جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم علوم الحياة

دراسة بعض عوامل الضراوة لأنواع من بعض خمائر الـ *Candida* spp. وأعفان الـ *Aspergillus* spp. المعزولة من الأذن الخارجية والبصل وعلاقتها بنشاط المايتوكوندريا

نبيل طه يونس حسن البدراني

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة / علم النبات

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتورة
مها أكرم محمد علي الرجبو

الأستاذ المساعد الدكتور
محمد عبدالغفور أحمد يونس القطّان

1444هـ

2022م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية عزل وتشخيص الفطريات المسببة لالتهاب الأذن الخارجية الفطري EAC Otomycosis وكذلك عزل وتشخيص الفطريات المسببة لتلف البصل ودراسة بعض عوامل الضراوة التي تعد في الغالب منتجات أيضية لمعظم الفطريات المعزولة سواءَ أكانت عزلات مرضية أم بيئية، والكشف عن سم الاوكرا A في البصل ودراسة وظائف (جهد تأكسد) المايتوكوندريا للفطريات المعزولة سواءً أكانت عزلات مرضية أم بيئية في الظروف الطبيعية وعند معاملتها بالمضادين الفطريين (نستاتين وفلوكونازول) ومركب الثايمول.

تم الحصول على 43 عزلة من الفطريات المسببة لالتهاب الأذن الخارجية الفطري EAC Otomycosis من مرضى مصابين بالتهاب الأذن الخارجية الفطري بنسبة 71.6% من المجموع الكلي للمسحات الأذنية والبالغ عددها 60 مسحة أذنية، 25 عزلة منها تعود لجنس الـ *Candida* spp. و11 عزلة تعود لجنس الـ *Aspergillus* spp. و7 إصابات مشتركة للجنسين المذكورين، شخصت جميع الفطريات بالطرق التقليدية من خلال الفحوصات المظهرية على طبق بتري فضلاً عن دراسة الصفات المجهرية، كما شخصت بالطرق الكيميائية الحيوية كاستعمال الوسط التفريقي Candida chromogenic agar واختبار التشخيص API-Candida system ، فكانت خميرة *Candida parapsilosis* أكثر أنواع الفطريات ظهوراً في هذه الدراسة.

وتضمنت الدراسة جمع نماذج عشوائية من البصل بنوعيه (الأحمر والأبيض) من أماكن مختلفة شملت أسواقاً ومحلاتٍ عديدة في مدينة الموصل وتم عزل وتشخيص أنواع مختلفة من الفطريات المسببة لتلف البصل بنوعيه، شملت فطر *Aspergillus* spp. وفطر *Penicillium* spp. وفطر *Fusarium* spp.، كما تم الكشف عن سم الاوكرا A بتقنية الـ ELISA ، وأظهرت النتائج وجود تراكيز مختلفة من سم الاوكرا A تراوحت مابين 0.004 ppb - 6.68 ppb للبصل الأحمر و0.06 ppb – 5.21 ppb للبصل الأبيض.

أظهرت نتائج اختبار عوامل الضراوة لعزلات المبيضات *Candida* spp. أن جميع عزلات *C.albicans* كونت أنبوب الإنبات ، أما قدرتها على إنتاج الغشاء الحيوي بطريقة الطبق فقد ظهرت 21 عزلة من أصل 24 عزلة كونت الغشاء الحيوي وبنسبة 84% تراوحت ما بين الضعيفة والقوية الإنتاجية للغشاء الحيوي.

أما نتائج اختبار إنتاج الإفرازات الخارجية والتي تتمثل بأنزيم الفوسفولايبيز والعامل المحلل للدم (الهيمولايسين) وأنزيم الإستريز فقد أظهرت وجود 9 عزلات منتجة لأنزيم الفوسفولايبيز من أصل 25 عزلة وبنسبة 36%، و12 عزلة منتجة للهيمولايسين بنسبة 48%، و6 عزلات منتجة لأنزيم الإستريز بنسبة 24%، أما نتائج اختبار إنتاج الأنزيمات الخارجية لعزلات *Aspergillus niger* المعزولة من

قناة الأذن الخارجية EAC ومن البصل فقد أشارات النتائج إلى ظهور 6 عزلات من فطر *Aspergillus niger* منتجة للهيمولايسين، و3 عزلات منتجة لأنزيم الإستريز من مجموع 11 عزلة من عينات قناة الأذن الخارجية EAC، كما أظهرت النتائج وجود 5 عزلات موجبة للهيمولايسين من أصل 20عزلة من فطر *Aspergillus niger* معزولة من البصل.

