جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

فصلُ وتشخيصُ بعض مُركبات الأيض الثانوي لبعض أنواع فطريات الجنس *Ganoderma* وتقييم فعاليتها المضادة للبكتريا والأكسدة والسرطان. نينوى/ العراق

هبة فارس سعدون سلطان الطائي

أطروحة دكتوراه

علوم الحياة

بإشراف

أستاذ	أستاذ مساعد
الدكتور أياد جاجان الداؤدي	الدكتورة شمال يونس عبدالهادي

١٤٤٣هـ ٢٠٢١م

الخلاصة

جرت الدراسة في مختبر الفطريات في وحدة البحوث التابعة لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة الموصل، تناولت الدراسة المسح الميداني لفطريات التعفن الأبيض التي تعود لجنس *Ganoderma* المصاحبة لأنواع مختلفة من الأشجار، ومن مصادر زراعية مختلفة في مدينة الموصل للفترة من تموز 2019 الى كانون الثاني لسنة 2020. فقد تمكنّا من خلال الرحلات المسحية من الحصول على أجسام ثمرية أختلفت في توزيعها، وعددها، وعوائلها ، وشُخِّصَت العزلات جزيئيا بتفاعل البلمرة المتسلسل اعتماداً على بادئات متخصصة تعود الى جين ITS. وكشفت النتائج احتواء جميع العزلات على الجين بدلالة ظهور حزمة واحدة لكل منها بحجم 650 زوج قاعدي ، أتاح لنا التتابع النيوكليوتيدي معرفة عائديتها للانواع *Ganoderma. resinaceum* ، *G.applanatum* ، *Ganoderma* sp ، *G.oregonense* ، *G.cupreolaccatum* ، *G.tuberculosum* ، *G.curtisii* ، *G.cf.resinaceum* ، *G.adspersum* ،و *G.lucidum* التي لم يتنسى من قبل تسجيلها، وسجلت في هذه الدراسة لأول مرة في العراق في بنك الجينات.

وللتعرف على مخزون النواتج الطبيعية التي تكتنُزها بعض أنواع الفطريات، أنتخبت ثلاثة أنواع فطرية من مجموعة الفطريات المستحصل عليها، لآستخلاص المركبات الفعالة منها وهي: *G.cupreolaccatum G.curtisii* و *G.oregonense*، بآستخدام نظام المذيبات المتعاقبة بدءاً بمذيبين غير قطبيين: الأيثر البترولي، والكلوروفورم وأعقبهما المذيب شبه القطبي الأسيتون، وأنتهاءً بالمذيب القطبي IMS بجهاز الأستخلاص المستمر السكسوليت (Soxhlet)، وبعدها تم الآستخلاص بالماء الحار. وقد شُخِّصَت مجموعة واسعة الطيف من الاحماض الدهنية باستخدام جهاز السائل – الغازي Gas Chromatography (GLC) Liquid لمستخلصات الفطريات المنتخبة، ونتج عنها خمسة عشر حامض دهني وهي: Butyric acid و Myristic acid و Palmatic acid و Hepadecanoic و Stearic acid، Oleic acid و Enolic acid و Eicosenoic acid و Arachidic acid و Linolenic acid و Erucic acid و Arachidonic acid و Tricosanoic acid و

Cisdocosadienoic و Nervonoic. وأسوة بالاجراءات التشخيصية آستُخدِمَ جهاز كروماتوكرافيا السائل عالي الأداء (HPLC)؛ لتشخيص المركبات الفينولية وهي: Keampferol، Quercetin، Catchin، Rutin، Epigenin، Vanillic acid، Cumarine، Caffeic acid ، Ferulic acid.

