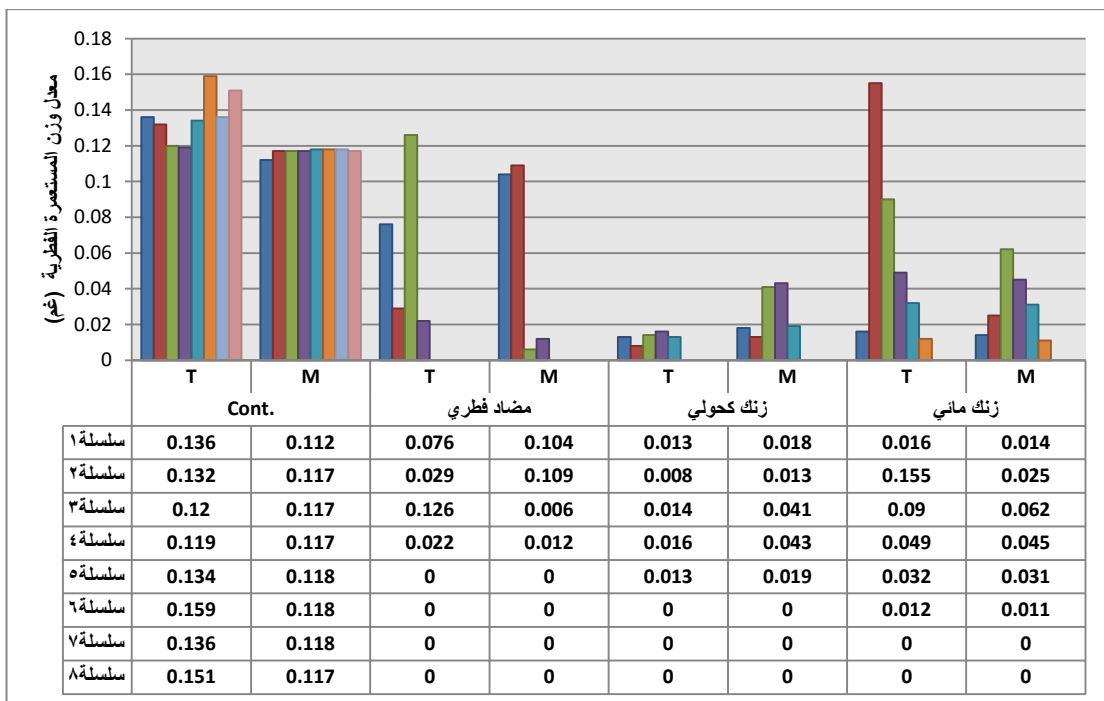
المركبات النانوية الخضراء ككثرت الفضة AgNps هو نوع جديد قد استعملت مع العديد من التطبيقات من الفيروسات والعوامل المضادة للسرطان ومضادات الميكروبات وقد أظهرت الفضة نشاطاً فعالاً ضد البكتريا والفطريات (Shenashem *et al.*, 2014)، من خلال دراستنا تم استخدام مركب نانوي ناتج من اختزال الفضة إلى نترات الفضة مع المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus*، تمتاز الفضة النانوية بأنها ذات إمكانيات بديلة في تطوير عوامل جديدة مضادة للفطريات كونها تحتوي على الحد الأدنى من السمية الخلوية القاتلة للخلايا الليفية لفعالية فطريات *Candida species* المقاومة للمركبات التقليدية المضادة للفطريات (Xue, *et al.*, 2016)، من خلال دراستنا تبين إن تركيز 40 ملغم/ مل كان له أكبر تثبيط في نمو مستعمرات وأوزان فطري *M.Canis* و *T.rubrum* وموت كلا الفطرين بتركيز 50 ملغم / مل (: Yassin & Mohammed, 2021b; Jasim, *et al.*, 2019). (Reeda, *et al.*, 2021).

ويشير (Daniel & Astruc. 2004) إلى أن فعالية جسيمات الفضة النانوية تأتي عن طريق تحول ذرة الفضة من الشكل الخامل إلى حالة التأكسد، مما يؤدي إلى ارتباطها بإيونات البروتينات الخاصة بالغشاء البلازمي مسبباً اضطراب في تركيب هذه البروتينات وتغيير قي نفاذية الغشاء، كما أيونات الفضة التي تنطلق من جسيمات الفضة النانوية مع المجاميع الواهبة للالكترولونات مثل thiols و hydroxyls و imidazoles و phosphates مما يؤدي إلى ثقب في الغشاء (Reeda, 2021; Yassin, 2021).

4-6-4 تقييم المركبات النانوية المحضرة في معدل وزن المستعمرات الفطرية (mg)



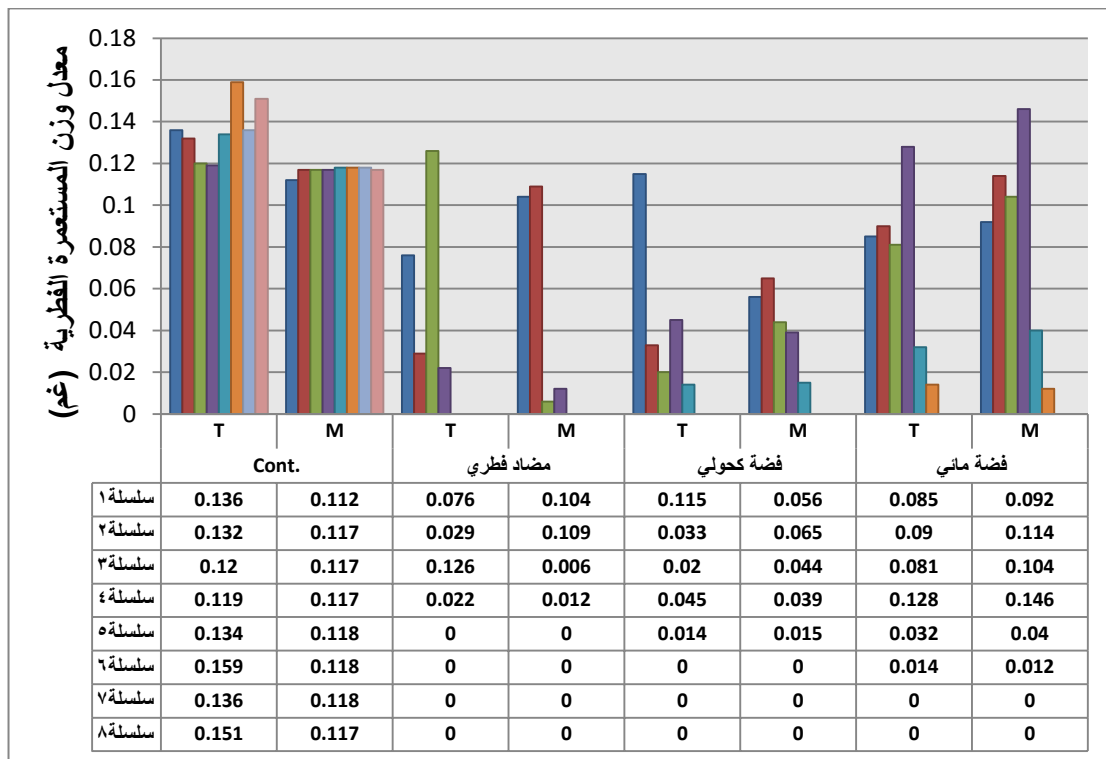
الشكل (4-50) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطريين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م° ولمدة 14 يوم.



الشكل (4-51) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطريين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م° ولمدة 14 يوم.

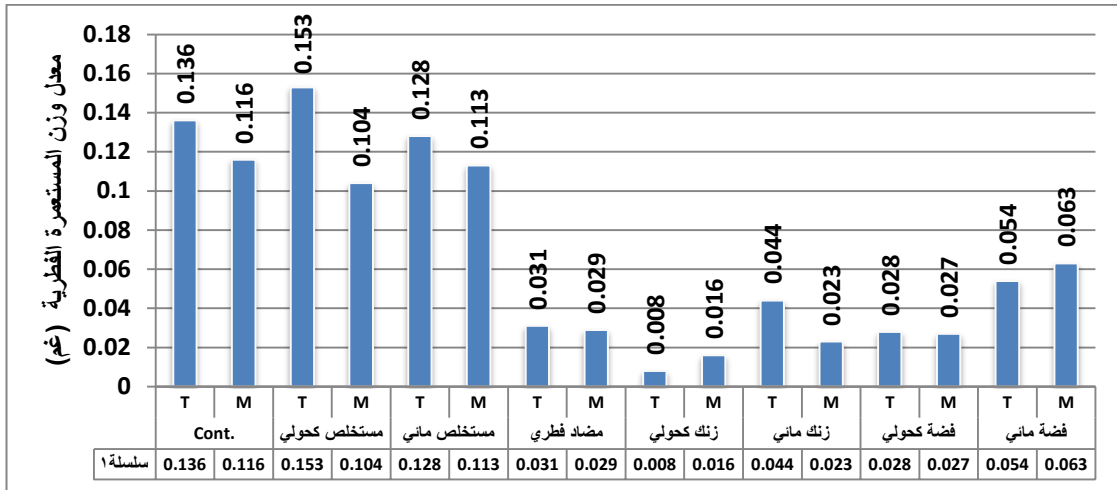
أظهرت النتائج في الشكل (4-50) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص والتركيز أن هناك انخفاضاً في معدل وزن المستعمرات الفطرية مع زيادة تركيز المستخلصات (AgaaNps و ZnoaaNps و AgawNps و ZnoawNps و Clotrimazole) وللفطرين *M. Canis* و *T. rubrum* مقارنة بال Control .

يلاحظ في الشكل (4-51) أن المستخلص النانوي للزنك (ZnoaaNps) التركيز 30% لفطر *Trichophyton* اقل وزناً جافاً ولم يختلف معنوياً عن الفطر *Microsporum* بنفس المعاملة وبتركيز 40% .

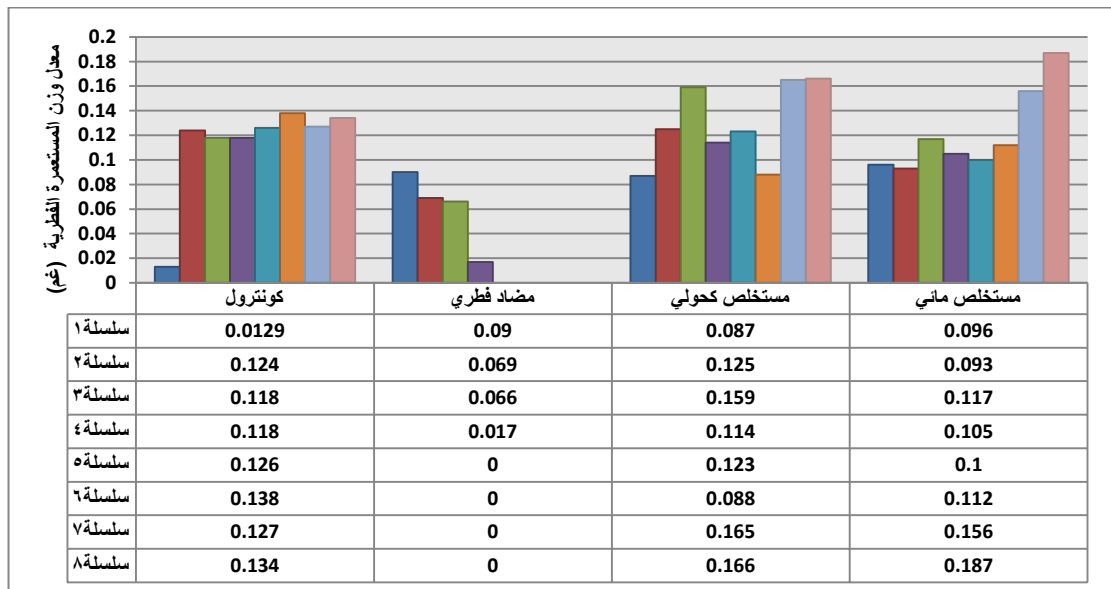


الشكل (4-52) التداخل الثلاثي بين نوع الفطر ونوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين *Microsporum canis* و *Trichophyton rubrum* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25±2°م ولمدة 14 يوم.