وأظهر المضاد الفطري النستاتين نشاطاً تثبيطياً ضد الخمائر والفطريات المعزولة من قناة الأذن الخارجية EAC أعلى من المضاد الفطري الفلوكونازول ومركب الثايمول عند التركيز 100µ/ml، وأظهر مركب الثايمول فعالية تثبيطية عالية ضد الفطريات الخيطية المعزولة عند نفس التركيز، ولم تظهر أي عزلة مقاومة لمركب الثايمول للخمائر والفطريات المعزولة، إذ كانت جميعها حساسة، مع ظهور عزلات مقاومة لكل من النستاتين والفلوكونازول.

بينت نتائج دراسة نشاط المايتوكوندريا تبايناً في فاعلية الخمائر والفطريات المعزولة باستعمال صبغة MitoTracker probes، إذ ظهر اللون الأحمر وتدرجاته الذي يشير إلى جهد التأكسد المتميز في المايتوكوندريا للعينات غير المعاملة بمضادات فطرية ومركب الثايمول، أمّا اللون الأخضر فقد ظهر بعدد قليل من العزلات الفطرية والذي يشير إلى انعدام جهد التأكسد للمايتوكوندريا، أما بقية الألوان والتدرجات اللونية والواقعة بين اللون الأحمر والأخضر والمتمثلة باللون الأصفر وتدرجاته والتي تشير إلى مستويات أقل نشاطاً للمايتوكوندريا فكانت الشائعة في الدراسة الحالية.

Summary

In this study, we aimed to isolate and diagnose the fungal species that could infect humans and cause otomycosis or infect the plant as the species that infect the onion. Furthermore, the virulence factors, which are mostly considered secondary metabolites, were identified and characterized for some of the isolated fungi of both pathogenic and environmental species. We focused also on detection of Ochratoxin A (OTA) in the onion and studied the mitochondrial function of the isolated fungi, and the effect of the antifungal agents (nystatin and fluconazole) in addition commercial thymol on isolated fungi.

Out of 60 human ear secretion specimens, 43 (71.6%) were positive for the Otomycosis causing-fungal species; of which 25 represent *Candida* spp., 11 *Aspergillus* spp., 7 were a mix of both species. The identification of the fungi species was carried out using classical well-known methods as macroscopic and microscopical observations. Other diagnostic media cultures and kits were used, such as chromogenic agar and the API-Candida system which showed that the *Candida* spp. Isolated in this study mainly were *Candida parapsilosis*.

Random samples of local onion were collected from Mosul city – Iraq, and several fungal species were identified including *Aspergillus* spp. (41%), *Penicillium* spp. (34%), *Aspergillus ochraceus* (13%), and *Fusarium* spp. (10%). ELISA test was used to detect the Ochratoxin A and showed various results, 0.004ppb-6.68ppb for Red onion and 0.06ppb-5.21ppb for White onion.

Results showed that all *Candida* spp. were able to produce the Germ tube as a virulence factor, whilst the biofilm formation on the plate was variable, out of 24 isolates, 21 isolates were shown to form weak and intense biofilm.

Extracellular secretions were also detected, the results showed that out of 25, 9 (36%) isolates were positive for phospholipase production, 12 (48%) produced hemolysin, and esterase was found in 6 isolates (24%). Out of 11 external auditory canal (EAC) isolates of *Aspergillus niger*, hemolysin was

produced in 6 isolates, and 3 isolates were positive for esterase production. Though onion isolates (20) showed to produce hemolysin in 5 isolates of *Aspergillus niger* only.

Whereas nystatin showed the highest inhibition activity against yeasts and the filamentous fungi species compared with fluconazole and thymol at 100 µg/ml, all the tested fungal species were sensitive to the commercial thymol but not for the nystatin and fluconazole, some were resistant.

The mitochondrial activity was also tested using specific MitoTracker probes. The non-treated (with antifungal or thymol) fungal species showed red color staining that refers to the distinct mitochondrial activity. The observed green color was weak, indicating the absence of the mitochondrial activity of the cell under the study. Furthermore, the detected yellow color in this experiment suggests suboptimal mitochondrial activity, which has represented most of the tested fungal species in this study.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
Mosul University / College of Science
Department of Biology

Study of some virulence factors for some *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. isolated from external ear and onion and it's relation to mitochondrial activity

Nabeel Taha Younis Hassan Al-Badrany

Ph.D. Thesis

Biology /Botany

Supervised By

Assist. Prof. Dr. Maha Akram Al-Rijabo

Assist. Prof. Dr. Muhammad A.Al-Kattan

1443 A.H. **2022 A.D.**