مع ملاحظة في الشكل (4-52) ان المركب النانوي بالفضة وكذلك بالزنك (AgaaNps و ZnoaaNps و AgawNps و ZnoawNps و Clotrimazole) هو الأكثر تأثيراً على وزن الجاف للفطرين.

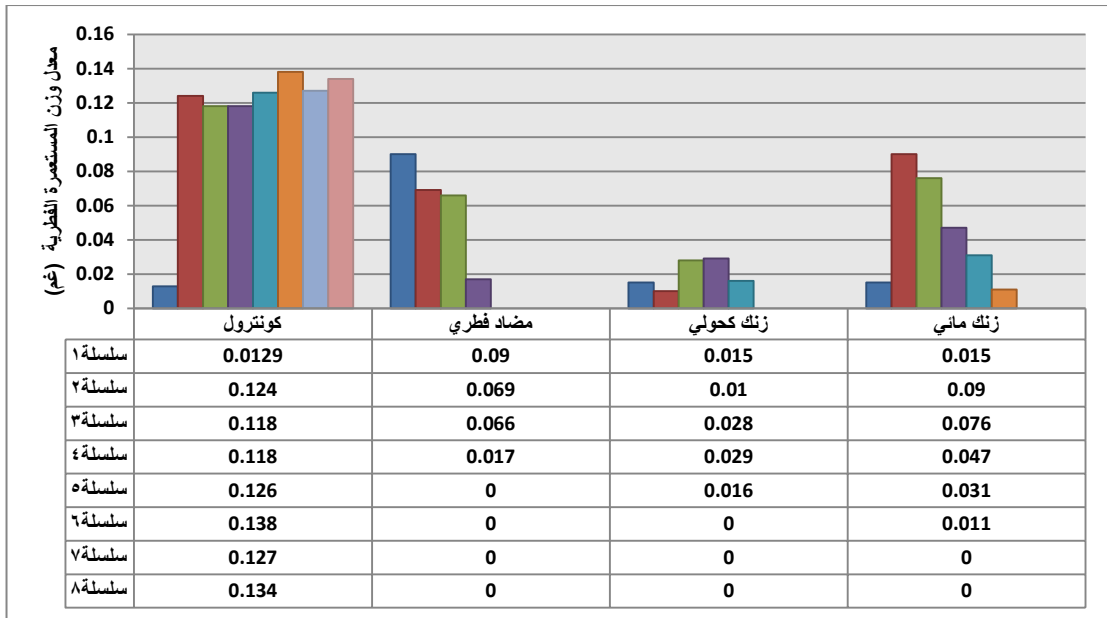


الشكل (4-43) التداخل الثنائي بين نوع الفطر ونوع والمستخلص في معدل الوزن الجاف للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم. يشير الشكل (4-43) إلى أن هناك تداخلاً معنوياً بين نوع الفطر ونوع المستخلص وقد حقق الفطر *Trichophyton* بالمستخلص الكحولي بالزنك النانوي ZnoaaNps اقل معدلاً للوزن الجاف 0.008 mg والتي لم تختلف معنوياً لنفس المستخلص ZnoaaNps لفطر *Microsporium* بوزن جاف 0.016mg، أما في حالة باقي المستخلصات النانوية (AgaaNps, ZnoawNps) و Clotrimazole انخفاضاً بمعدل الوزن لكلا الفطرين *M. Canis* و *T. rubrum* (mg) والنامية على وسط SDB بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم .

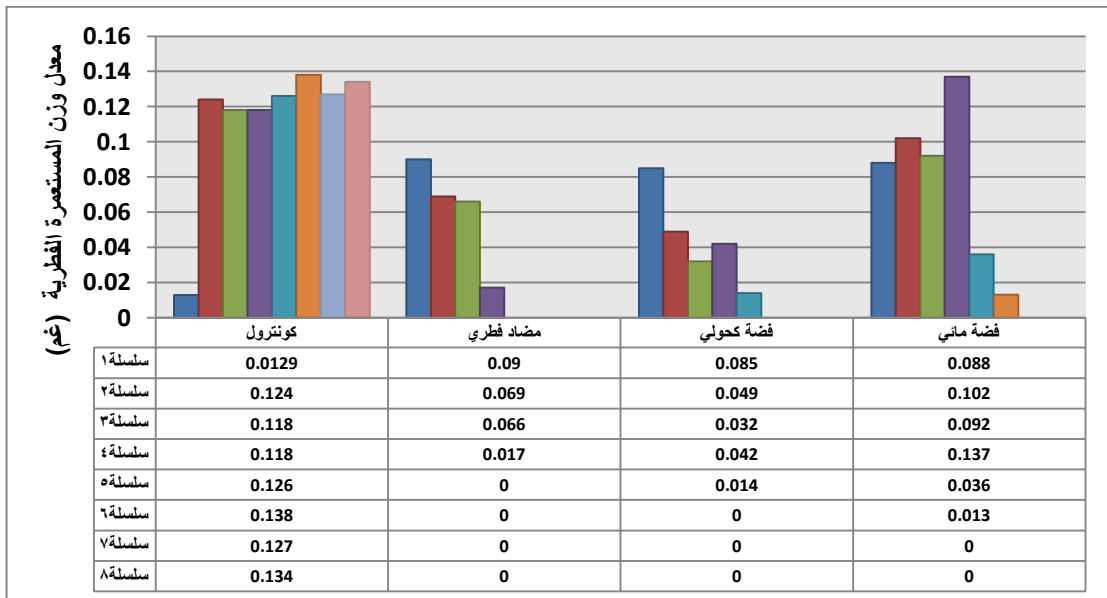


الشكل (4-54) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (كحولي - مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم.

يشير الشكل (4-54) ان هناك تداخلاً معنوياً بين نوع المستخلص الـ(كحولي ، المائي) وتركيزه ، حيث لوحظ انخفاض في معدل وزن الفطر عند تركيز 50% بوزن 0.088غم للمستخلص الكحولي و 0.1غم بتركيز 40% بالنسبة للمستخلص المائي .



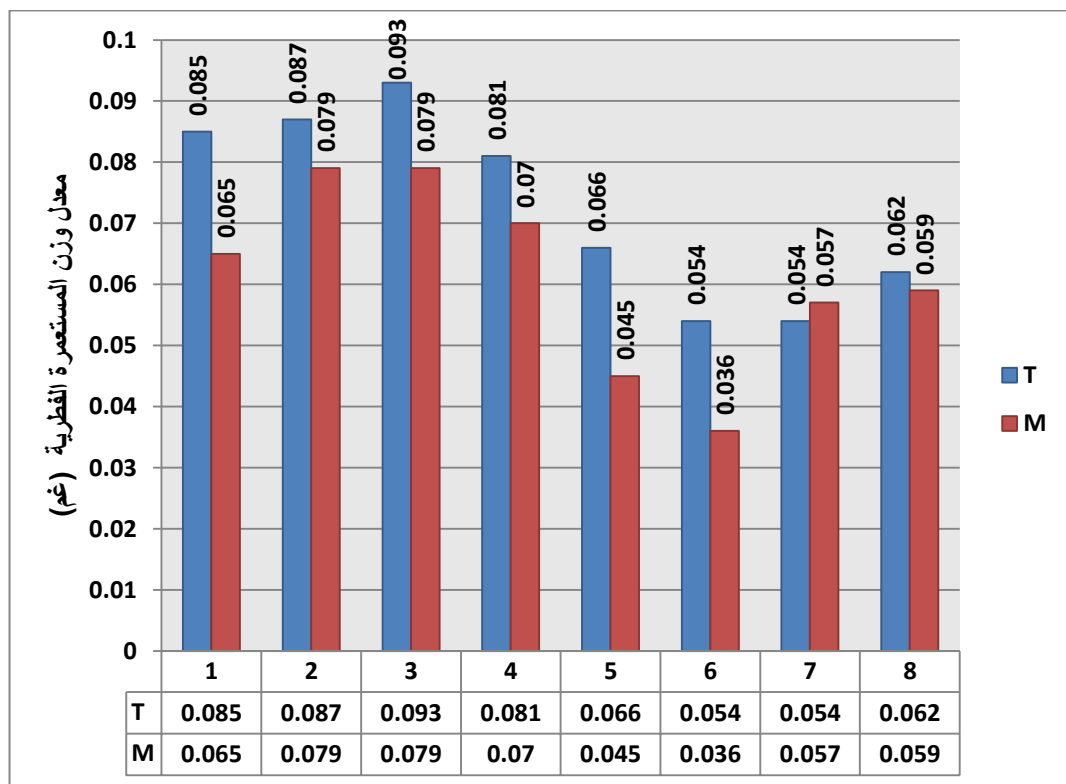
الشكل (4-55) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (زنك كحولي - زنك مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة 14 يوم.



الشكل (4-56) التداخل الثنائي بين نوع المستخلص (فضة كحولي - فضة مائي - مضاد فطري) وتركيزه في معدل الوزن الجاف للفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م ولمدة 14 يوم.

ويشير الشكل (4-55) إلى ان التداخل الثنائي بين نوع المستخلص وتركيزه وأن تركيز 50% من المستخلص النانوي للزنك الكحولي ZnoaNps والمستخلص النانوي للفضة الكحولي AgaaNps أعطت أقل وزناً جافاً ولم تختلف معنوياً بالمستويين 0.01, 0.05 ال Clotrimazole .

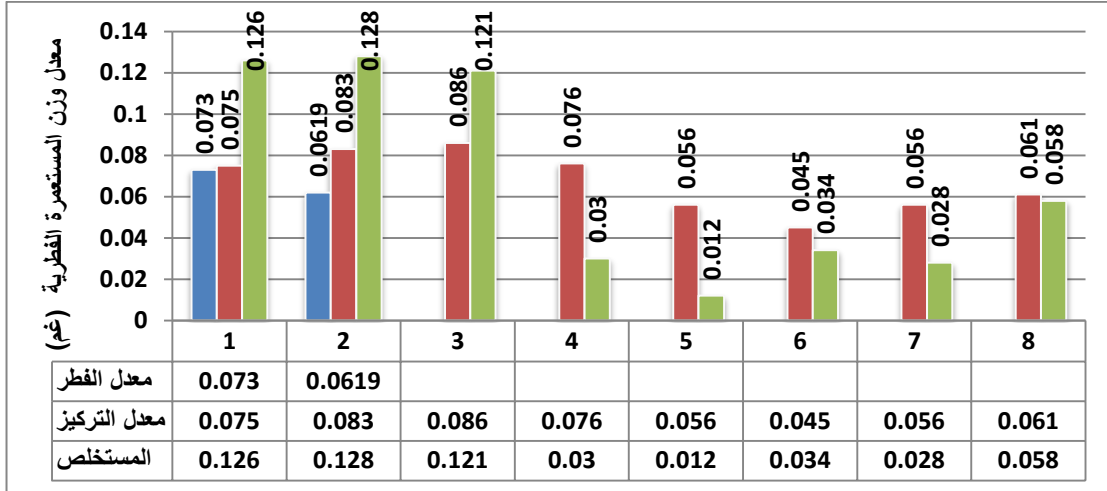
كما أدت التراكيز الأعلى من المستخلص النانوي للزنك المائي ZnoawNps والفضة المائي AgawNps انخفاضاً معنوياً في الوزن الجاف للفطر واختلاف معنوياً عن المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم كما في الشكل (4-56).



الشكل (4-57) التداخل الثنائي بين نوع الفطر وتركيز المستخلص في معدل الوزن الجاف للفطرين

Trichophyton rubrum و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ولمدة 14 يوم.

في الشكل (4-57) يلاحظ أن الفطرين اختلفا عن بعضهما في التراكيز الواطئة من المستخلصات (10، 20، 30) إلا انه في التراكيز العالية (60، 70) لم يختلف لفطرين عن بعضهما في معدل الوزن الجاف وسجل التركيز 50% اقل وزناً جافاً واختلاف معنوياً عند مستوى 0.01, 0.05 ولم يسجل فروقاً معنوية بين الفطرين عند هذا التركيز.



الشكل (4-58) التداخل الثاني بين معدل الفطر، نوع المستخلص، ومعدل التركيز في معدل الوزن الجاف للفطريين *Trichophyton rubrum* و *Microsporium canis* والنامية على وسط الـ SDA بدرجة حرارة 25 ± 2 م° ولمدة 14 يوم.

يتضح من الشكل (4-58) تأثير كل من العوامل المفردة الداخلة في التجربة حيث أظهرت النتائج بعدم وجود فروقات معنوية بين الفطرين في معدل الوزن الجاف (mg) للمستعمرات الفطرية على المستويين 0.05, 0.01، كذلك يبين نفس الشكل بان المستخلص النانوي مع الزنك *ZnoaNps* و *ZnoawNps* اعطى تأثيراً معنوياً على مستوى معنوية 0.05, 0.01 في تثبيط الوزن الجاف للمستعمرات الفطرية والتي اختلفت معنوياً عن المستخلص النانوي للفضة *AgaaNps* و *Colotrimazol*.

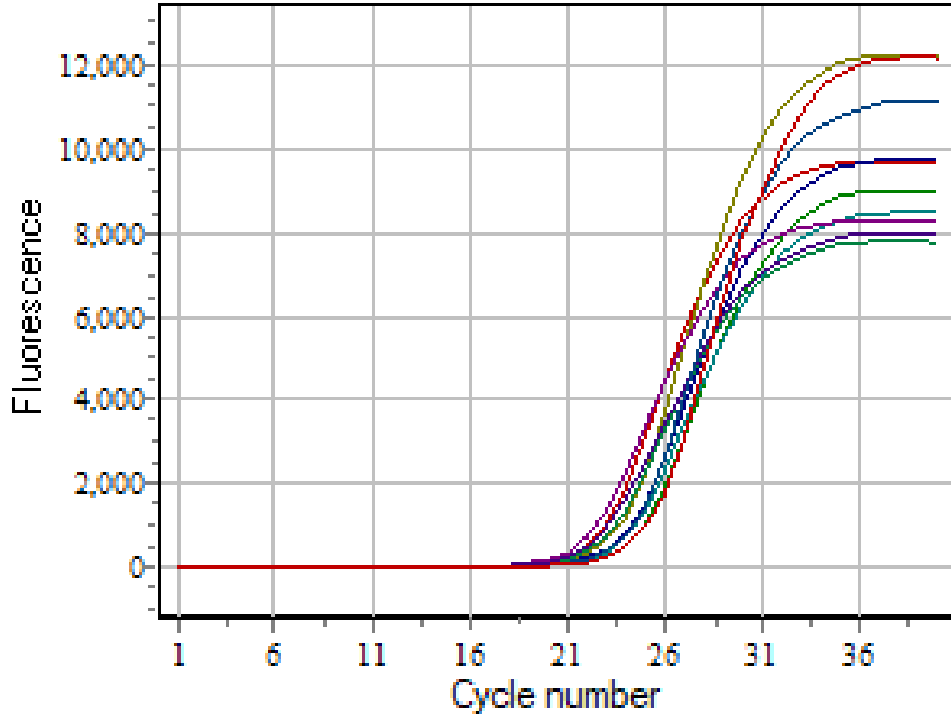
كما يبين نفس الشكل أن هناك انخفاضاً معنوياً وعلى مستوى معنوية 0.05, 0.01 حيث أن تركيز 20% اعطى أعلى معدل تركيز.

7-4 نتائج تحليل بيانات Rcal-Time PCR data analysis

الجدول (4-11) الجينات المرجعية المستخدمة في الدراسة Reference gene

Number of the well	ID of the tube	Cp, Fam
A1	sample 1	22.6
A2	sample 2	24.6
A3	sample 3	23.9
A4	sample 4	23.7
A5	sample 5	23.9

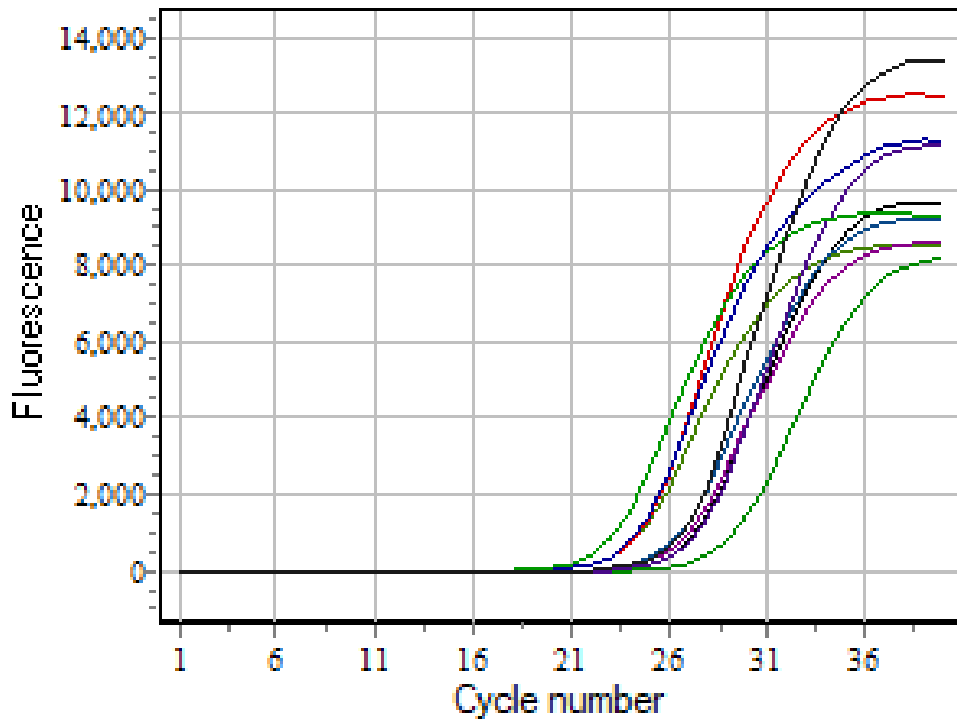
Number of the well	ID of the tube	Cp, Fam
A6	sample 6	21.9
A10	sample 7	22.7
A11	sample 8	22.2
A12	sample 9	24.3
B1	sample 10	25.1



الشكل (4-59) المنحنى البياني للتعبير الجيني Serine protease للجينات المرجعية

الجدول (4-12) يمثل الجين المستهدف في الدراسة Target gene

Number of the well	ID of the tube	Cp, Fam
A1	sample 1	27.1
A2	sample 2	24.0
A3	sample 3	26.5
A4	sample 4	26.2
A5	sample 5	28.9
A6	sample 6	27.5
A7	sample 7	28.1
A8	sample 8	27.6
A9	sample 9	28.1
A10	sample 10	28.6



الشكل (4-60) المنحنى البياني للتعبير الجيني Serine protease متمثلاً بالجينات المستهدفة

أظهرت النتائج لفطر *T. rubrum* لجين Serine protease في المعاملات (1، 10، 15، 18، 22) من خلال تضخيم دورات Ct.Fam وكانت (27.1، 26.2، 27.5، 28.1، 27.6) وكانت قيم $\Delta\Delta Ct - \Delta Ct$ Folding (4.5، 2.5، 5.6، 5.4، 5.4) (-1.1، -3.1، -0.2، 3.1، 5.1، 2.2) على التوالي وقد أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-13) في دورات cDNA، ان الجين قل من التضخيم في (26.2، 27.1) وازداد في (27.6، 28.1) على التوالي في حين كان معاملة المقارنة 27.5.

الجدول (4-13) التعبير الجيني لانزيم Serine protease

ترقيم المختبر	ترقيم الطالب	target gene	refrence gene	delta Ct	$\Delta\Delta Ct$	folding
1	T (40%) Ag, W	27.1	22.6	4.5	1.1-	3.1
6	M cont.	24	24.6	-0.6	-	-
9	M (40%) Zmk	26.5	23.9	2.6	3.2	-1.2
10	T (40%) Ag, K	26.2	23.7	2.5	-3.1	5.1
13	M (40%) Ag, W	28.9	23.9	5	5.6	-3.6
15	T cont.	27.5	21.9	5.6	-	-
18	T (40%) ZmW	28.1	22.7	5.4	-0.2	2.2
22	T (40%)ZmK	27.6	22.2	5.4	-0.2	2.2

ترقيم المختبر	ترقيم الطالب	target gene	refrence gene	delta Ct	$\Delta\Delta Ct$	folding
24	M (40%) Ag, k	28.1	24.3	3.8	4.4	-2.4
27	M(40%) ZmW	28.6	26.1	3.5	4.1	-2.1

بينما بالنسبة لظفر *M.Canis* لجين Serine protease في المعاملات (6، 9، 13، 13، 24، 27) وخلال تضخيم Farm ct وكانت (24، 26.5، 28.1، 28.6، 28.9) بينما قيم ΔCt - Folding, $\Delta\Delta Ct$ (-0.6، 2.6، 5، 3.8، 3.5) (3.2، 5.6، 4.4، 4.1) (-1.2، 5.1، 2.4، -2.1) على التوالي حيث أظهرت نتائج الجدول (4-13) ان جين Serine protease قد ازداد تعبيره الجيني خلال تضخيم cDNA مقارنة مع معاملة السيطرة 24.

تم ملاحظة دقة التضخيم بقيمة عتبة الدورة (ct) لجين Serine protease المستهدف. أظهرت النتائج أن هناك علاقة عكسية بين قيم ct والتعبير الجيني فكلما زادت قيمتها انخفض التعبير الجيني (ترتبط عكسياً بكمية قالب البداية التي تعني ارتفاع قيمة ct يشير إلى انخفاض مستويات التعبير الجيني أو جيني التضخيم).

من خلال دراسة التعابير الجينية لبعض الجينات المهمة في تثبيط نمو الفطريات وتداخلها مع بعض العمليات المهمة في الخلية الفطرية وجد أن Serine protease أثر بشكل مباشر في الجدار الخلوي وظهرت مستويات التعبير الجيني للجين Serine protease وجود خروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في عزلات المعاملة ومجموعة السيطرة (Al-Masaoodi, 2021). وتبين أن للمركبات النانوية المحضرة من مستخلص المشروم *Agaricus bisoporus* الكحولي والمائي ذات تأثير على انزيم جين Serine protease.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions

And

Recommendations

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات

1- ان المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* ليس له أي تأثير ملحوظ في تثبيط نمو أقطار وأوزان المستعمرات الفطرية للفطرين *M.Canis* و *T.rubrum*، من الناحية المظهرية إلا أنها أثرت من الناحية الجزيئية والمجهريّة والتي لها تأثير على الفطرين من الناحية الفسيولوجية وتكاثر وبقاء الفطر .

2- تحويل المستخلصات الكحولية والمائية إلى مستخلصات نانوية زادت من الفعالية التثبيطية لفطر المشروم في نمو الفطرين الجلديين .

3- المركبات النانوية *AgaaNps* و *ZnoaaNps* ذات تأثير مقارب للمضاد الفطري *Clotrimazole*.

4- فطر *T.rubrum* أقل حساسية من الفطر *M.Canis* في اغلب المعاملات .

5- اظهرت المركبات النانوية الخضراء تأثيرا على الفطرين الجلديين *M.Canis T.rubrum* على المستوى الجزيئي متمثلا بزيادة التعبير الجيني لانزيم Serine protease المسؤول عن تحلل البروتين في الجدار الخلوي .

التوصيات

1- دراسة وتحديد المركبات الكيميائية المستخلصة من المستخلص المائي والكحولي لفطر المشروم *Agaricus bisporus* .

2- التوجه إلى تحويل المستخلصات المائي والكحولية إلى مستخلصات نانوية خضراء يعزز الدور الطبي ضد الفطرين والتحقق في مقاومة الفطرين للعلاجات الكيميائية فضلاً عن أنه مستخلص صديق للبيئة.

3- ممكن استخدامه كبديل للمضادات الفطرية.

4- اجراء تجارب على بعض الحيوانات المختبرية.

المصادر

و

المراجع

المصادر والمراجع

References

صالح، طلال حسين (2010). ظهور إصابات القوباء الحلقية بين أطفال المدارس الابتدائية في ميسان. مجلة ميسان للدراسات الأكاديمية. 9 (17) .

Abd Elmegeed, A. M., Ouf, S. A., Moussa, T. A. A. and Eltahlawi, S. M. R. (2015). Dermatophytes and other associated fungi in patients attending to some hospitals in Egypt. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(3): 799-805p

Ahmed, I., Mehmood, Z. and Mohammad, F. (1998). Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J. ethnopharmacol.* 62: 183-193 p

Akyuz, M., Onganer, A. N., Erecevit, P. and Kirbag, S. (2010). Antimicrobial Activity of some Edible Mushrooms in the Eastern and Southeast Anatolia Region of Turkey. *Gazi University Journal of Science.* 23(2): 125-130 pp

Alexandro, B., Denisse, V., Amado, S., Leonel, F. and Rosa, P. M. (2011). Refractory onychomycosis due to *Trichophyton rubrum*: combination therapy with itraconazole and terbinafine. *N Dermatol.*; 3(2): 108-112p

AL-Masaoodi N. N. H., Mohammed B. T., and Abood Al-Janabi J. K., 2020a "Occurrence, morphological, and molecular characteristics of *Trichophyton erinacei* in Iraq," *Drug Invent. Today*, vol. 14, no. 6, pp. 889–896,.

Al-Masaoodi, N. N. H., Abood Al-Janabi, J. K., & Mohammed, B. T. (2020)b. Molecular characterization and gene expression profiling of *Trichophyton rubrum* treated with a *Marasmius palmivorus* filtrate. *Drug Invention Today*, 14(6), 877–888.

Al-Massodi; N; H; M. 2021. Morphological and Molecular characteristics of some dermatophyte fungi in Karbala province and evaluation of the *Marasmius palmivorus* filtrate and leaf extract of *Moringa*

oleifera on the growth and on gene expression of *Trichophyton rubrum*. Ph. D. Thesis, University of karbala, karbala, Iraq.

- Amari, N. O., Razafimandimby, B., Auberon, F., Azoulay, S., Fernandez, X., Berkani, A., Bouchara, J. and Landreau, A. (2021).** Antifungal and Antiaging Evaluation of Aerial Part Extracts of *Thymelaea hirsute* (L.) Endl. *Natural Product Communications.*, 16(2): 1-10 p
- Andrea, P., Pasquetti, M., Molinar Min, A. R., Scacchetti, S. and Dogliero, A. (2017).** Infection by *Microsporum Canis* in Paediatric Patients: A Veterinary Perspective. *Vet. Sci.*, 4(46): 1-6 p
- Aneja, V.P., A. Isherwood, and P. Morgan. 2012. Characterization of particulate matter (PM10) related to surface coal mining operations in Appalachia. *Atmos. Environ.* 54:496501.oi:10.1016/j.atmosenv.2012.02.063
- Arey, N. C. (2010).** Manual of environmental analysis, Ane books PVT Ltd, Nehru, India, 424.
- Atzori, L., Aste, N., Aste, N., & Pau, M. (2012). Tinea faciei due to *Microsporum canis* in children: A survey of 46 cases in the district of Cagliari (Italy). *Pediatric Dermatology*, 29(4), 409–413. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1470.2011.01595.x>
- B.D.eddine, (2012.). "Elaboration et Etude de Nanoparticules Au/TiO₂ et Ag/TiO₂", présenté pour obtenir le Diplôme de Magister en physique, université Mentori, Constantine.
- B.Samiha, (2016). " determination of the molecular composition and the quartez concentration in the different granular types of ouargla dunes sand using spectroscopic techniques ",thesis doctorate LMD in physics, specialty: spectroscopy of material.
- Banerjee, M., Ghosh, A. K., Basak, S., Kapil, D. and Gangopadhyay, D. N. (2012).** Comparative evaluation of efficacy and safety of topical fluconazole and clotrimazole in the treatment of tinea corporis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*; 22 (4):342-349 p

- Bashi, A.M.; Hussein, M.Z.; Zainal, Z. and Tichit, D. (2013). Synthesis and controlled release properties of 2,4-dichlorophenoxy acetate–zinc layered hydroxide nanohybrid. *Journal of Solid State Chemistry*,203:19–24.
- Bijanzadeh, A.R., Vakili, M.R., and Khordad, R. (2012). A study of the surface Plasmon absorption band for nanoparticles. *International Journal of Physical Sciences* 7(12). PP 1943–1948.
- Bokhari, F. M. (2009).** Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia. *Mycopath.* 7(1): 51-57 p
- Bossche, H. Vanden, M. Engelen, and F. Rochette. 2003. “Antifungal Agents of Use in Animal Health–Chemical, Biochemical and Pharmacological Aspects.” *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26(1):5–29.
- Cafarchia, C., Otranto, D. and Aneke, C. I. (2018).** Therapy and Antifungal Susceptibility Profile of *Microsporium Canis*. *J. Fungi.* 4(107) : 14p
- Chang S.-T., Miles P.G., 2004. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and enviromental impact, 2nd Ed. CRC ress
- Chawla, P., Kaur, N., Bains, A., Kaushik, R., Dhull, S. B. and Melinda, F. (2021).** A Review on Antifungal Efficiency of Plant Extracts Entrenched Polysaccharide-Based Nanohydrogels. *Nutrients*, 13(2055): 26 p
- Chermette, R., Ferreiro, L. and Guillot, J. (2008).** Dermatophytosis in animals. *National library of medicine.* 166(5-6):385-405p
- Chiapello, L. S., Burstein, V. L., Beccacece, I., Guasconi, L., Mena, C. J. and Cervi, L. (2020).** Skin Immunity to Dermatophytes: From Experimental Infection Models to Human Disease. *Frontiers in Immunology.*, 11: 1-16 pp
- Crowley, P. D. and Gallagher, H. C. (2014).** Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *Journal of Applied Microbiology.* 44.

- d Steel, Robert G., and James H. Torrie. 1986. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. McGraw-Hill.
- Daniel MC, Astruc D. Gold 2004, nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size related properties, and applications towards biology, catalysis and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104, 293–346.
- De Hoog, G. S., Guarro, J., et al. (2000).** Atlas of clinical fungi, 2nd edition. Utrecht, The Netherlands: Centraal bureau voor Schimmel cultures.
- De la Rosa-García S. C., Martínez-Torres P., Gómez-Cornelio S., Corral-Aguado M. A., Quintana P., Gómez-Ortíz M. (2018). Antifungal activity of ZnO and MgO nanomaterials and their mixtures against *Colletotrichum gloeosporioides* strains from tropical fruit. *J. Nanomater.* 2018: 3498527.
- De Souza, P. M., Bittencourt, M. L. A., Caprara, C. C., Freitas, M. D., Almeida, R. P. C. et al., (2015).** Review: A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(2): 337-346 pp
- Dolenc-Voljč, M. (2015).** Dermatophyte Infections in Humans: Current Trends and Future Prospects. *Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects.* 26 p
- Elavarashi, E., Kindo, A. J. and Rangarajan, S. (2017).** Enzymatic and Non-Enzymatic Virulence Activities of Dermatophytes on Solid Media. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 11(2): 23-25p
- El-Diasty, E. M., Ahmed, M. A., Okasha, N., Mansour, S. F., El-Dek, S. I., El-Khalek, H. M. and Youssif, A. H. (2013).** Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. *ROMANIAN J. BIOPHYS.*,23(3): 191–202 pp
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G. and Galdiero, M. (2015).** Review: Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents., *Molecules*, 20 : 8856-8874 pp
- Georges M.Halpern, MD,PhD(2007)Healing mushrooms .**

- Goedadi M, Suwito PS. Tinea Korporis dan Tinea Kruris. In 2004. Budimulja U, Kuswadi, Bramono K, Menaldi SL, Dwihastuti P, editors.. Dermatmikosis Superfisialis, 2nd Ed. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, , p : 31-35
- Goldstein, A. O., K. M. Smith, T. J. Ives, and B. Goldstein. 2000. "Mycotic Infections. Effective Management of Conditions Involving the Skin, Hair, and Nails." *Geriatrics (Basel, Switzerland)* 55(5):40–42.
- Gonçalves, C., Pereira, P. and Gama, M. (2010).** Self-assembled hydrogel nanoparticles for drug delivery applications. *Materials*, 3: 1420–1460 p
- GraSer, Y., Presber, W., Kuijpers, A. F. A. and De Hoog, G. S. (2000).** Molecular Taxonomy of the *Trichophyton rubrum* Complex. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 38(9) : 3329–3336 p
- Graúser, Y., Kuijpers, A. F. A., Fari, M. E., Presber, W. and De Hoog, G. S. (2000).** Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum Canis* complex. *Medical Mycology*.38: 143–153 p.
- Gupta AK, Cooper EA (2008) "Update in antifungal therapy of dermatophytosis," *Mycopathologia*. 5(6): 353–367.
- Gürtler, T. G. R., Diniz, L. M. and Nicchio, L. (2005).** Tinea capitis microepidemic by *Microsporum Canis* in a day care center of Vitória – Espírito Santo (Brazil). *An Bras Dermatol*.80(3): 267-272 p
- Hadizadeh, S., Mousavi, S. A. A., and Salari, S. (2015).** Evaluation of Antifungal Effect of Silver Nanoparticles Against *Microsporum Canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*. *Iran J Biotech.*;13(4): 38-42 pp.
- Hay, R. (2018).** Therapy of Skin, Hair and Nail Fungal Infections. *J. Fungi*. 4 (99) 13 p

- Heitman, J., Li, W., Metin, B. and White, T. C. (2010).** Organization and Evolutionary Trajectory of the Mating Type (MAT) Locus in Dermatophyte and Dimorphic Fungal Pathogens. *American Society for Microbiology*. 9(1) : 48-56 p
- Hernandez-perez, M., Lopez-garcia, R. E., Rabnal, R. M., Darias, V. and Arias, A. (1994).** Antimicrobial activity of *Visnea Mocarera* leaf extract. *J. ethnopharmacology.*, 41(1-2):115-119 p
- Irazoqui, F.J., Zalazar, F.E., Nores, G.A., Vides, M.A., *Agaricus bisporus* lectin binds mainly Oglycans but also N-glycans of human IgA subclasses. *Glycoconjugate J.*, 1997, 14, 313-319.
- J.André N'Diaye, (2016). "synthèse et application du graphene en tant que mousse Absorbante de contaminants en milieu aqueux et ainsi qu'électrode pour la détection électrochimique de peroxyde d'Hydrogène", mémoire présentée, comme exigence partielle de la maîtrise chimie, université du Québec à Montréal.
- Jalal, M., Ansari, M. A., Ali, S. G., Khan, H. M. & Rehman, S. (2018).** Anticandidal activity of bioinspired ZnO NPs: effect on growth, cell morphology and key virulence attributes of *Candida* species. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal*. 46(1) : 912–925 .
- Janardhan B, Vani G (2017) Clinico mycological study of dermatophytosis. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 5(1):31-39.
- Jasim A, B. T. Mohammed, and A. Lahuf, 2018 “Molecular and enzymatic properties of fungi isolated from Historical Manuscripts Preserved at the Al-Hussein Holy Shrine .,”.
- Jasim A. A., Mohammed B. T., Lahuf A. A., (2019) “Molecular and enzymatic properties of fungi isolated from historical manuscripts preserved at the Al-Hussein Holy Shrine,” *Biochem. Cell. Arch.*, vol. 19, no. 2,.
- Kadhim, S. K., Al-Janab, J. K. and Al-Hamadani, A. H. (2017).** In vitro, determination of optimal conditions of growth and

- proteolytic activity of clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. *J Contemp Med Sci*. 1(3): 9–19.
- Kadhim, S. K., Al-Janabi, J. K. and Al-Hamadani, A. H. (2015).** In vitro, determination of optimal conditions of growth and proteolytic activity of clinical isolates of *Trichophyton rubrum*. *J Contemp Med Sci*. 1(3) : 9-19p
- Kady. E. L. and El maraghy. S. S. (1993).** Antimicrobial and antidermatophytes activities of some essential oils from specific.
- Kalac, P., & Svoboda, L. (2000). A review of trace elements concentrations in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 69, 273-281.
- Kalwar, K. and Shan, D. (2018).** Antimicrobial effect of silver nanoparticles (AgNPs) and their mechanism – a mini review. *Micro & Nano Letters*, 13(3): 277–280 pp
- Kane JM, Brannen M, Kern E. 2008. Impact of patient safety mandates on medical education in the United States. *Journal of Patient Safety*.;4(2):93–97.
- Kano, R., Edamura, K., Yumikura, H., Maruyama, H., Asano, K., Tanaka, S. and Hasegawa, A. (2009).** Confirmed case of feline mycetoma due to *Microsporium canis*. *Mycoses*. 52(1): 80-83.
- Karan, A., Alikhan, A., & Feldman, S. R. (2009). Microscopically differentiating dermatophytes from sock fibers. *Journal of the American Academy of Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2008.11.010>.
- Khalifa, E. F., Nafae, Z. H., Abdullah F. N., Bdair, G. S., Niema, R. M., Salman, H. D. and Hussein F. H. (2019).** Synthesis and Characterizations of Zinc Oxide Nanoparticles-Loaded Chloramphenicol for Antibacterial Applications. *Annals of Tropical Medicine & Public Health*., 22(12): 12 pp
- Khanzada, Shahid Ahmed, Sheikh Muhammad Iqbal, and Abida Akram. 2006. “In Vitro Efficacy of Plant Leaf Extracts against *Sclerotium Rolfsii* Sacc.” *Mycopathologia* 4(1):51–53.

- Kim, S., Jo, I. H., Kang, J., Joo, S. Y. & Choi, J. (2016).** Dermatophyte abscesses caused by *Trichophyton rubrum* in a patient without pre-existing superficial dermatophytosis: a case report . BMC Infectious Diseases. 16(298).
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T., and Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 76(1). PP 50–56.
- Kulkarni, S. S. and Shirsat, M.D. (2015). Optical and Structural Properties of Zinc Oxide Nanoparticles, IJARPS. 2(1):14-18
- Kumar K, Kindo AJ, Kalyani J, 2007. Clinico - mycological profile of dermatophytic skin infections in a tertiary care center- a cross sectional study. Sri Ramachandra Journal of Medicine;1(2) : 12 – 5.
- Laxminarayan, R.: Duse, A; Watial, C. and Zaidi, AKM. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. The Lancet Infectious Diseases, 13: 1057-1098,
- Lee, J.H.: Kim, Y.G; Cho, M.H. and Lee, J. (2014). ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. Microbiol. Res., 169(12): 888-896.
- Li, M.; Zhu, L. and Lin, D. (2011). Toxicity of ZnO nanoparticles to *Escherichia coli*: mechanism and the influence of medium components. Environ. Sci. Technol., 45(5): 1977-1983.
- Liu, W., Lv, G., Mei, H., Zhan, P., Stielow, J. B. et al., (2018).** Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Studies In Mycology*. 89: 153–175 p
- Livak , K. J. and Schmittgen , T. D.(2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantification PCR and the 2- ct method . Methods . 25 (4): 402 - 408.

- Lunder M. (1992).** Is *Microsporium Canis* infections about to become a serious dermatological problem? *Dermatology* 184: 87-89 p
- M.T. Postek, K.S. Howard, A.H. Johnson and K.L. McMichael, (1980). Scanning Electron Microscopy: A Student's Handbook, (Ladd Research Ind., Inc. Williston, VT.,.
- Martinez-Rossi, N. M., Bitencourt, T. A., Peres, N. T. A., Lang, E. A. S., Gomes, E. V., Quaresimin, N. R., and et al., (2018).** Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. *Frontiers in Microbiology*. 9(1108) : 18 p
- Massiha, A. and Muradov, P. Z. (2015).** Comparison of Antifungal Activity of Extracts of Ten Plant Species and Griseofulvin Against Human Pathogenic Dermatophytes, *Med Sci*. 17(10) : 7 p
- Mendling, W., El shazly, M. A. and Zhang, L. (2020).** Clotrimazole for Vulvovaginal Candidosis: More Than 45 Years of Clinical Experience (Review). *Pharmaceuticals*. 13(274) : 23 p
- Mendoza, L., Taylor, J. W. and Ajello, L. (2002). The class mesomycetozoa: a heterogeneous group of microorganisms at the animal–fungal boundary. *Annu Rev Microbiol*. 56 : 315–344 p
- Mendoza, M. H., Mendoza, J. H., Alonso, J. M., Rey, J. M. and Sanchez, S. et al., (2010).** A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporium Canis* from stray cats. *Rev Iberoam Micol*. 27(2): 62–65 p
- Metin, B. and J. Heitman, (2017).** Sexual reproduction in dermatophytes. *Mycopathologia*. 182 (1-2): 45–55.
- Mihali, C. V., Buruiana, A., Turcus, V., Covaci, A. and Ardelean, A. (2012).** Comparative studies of morphology and ultrastructure in two common species of dermatophytes: *Microsporium Canis* and *Microsporium gypseum*. *Annals of RSCB*. 17 (1): 85-89 p
- Mohammed B. T., 2021. “Evaluation of mineral- , nano -zinc , and fluconazole interaction on some growth characteristics of *Trichophyton rubrum* and *Microsporium canis*,”.

- MSPH, J. W. , ROSENFELD, S. and Stone, M. S. (2015).** Diagnosis and Management of Tinea Infections. *American Family Physician*. 90(10):702-711p.
- Murthy, P.S. Venupopalan, V.P: Sahoo, P.: Dhara, S; Das, A.; Tyagi, A,K. and Saini, G. (2011), Gallinum Oxide nanoparticles Induced Inhibition of Bacterial Adhesions and Biofilm formation. Nanoscience, Engineering and Technology, International Conference on Chennai. Tól-06 (2013) Extracellular synthesis
- Muszevska, A., Stepniewska-Dziubinska, M. M., Steczkiewicz, K., Pawlowska, J., Dziedzic, A. and Ginalski, K. (2017).** Fungal lifestyle reflected in Serine protease repertoire. *Scientific Reports.*, 7: 1-12 p
- Narayanan, K. B., and Sakthivel, N.(2011), Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents, *Advances in Colloid and Interface Science* 169(2). PP 59–79.
- Ndungutse, V., Mereddy, R. and Sultanbawa, Y. (2015).** Bioactive Properties Of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Stipe Extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*. 10 p
- Nizam, T. M., Binting, R. A., Saari, S. M., Kumar, T. V., Muhammad, M., Satim, H., Yusoff, H. and Santhanam, J. (2016).** In Vitro Antifungal Activities against Moulds Isolated from Dermatological Specimens. *Malays J Med Sci*. 23(3): 32-39 p
- Nurani, S. J., Saha, C. K., Md. Khan, A. R. and Sunny, S. M. H. (2015).** Silver Nanoparticles Synthesis, Properties, Applications and Future Perspectives: A Short Review. *IOSR Journal of Electrical and Electronics Engineering*. 10 (6) : 117-126 p
- Ohst, T., Graser, Y., Presber, W., de Hoog, S., and Stavrakieva, V. (2004).** Origins of Microsatellite Diversity in the *Trichophyton rubrum* T. *violaceum* Clade (Dermatophytes). *Journal of clinical microbiology*. 42 (10) : 4444–4448 p.

- Osonga, F J., Akgul, A., Yazgan, I., Akgul, A., Eshun, G. B., Sakhaee, L., and Sadik, O. A. (2020).** Size and Shape-Dependent Antimicrobial Activities of Silver and Gold Nanoparticles: A Model Study as Potential Fungicides. *Molecules*, 25(2682): 1-19 pp
- Ouf, S. A., El-Adly, A. A. and Mohamed, A. H. (2015).** Inhibitory effect of silver nanoparticles mediated by atmospheric pressure air cold plasma jet against dermatophyte fungi. *Journal of Medical Microbiology*. 64: 1151- 1161 p
- Owaid M.N., Ibraheem I.J., 2017. Mycosynthesis of nanoparticles using edible and medicinal mushrooms. *Eur. J. Nanomed.*, , 9(1), 5-23.
- Owaid M.N., Mineral elements content in two sources of *Agaricus bisporus* in Iraqi market. *J. Advanced App. Sci.*, 2015, 3(2),46-50.
- Panigrahi, T. (2013).** Synthesis and characterization of silver nanoparticles using leaf extract of *azadirachta indica* . a thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in Life Science. India.
- Pasquetti, M., Min, A. R. M., Scacchetti, S., Dogliero, A., and Peano, A. (2017).** Infection by *Microsporium Canis* in Paediatric Patients: A Veterinary Perspective. *Vet. Sci.* 4(46): 6 p
- Patel, S. (2017).** A critical review on Serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergol Immunopathol (Madr)*. ;45(6):579-591 pp
- Pereira, F. O., Lima, E. O., Wanderley, P. A., Viana, F. A. C., de Lima, R. B. and de Sousa, F. B. (2011).** Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* jowitt ex bor. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42: 233-242 p
- Pereira, L., Dias, N., Carvalho, J., Fernandes, S., Santos, C. and Lima, N. (2014).** Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles

- against *Trichophyton rubrum*. Journal of Applied Microbiology. 117, 1601-1613 pp
- Pereira, L., Dias, N., Carvalho, J., Santos, C., Lima, N. and Fernandes, S. (2013).** Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *Journal of Applied Microbiology*. 117: 1601-1613 p
- Peres, N. T. D., Maranhão, F. C. A., Rossi, A. and Rossi N. M. M. (2010).** Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance (Review). *An Bras Dermatol.* ;85(5):657-667.
- Plempel, M. (1982). On the action kinetics of clotrimazole. *Chemotherapy* 28 (Suppl 1), 22–31.
- Ponarulselvam, S.; Panneerselvam, C.; Murugan,K.; Aarthi, N.; Kalimuthu,K. and Thangamani,S. (2011).**Synthesis of silver nanoparticles using leaves of *Catharanthus roseus* Linn. G. Don and their antiplasmodial activities. *Asian Pac Journal Trop Biomed*. 2012.
- Pourianfar, H. R. and Rezaeian, S. (2016).** Antimicrobial properties of the button mushroom, *Agaricus bisporus*: A mini-review. *International Journal of Advanced Research*, 4(1): 426- 429 pp
- Ravishankar Rai, V. and Jamuna Bai, A. (2011). Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. In: Mendez-Vilas A, ed. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Formatex Res. Center. 197- 607
- Reeda, G. 2021, control of dermatophytes *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* using green nano extracts, MSC. Thesis submitted to the college of Education pure Science University of Karbala. Karbala. Iraq.
- Reeda, G., Mohammed, B, T; bashi, A, M. 2021. Use of Green nano Extracts in the control of *Trichophyton rubrum* and, *Annals of S.C.B.* 25(6): 3996-4010.

- Robati, A. K., Khalili, M., Hazaveh, S. J. H. and Bayat, M. (2018).** Assessment of the subtilis in genes in *Trichophyton rubrum* and *Microsporum Canis* from dermatophytosis., *Comparative Clinical Pathology* 27: 1343–1347 p .
- Rodwell GE, J Bayles, CL Towersey, L Aly R 2008 “The prevalence of dermatophyte infection in patients infected with human immunodeficiency virus,” *International Journal of Dermatology*.47 (4): 339–343.
- Rónavári, A., Igaz, N., Gopisetty, M. K., Szerencsés, B., Kovács, D. et al., (2018).** Biosynthesized silver and gold nanoparticles are potent antimycotics against opportunistic pathogenic yeasts and dermatophytes. *International Journal of Nanomedicine*.,13: 695–703 pp.
- Safwat M.S.A, Al Kholi M.A.J., 2006. Recent trends, reality and future in the production, manufacture and marketing of medicinal and aromatic plants. The Egyptian Association for producers, manufacturers and exporters of medicinal and aromatic plants (Asmap.), Giza, Egypt,
- Sagar, K. and Vidyasagar G. M. (2013).** Anti-dermatophytic activity of some traditionally used medicinal plants of North Karnataka Region. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 3 (2): 77-83pp
- Sambrook, H. C. (1989).** *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold spring harbor, NY.
- Sami, R., Khojah, E., Helal, M., Elhakem, A., Benajiba, N., Alharbi, M., and Alkaltham, M. S. (2021).** Effect of Coatings Using Titanium Dioxide Nanoparticles and Chitosan Films on Oxidation during Storage on White Button Mushroom. *Crystals*, 11(603): 1-12p
- Sandven, P. and Lassen, J. (1999).** Importance of selective media for recovery of yeasts from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* 37(11): 3731-3732.

- Shang, X., Tan, Q., Liu, R., Yu, K., Li, P. and Zhao, G. P. (2013).** In vitro anti-Helicobacter pylori effects of medicinal mushroom extracts, with special emphasis on the Lion's Mane mushroom, *Hericium erinaceus* (higher basidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms*, 15: 165–174.
- Sharma, N., Ndaik, S. J. and Kumar, S. (2015).** Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 88(3) : 1689-1698 p
- Sheidaei S, Jaafarnejad F, Najafzadeh M, Rajabi O, Sadeghi T, Dadgar S. 2018. Comparison of the Effect of Vaginally Administered Coconut Oil and Clotrimazole on Candida Species. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility*.;20(12):58–66.
- Shenashen, M.A.; El-Safty, S.A. and Elshehy, E.A.(2014)** Synthesis, morphological control, and properties of silver nanoparticles in potential applications. *Part Part Syst Charact*. 293-316.
- Sosinska, G. J., de Groot, P. W., Teixeira de Mattos, M. J., Dekker, H. L., de Koster, C. G., Hellingwerf, K. J. & Klis, F. M. (2008). Hypoxic conditions and iron restriction affect the cell-wall proteome of *Candida albicans* grown under vagina-simulative conditions. *Microbiology* 154, 510–520.
- Sriram, T. and Pandidurai, V. (2014).** Synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Psidium guajava* and its antibacterial activity against pathogens. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*.3(3): 146-152 p
- Summerbel, R. C. and Weitzman. I, (1995).** The Dermatophytes (Reviews). *CLINICAL MICROBIOLOGY*. 8(2): 240-259p.
- The center for food security & public Health (2013).** Dermatophytosis. *Ringworm, Tinea*, 13p
- Tiwari, N., Pandit, R., Gaikwad, S., Gade, A. and Rai, M. (2016).** Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by *pet als* extract of *Rosa indica* L., its formulation as nail paint and evaluation of antifungal

- activity against fungi causing onychomycosis. *IET Nanobiotechnol.*,11(2): 205-211 pp.
- Torres–Guerrero, E., González de Cossío, A. C., Segundo Z. C., Cervantes, O. R. A., Ruiz- Esmenjaud, J. and Arenas, R. (2016).** *Microsporum Canis* and other dermatophytes isolated from humans, dogs and cats in Mexico City. *Glob Dermatol.*, 3(2): 275-278 p
- Trease, G. E. and Evans W. C. (1994).** Pharmacognosy XII Ed. London, Baillere, London.
- Vadlapudi, V. and Kaladhar, D.S.V.G.K. (2014). Review, Green Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles. *Middle-East J. Sci. Res.*, 19 (6): 834 842.
- Vaseem, M., Hahn, Y. and Umar, A. (2010).** CHAPTER 4: ZnO Nanoparticles: Growth, Properties, and Applications. *American Scientific Publishers.* 5 :36 p
- Verma, K.D. (2018).** Cuscuta Reflexa Extract Based Green Synthesis Of Silver nanoparticles. ISSN (PRINT): 2393-8374, (ONLINE): 2394-0697, VOLUME-5, ISSUE-2.
- Viani, F. C., Santos, J. I., Paula, C. R., Larson, C. E. And Gambale, W. (2001).** Production of extracellular enzymes by *Microsporum Canis* and their role in its virulence. *Medical Mycology.* 39 : 463-468 p
- Wang, L., Ma, L., Leng, W., Liu, T., Yu, L. and Yang, J. et al., (2006).** Analysis of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* expressed sequence tags. *BMC Genomics.* 7(255) : 13p
- Waqas, H. M., Akbar, M., Khalil, T., Ishfaq, M., Aslam, N., Chohan, S. A., Siddiqi, E. H. And Iqbal, M. S. (2018).** Identification of natural antifungal constituents from *Agaricus bisporus* (j. E. Lange) imbach. *Applied ecology and environmental research* 16(6): 7937-7951 pp

- Welsh, O. Gonzalez, G. M. (2016).** Dermatophytosis (Tinea) and Other Superficial Fungal Infection. *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*. 245-260p.
- White, S., Kadavakollu, S., Stailey, C. and Kunapareddy, C. S. (2014).** Clotrimazole as a Cancer Drug: A Short Review. *Med Chem (Los Angeles)*.; 4(11): 722–724.
- Wilson D., Hebecker B., Moyes D.L., Miramon P., Jablonowski N., Wisgott S., Allert S., Naglik J.R., Hube B. 2013. Clotrimazole dampens vaginal inflammation and neutrophil infiltration in response to *Candida albicans* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* ;57:5178–5180. doi: 10.1128/AAC.01244-13
- Workowski, K. A. and Bolan, G. A. (2015).** sexually transmitted diseases treatment guidelines, National library of medicine. 5 (64): 1-137p
- Xue, B.; He, D.; Gao, S.; Wang, D.; Yokoyama, K. and Wang, L. (2016).** Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* *Int J Nanomedicine*.11: 1899–1906.
- Yassen; S, G. 2021, Molecular Diagnosis of some Medicinal plants and studying the Extracts on some Dermato phytes compared with Nano-Zinc. Ph. D. Thesis, University of Karbala, Karbala, Iraq.
- Yassin S. G. and Mohammed B. T., 2020 “Molecular and chemical properties of a common medicinal plants in Iraq,” vol. 7526, no. October 2019, pp. 7515–7526,.
- Yassin S. G. and Mohammed B. T., 2021 “Evaluation of Mineral, Nano-zinc and Fluconazole Interaction on Some Growth Characteristics of *Trichophyton Rubrum* and *Microsporum Canis*,” *Biochem. Cell. Arch.*, vol. 21, no. 1, pp. 1359–1369,.
- Youngchim, S., Pornsuwan, S., Nosanchuk, J. D., Dankai, W. and Vanittanakom, N. (2011).** Melanogenesis in dermatophyte species in vitro and during infection. *Microbiology*. 157: 2348–2356 p.

الملاحق

ملحق (1)

تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلة A

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1209 bits(1340)	0.0	673/675(99%)	0/675(0%)	Plus/Plus

Query 1 AGGATCATTATTGAATTATGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGC 60
Sbjct 12 71

Query 61 ACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTAGTCTTTTTTCAGGTAT 120
Sbjct 72 131

Query 121 TGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTCTTTGCTGGATGTAAGGACTTGCAGTGTGAAAAC 180
Sbjct 132 191

Query 181 AGTGTTGTCCTTTACCTTGGCCATGGAATCTTTTTCCTGTTAGAGTCTATGTTATTCATT 240
Sbjct 192C..... 251

Query 241 ATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTATGCCTATGAAAATTATTATAC 300
Sbjct 252 311

Query 301 AACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGACCGCAGCGAAATGCGATA 360
Sbjct 312A..... 371

Query 361 AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCT 420
Sbjct 372 431

Query 421 TGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTGCATTATATTCTCAACTCTCCAATACTTT 480
Sbjct 432 491

Query 481 GTTGTAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGTTTGTGGCTCCTTACTTGGGGTCAGCTCCT 540
Sbjct 492 551

Query 541 CTGAAATGCATTAGCGGAATCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTATCTACTACT 600
Sbjct 552 611

Query 601 GGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATG 660
Sbjct 612 671

Query 661 CTTGACCTCAAATCA 675
Sbjct 672 686

ملحق (2)

تسلسل القواعد النيتروجينية للعزلة B

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1231 bits(1364)	0.0	685/687(99%)	0/687(0%)	Plus/Plus

Query 1 CTGCGGAAGGATCATTATTGAATTATGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAG 60
Sbjct 5 64

Query 61 TATGTGCACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTAGTCTTTTT 120
Sbjct 65 124

Query 121 CAGGTATTGGAGGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTCTTGCTGGATGTAAGGACTGTCAGTG 180
Sbjct 125 184

Query 181 TGAAAACAGTGTCTGCCTTACCTTGGCCATGGAATCTTTTCCTGTTAGAGTCTATGTT 240
Sbjct 185 244

Query 241 ATTCATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGTCCTTACATGGGCTATGCCTATGAAAATT 300
Sbjct 245 304

Query 301 ATTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA 360
Sbjct 305 364

Query 361 TCGGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTG 420
Sbjct 365 424

Query 421 CGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGTCAATTATATTCTCAACTCTCCG 480
Sbjct 425A 484

Query 481 ATACTTTGTTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGTTTGTGGCTCCTTACTTGGGGTC 540
Sbjct 485 544

Query 541 AGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAATCGTCTGCGATCTGCCACAAGTGTGATAACTTAA 600
Sbjct 545T 604

Query 601 CTACACTGGCGAGGGGATTGCTTTCTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTC 660
Sbjct 605 664

Query 661 TTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAG 687
Sbjct 665 691

ملحق (3)

الستجیل بالبنك الجيني للعزلة A

Agaricus bisporus var. *bisporus* clone NeBa-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: MZ619063.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS MZ619063 675 bp DNA linear PLN 31-JUL-2021

DEFINITION *Agaricus bisporus* var. *bisporus* clone NeBa-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence.

ACCESSION MZ619063

VERSION MZ619063.1

KEYWORDS .

SOURCE *Agaricus bisporus* var. *bisporus*

ORGANISM *Agaricus bisporus* var. *bisporus*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;
Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Agaricaceae;
Agaricus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 675)

AUTHORS Nedal,W.H. and Ban,T.M.

TITLE The effect of some Green Nanopartical compound on some
physiological Genome sequences traits of some dermatophyte fungi

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 675)

AUTHORS Nedal,W.H. and Ban,T.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (26-JUL-2021) Teacher, education of Babylon, University
of Karbala college of education for pure science, iraq, Karbala
00964, Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES **Location/Qualifiers**

source 1..675
 /organism="Agaricus bisporus var. bisporus"
 /mol_type="genomic DNA"
 /variety="bisporus"
 /isolate="NeBa-1"
 /isolation_source="soil"
 /db_xref="taxon:192523"
 /clone="NeBa-1"
 /country="Iraq"
 /collected_by="Nedal Wahab Hameed, Ban Taha Mohamed"

misc_RNA <1..>675
 /note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
 ribosomal RNA, and internal transcribed spacer 2"

ORIGIN

1 aggatcatta ttgaattatg ttttctagat gggttgtage tggctcttcg gaggatgtgc
 61 acgctgtct ggacttcatt tcatccacc tgtgcacct ttgtagtctt ttcaggtat
 121 tggaggaagt ggtcagccta tcagctcttt gctggatgta aggacttgca gtgtgaaaac
 181 agtgtgtcc ttaccttg ccatggaatc ttttctctg tagagtctat gttattcatt
 241 atactcttag aatgtcattg aatgtcttta catgggctat gcctatgaaa attattatac
 301 aacttcagc aacggatctc ttgctcttcg catcgatgaa gaccgcagcg aaatgcgata
 361 agtaatgtga attgcagaat tcagtgaatc atcgaatctt tgaacgcac ttgcgctct
 421 tggattccg aggagcatgc ctgtttgagt gtcattatat tctcaactct ccaatacttt
 481 gttgtaaagg agagcttggg ttgtggaggt ttgctggctc cttacttggg gtcagctct
 541 ctgaaatgca ttagecgaat cgtctcgat ctgccacaag tgtgataact tctctacact
 601 ggcgagggga ttgctttctg atgttcagct tctaactgta taaggacaat ttcttgaatg
 661 cttgacctca aatca

//

ملحق (4)

الستجیل بالبنك الجيني للعزلة B

Agaricus bisporus var. *bisporus* clone NeBa-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
GenBank: MZ798947.1

FASTA Graphics

Go to:

LOCUS MZ798947 687 bp DNA linear PLN 20-AUG-2021

DEFINITION *Agaricus bisporus* var. *bisporus* clone NeBa-2 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MZ798947

VERSION MZ798947.1

KEYWORDS.

SOURCE *Agaricus bisporus* var. *bisporus*

ORGANISM *Agaricus bisporus* var. *bisporus*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Basidiomycota; Agaricomycotina;

Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Agaricaceae;

Agaricus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 687)

AUTHORS Nedal,W.H. and Ban,T.M.

TITLE The effect of some Green Nanopartical compound on some physiolygical Genome sequences traits of some dermatophyte fungi

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 687)

AUTHORS Nedal,W.H. and Ban,T.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (15-AUG-2021) Teacher, education of Babylon, University of Karbala college of education for pure science, iraq, Karbala

.00964 Iraq

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..687


```

/      organism="Agaricus bisoporus var. bisoporus"
/      mol_type="genomic DNA"
/      variety="bisoporus"
/      isolate="NeBa-2"
/      isolation_source="soil"
/      db_xref="taxon:192523"
/      clone="NeBa-2"
/      country="Iraq"
/      collected_by="Nedal Wahab Hameed, Ban Taha Mohamed"
misc_RNA    <1..>687
/      note="contains internal transcribed spacer 1, 5.8S
          ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and large
          subunit ribosomal RNA"

```

ORIGIN

```

1      ctgcggaagg atcattattg aattatgttt tctagatggg ttgtagctgg ctcttcggag
61     tatgtgcacg cctgtctgga cttcatttcc atccacctgt gcacctttg tagtctttt
121    caggattgg aggaagtggc cagcctatca gctctttgct ggatgtaagg acttgcagtg
181    tgaanaacagt gctgtccttt accttgcca tggaatcttt ttctgttag agtctatgtt
241    atcattata ctctagaat gtcattgaat gctttacat ggctatgcc tatgaaaatt
301    attatacaac ttcagcaac ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa cgcagcgaaa
361    tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcacc gaatctttga acgcatcttg
421    cgctccttgg tattccgagg agcatgctg tttgagtgtc attatattct caactctccg
481    atactttggt gtaaaggaga gcttgattg tggaggttg ctggctcctt acttggggtc
541    agctctctg aaatgcatta gcggaatcgt ctgcgatctg ccacaagtgt gataacttaa
601    ctacactggc gaggggattg ctttctgatg ttcagettct aatcgtctaa ggacaatttc
661    ttgaatgctt gacctcaaat caggtag
//

```

ملحق (5)

تسلسل القواعد النيتروجينية للتشخيص الجزيئي لفطر المشروم *Agaricus bisporus*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. A MZ619063.1 Agaricus bisporus IRAQ											
2. B MZ798947.1 Agaricus bisporus IRAQ	0.003										
3. 1 MK583568.1:India	0.003	0.000									
4. 2 CP015465.1:Netherlands	0.003	0.000	0.000								
5. 3 GU327642.1:USA	0.003	0.000	0.000	0.000							
6. 4 MW642426.1:Oman: Barka	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000						
7. 5 KF848691.1:France	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
8. 6 AF465402.1:France	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
9. 7 KF848692.1:France:Lorient	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
10. 8 KF848690.1:France:Lorient	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
11. 9 AJ418716.1:United kingdom	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
12. 10 AJ418717.1:United kingdom	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

		10	20	30	40	50
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	1	AGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGTATGTGCACGCCTGTCTGGACTT				50
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	1				50
1 MK583568.1:India	1				50
2 CP015465.1:Netherlands	1				50
3 GU327642.1:USA	1				50
4 MW642426.1:Oman: Barka	1				50
5 KF848691.1:France	1				50
6 AF465402.1:France	1				50
7 KF848692.1:France:Lorient	1			Y	50
8 KF848690.1:France:Lorient	1	..R.....				50
9 AJ418716.1:United kingdom	1				50
10 AJ418717.1:United kingdom	1	..G.....				50

		60	70	80	90	100
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	51	CATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTGTAGTCTTTTCAGGATTTGGAGG				100
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	51				100
1 MK583568.1:India	51				100
2 CP015465.1:Netherlands	51				100
3 GU327642.1:USA	51				100
4 MW642426.1:Oman: Barka	51				100
5 KF848691.1:France	51				100
6 AF465402.1:France	51				100
7 KF848692.1:France:Lorient	51				100
8 KF848690.1:France:Lorient	51				100
9 AJ418716.1:United kingdom	51				100
10 AJ418717.1:United kingdom	51				100

		110	120	130	140	150
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	101	AAGTGGTCAGCCATCAGCTCTTTGCTGGATGTAAGGACTTGCAAGTGA				150
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	101				150
1 MK583568.1:India	101				150
2 CP015465.1:Netherlands	101				150
3 GU327642.1:USA	101				150
4 MW642426.1:Oman: Barka	101				150
5 KF848691.1:France	101				150
6 AF465402.1:France	101				150
7 KF848692.1:France:Lorient	101				150
8 KF848690.1:France:Lorient	101		Y	Y	150
9 AJ418716.1:United kingdom	101				150
10 AJ418717.1:United kingdom	101		T	C	150

		160	170	180	190	200
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	151	AAACAGTGTGTGTCCTTTACCTTGGCCATGGAATCTTTTCCTGTTAGAGT				200
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	151C.....				200
1 MK583568.1:India	151C.....				200
2 CP015465.1:Netherlands	151C.....				200
3 GU327642.1:USA	151C.....				200
4 MW642426.1:Oman: Barka	151C.....				200
5 KF848691.1:France	151C.....				200
6 AF465402.1:France	151C.....				200
7 KF848692.1:France:Lorient	151C.....				200
8 KF848690.1:France:Lorient	151C.....				200
9 AJ418716.1:United kingdom	151C.....				200
10 AJ418717.1:United kingdom	151C.....				200

		210	220	230	240	250
A	MZ619063.1 Agaricus bisporus	201	CTATGTTATT	CATTATACTCTTAGAATGTCATTGAATGCTTTTACATGGG	250	
B	MZ798947.1 Agaricus bisporus	201	250
1	MK583568.1:India	201	250
2	CP015465.1:Netherlands	201	250
3	GU327642.1:USA	201	250
4	MW642426.1:Oman: Barka	201	250
5	KF848691.1:France	201	250
6	AF465402.1:France	201	250
7	KF848692.1:France:Lorient	201	250
8	KF848690.1::France:Lorient	201	250
9	AJ418716.1:United kingdom	201	250
10	AJ418717.1::United kingdom	201	250

		260	270	280	290	300
A	MZ619063.1 Agaricus bisporus	251	CTATGCCATGAAAATTA	TTATACAACCTTCAGCAACGGATCTCTTGGCT	300	
B	MZ798947.1 Agaricus bisporus	251	300
1	MK583568.1:India	251	300
2	CP015465.1:Netherlands	251	300
3	GU327642.1:USA	251	300
4	MW642426.1:Oman: Barka	251	300
5	KF848691.1:France	251	300
6	AF465402.1:France	251	300
7	KF848692.1:France:Lorient	251	300
8	KF848690.1::France:Lorient	251	300
9	AJ418716.1:United kingdom	251	300
10	AJ418717.1::United kingdom	251	300

		310	320	330	340	350
A	MZ619063.1 Agaricus bisporus	301	CTCGCATCGATGAAGACCGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA	350		
B	MZ798947.1 Agaricus bisporus	301A.....	350
1	MK583568.1:India	301A.....	350
2	CP015465.1:Netherlands	301A.....	350
3	GU327642.1:USA	301A.....	350
4	MW642426.1:Oman: Barka	301A.....	350
5	KF848691.1:France	301A.....	350
6	AF465402.1:France	301A.....	350
7	KF848692.1:France:Lorient	301A.....	350
8	KF848690.1::France:Lorient	301A.....	350
9	AJ418716.1:United kingdom	301	303
10	AJ418717.1::United kingdom	301	303

		360	370	380	390	400
A	MZ619063.1 Agaricus bisporus	351	GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCATCTTGGCTCCTTGGTAT	400		
B	MZ798947.1 Agaricus bisporus	351	400
1	MK583568.1:India	351	400
2	CP015465.1:Netherlands	351	400
3	GU327642.1:USA	351	400
4	MW642426.1:Oman: Barka	351	400
5	KF848691.1:France	351	400
6	AF465402.1:France	351	400
7	KF848692.1:France:Lorient	351	400
8	KF848690.1::France:Lorient	351	400
9	AJ418716.1:United kingdom	303	303
10	AJ418717.1::United kingdom	303	303

		410	420	430	440	450
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	401	TCCGAGGAGCATGCCTGTTGAGTGTCA	TATATTCTCAACTCTCCAATA			450
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	401G.....				450
1 MK583568.1:India	401				450
2 CP015465.1:Netherlands	401				450
3 GU327642.1:USA	401				450
4 MW642426.1:Oman: Barka	401				450
5 KF848691.1:France	401				450
6 AF465402.1:France	401				450
7 KF848692.1:France:Lorient	401M.....				450
8 KF848690.1::France:Lorient	401				450
9 AJ418716.1:United kingdom	303				303
10 AJ418717.1::United kingdom	303				303

		460	470	480	490	500
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	451	CTTTGTTGTAAGGAGAGCCTTGGATTGTGGAGGTTT	GCTGGCTCCTTACT			500
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	451				500
1 MK583568.1:India	451				500
2 CP015465.1:Netherlands	451				500
3 GU327642.1:USA	451				500
4 MW642426.1:Oman: Barka	451				500
5 KF848691.1:France	451				500
6 AF465402.1:France	451				500
7 KF848692.1:France:Lorient	451				500
8 KF848690.1::France:Lorient	451R.....C.....M.....				500
9 AJ418716.1:United kingdom	303				303
10 AJ418717.1::United kingdom	303				303

		510	520	530	540	550
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	501	TGGGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAATCGTC	TGGCATCTGCCA			550
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	501				550
1 MK583568.1:India	501				550
2 CP015465.1:Netherlands	501				550
3 GU327642.1:USA	501				550
4 MW642426.1:Oman: Barka	501				550
5 KF848691.1:France	501				550
6 AF465402.1:France	501				550
7 KF848692.1:France:Lorient	501				550
8 KF848690.1::France:Lorient	501C.....				550
9 AJ418716.1:United kingdom	303				303
10 AJ418717.1::United kingdom	303				303

		560	570	580	590	600
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	551	CAAGTGTGATAACTTATCTACACTGGCGAGGGGATTGCT	TTTCTGATGTTTC			600
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	551A.....				600
1 MK583568.1:India	551				600
2 CP015465.1:Netherlands	551				600
3 GU327642.1:USA	551				600
4 MW642426.1:Oman: Barka	551				600
5 KF848691.1:France	551				600
6 AF465402.1:France	551				600
7 KF848692.1:France:Lorient	551				600
8 KF848690.1::France:Lorient	551				600
9 AJ418716.1:United kingdom	303				303
10 AJ418717.1::United kingdom	303				303

		610	620	630
A MZ619063.1 Agaricus bisporus	601	AGCTTCTAATCGTCTAAGGACAATTTCTTGAATGCT		636
B MZ798947.1 Agaricus bisporus	601		636
1 MK583568.1:India	601		636
2 CP015465.1:Netherlands	601		636
3 GU327642.1:USA	601		636
4 MW642426.1:Oman: Barka	601		636
5 KF848691.1:France	601		636
6 AF465402.1:France	601		636
7 KF848692.1:France:Lorient	601		636
8 KF848690.1::France:Lorient	601		636
9 AJ418716.1:United kingdom	303		303
10 AJ418717.1::United kingdom	303		303

The Abstract

The current study could be included in attempting studies to find alternatives to antibiotics in the treatment of skin fungus. The studies conducted in the graduate laboratory at the Faculty of Education for Pure Sciences at Karbala University and in the Center for the Maintenance and Restoration of Manuscripts and the care of researchers in the Holy Husseini threshold from 1/11/2020 to 1/11/2021. With the aim of studying the effect of the water and alcohol extract of mushrooms *Agaricus bisporus* which is registered in the world genetic bank Genbank under the two serial numbers MZ619063.1 and MZ798947.1 and hybrid compounds (AgawNps + ZnoawNps + AgaaNps + ZnoaaNps) on them from the same mushroom mushrooms in inhibiting the growth of skin fungi *Trichophyton rubrum* and *Microsporium Canis* And test different symbols with the fungal antibody Clotrimazole in inhibiting the growth of the two mushrooms that under study.

Some tests were carried out on hybrid nanocarriers which is a visual spectrophotometer for ultra violet ray and infrared ray (FT – IR), (XRD) X-ray diffraction, (SEM) Scanning Election Microscope to verify the nano compounds that extracted from alcohol-water fungus.

Real time PCR (qrt-PCR) result showed that the gene expression of the Serine protease which related to the *Trichophyton rubrum* and control group the specific primer of B-TUBULIN where there was a clear decrease in the genetic expression of Serine protease in treatment (1,10)and increased treatment (18,22) compared to the result of gene expression of the control group equivalent to a genetic expression of (fold) chang1).

As for the of the Serine protease gene expression for the *Microsporium Canis* mushrooms and primer of B-TUBULIN control group, there was a clear increase in the expression of Serine protease in both the treatment (27, 24, 13, 9) compared to the result of the gene expression of the control group equivalent to a genetic expression (fold change1).

The results showed an inverse relationship between ct values and gene expression, the higher their value, the lower the gene expression (inversely related to the amount of the starting mold that means higher ct value indicates lower levels of gene expression or amplification gene).

the various constructions (80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10) prepared from alcoholic and aquatic extracts, hybrid nanocarriers and antifungal, and results were obtained by colony diameter Sabourand Dextrose Agar and the colony's weight on the center of Sabourand Dextrose broth after 14 days of nursing of studied fungi and the study of the shape of the fungal colonies on the Sabourand Dextrose Agar in addition to preparing microscopic slices.

The results showed that hybrid nanocarriers (ZnoaaNps, AgaaNps) influenced in the diameter and dry weight rate of fungal colonies largely in inhibiting the growth of *Microsporum Canis*, *Trichophyton rubrum*, and their effect was similar to that of Clotrimazole, while hybrid nanocomposites (AgoawNps, ZnoawNps) had less impact on the diameter rate and dry weight of the innate colonies of the studied fungi.

The results also showed that the alcohol and water extract of *Agaricus bisporus* did not significantly affect the diameter rate and dry weight of the fungal colonies, but increased the growth rate of diameter and dry weight of the fungal colonies to parallel the control sample.

ZnoaaNps hybrid nanocars, AgaaNps were more inhibited at a diameter rate (1, 1.23) respectively for *Trichophyton rubrum* mushrooms and (1.16, 1.03) respectively for *Microsporum Canis* mushrooms

Whereas The focus was 20% less influential at a diameter of 3.41, while the 50% concentration was the most discouraged at a diameter rate of 2.18%.

As for the dry weight of fungal colonies, hybrid nanocarriers (ZnoaaNps, AgaaNps) were the most inhibiting of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum Canis* weighing (0.045, 0.016), respectively, for the *Trichophyton rubrum* mushrooms and (0.039, 0.019) respectively for *Microsporum Canis*.

The focus effect was 10% less influential at a weight rate of 0.086, while the 50% concentration was the most influential at a weight rate of 0.045.

The impact of hybrid nanocars (ZnoawNps, AgawNps) was less influential than the hybrid nanocars of the two fungi ZnoaaNps, AgaaNps, *Microsporum Canis*, *Trichophyton rubrum*

The most discouraging diameter rate for the *Trichophyton rubrum* mushrooms (1.56, 1.10) respectively and (0.96, 1.06) respectively for *Microsporum* mushrooms

As for the dry weight of fungal colonies, the ZnoawNps, AgawNps were less influential than the ZnoaaNps hybrid nanocars, AgaaNps, and the dry weight rate of

Trichophyton rubrum mushroom colonies was the most discouraged (0.032), 0.016) respectively and (0.040, 0.014) respectively for *Microsporum Canis* mushrooms

The results showed that green alcoholic extracts from zinc and nanoscale silver inhibited the growth of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum Canis*, thus equivalent to the effect of the antifungal Clotrimazole.

This study is the first of its kind in the field of converting the alcohol and water extract of *Agaricus bisporus* mushrooms into nano-extracts of silver and zinc in inhibiting the growth and effectiveness of skin fungi and working to find alternatives to commonly used antifungals.

Several microscopic tests were carried out on the fungi studied and explained the effect of different transactions on fungal azzot and the contrast between decomposition or deformities in fungal spinning and protoplasm separation in some areas and their concentration in other areas in addition to the disappearance of small coonides and deformation of large conidotes, there are internal abnormalities that can be observed during microscopic examination, the most prominent of which was the protoplasm cluster within the fungal cells and the separation of the plasma membrane and another effect that could be observed is the formation of largely verbal types.



**Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Kerbala /
College of Education
for Pure Science- Department of Biology**

**The effect of nanocomposites prepared from
the fungus *Agaricus bisporus* On the fungi
Trichophyton rubrum and *Microsporum canis***

A Thesis

**Submitted to the council of the college of Science / Kerbala university
in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science
in Biology / Fungi**

By

Nedal Wahab Hameed

Supervised by

Prof. Dr. Ban Taha Mohammed

2021 AD

1443 AH