كما شُخّصَت الزيوت الطيارة بجهاز الغاز – السائل (GLC) بعد استخلاصها بجهاز التقطير كليفنجر (Clevenger) المحور أذ تبين توفر ثمانية زيوت طيارة وهي: Camphor، Sabinen و Terpinen و Myrcine و Limonine و Cineole و Linalool و Alph-Pinene. في حين كشف جهاز تحليل الأحماض الأمينية Amino acid analyses احتواء العزلات الفطرية المنتخبة على تشكيلة متنوعة منها هي: Aspartic acid و Glutamic acid و Serine و Glycine و Threonine و Phenylalanine و Arginine و Isoleucine و Cysteine و methionine و Leucine و Proline.

وتحت عنوان تقييم الفعالية البايولوجية تجاه بعض أنواع البكتريا الممرضة للإنسان، أبدت المستخلصات المختلفة بعد اقل من 24 ساعة فعالية تثبيطية آختلفت حسب نوع المستخلص، وتركيزه، ونوع البكتريا المختبرة، وأكدت أنّ لمستخلص الأيثر البترولي للأحماض الدهنية من عزلة الفطر *G.oregonense* اعطت فعالية تثبيطية بلغت 41 ملم عند التركيز 400 ملغم / ملم تجاه بكتريا *Escherichia coli*، وكانت المركبات الفنيولية المستخلصة بالاسيتون من عزلة الفطر *G.cupreolaccatum* الأكثر تثبيطا تجاه بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد بلغ قطر هالة التحلل 38 ملم عند التركيز 400 ملغم / مل، بينما أعطت مستخلص الزيت الطيار من عزلة الفطر *G.curtisii* قطر هالة تحلل بلغ 43 ملم تجاه كل من بكتريا *Psudomonas aeruginosa*، و *E.coli* عند التركيز أعلاه. كما أثبت سكر β-glucan فعاليته في تثبيط البكتريا الممرضة، إذ بلغ قطر هالة التحلل 46 ملم تجاه بكتريا *E. coli*.

ونستنتج من الفعالية المضادة للأكسدة دور المستخلصات الفطرية المختلفة وتأثيرها في قنص الجذر الحر لمادة DPPH بلغت اقصاها للمستخلص الفينولي بالمذيب IMS من مسحوق الجسم الثمري لعزلة الفطر *G.cupreolaccatum* 79.85 % عند التركيز 800

مايكروغرام / مل مقارنةً مع مضاد الأكسدة القياسي Vitamine C، والتي بلغت 72.46 % عند نفس التركيز.

افادت النتائج التي تناولت آختبار السُمِّية الخلوية Cytotoxicity بتقنية MTT لحامض caffeic acid المنقى من عزلة الفطر *G. cupreolaccatum* على الخط الخلوي لسرطان الكبد Hep G2، والخط الخلوي الطبيعي WRL68، وباستخدام تراكيز مختلفة منه 1.0 ، 1.5، 2.0 ، 2.5 ، 3.0 مايكروغرام / مل وجود تأثير سُمِّي عالٍ لحامض الكافئيك على خلايا الخط الخلوي لسرطان الكبد، إذ أَنَّ نسبة التثبيط تزداد بزيادة تركيز الحامض المستخدم، وبلغت أقصاها 57 % عند التركيز 3.0 مايكروغرام / مل، بينما لم يُلاحظ أي تأثير للحامض المنقى على خط الخلايا الطبيعية. وبصورة بدت غريزية أثمرت نتائج التأثير السمي للسكر المتعدد β-glucan المنقى من عزلة الفطر *G.curtisii* على الخط السرطاني ذاته، وتباين في التأثير السمي لجميع التراكيز المستخدمة من السكر المنقى، لكنها كانت تميل للزيادة، بزيادة تركيز السكر، وأنعكس على النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية حتى بلغت أعلى قيمة للتثبيط بنسبة 52 % عند التركيز 3.0 مايكروغرام / مل، بينما بلغت النسبة المئوية لتثبيط الخلايا السرطانية 14 % عند التركيز الادنى 1.0 مايكروغرام / مل. واغتناماً لنتائج السُمِّية الخلوية دُرِسَت التغيرات التي تطرأ على خط الخلايا السرطانية للكبد لبعض المؤشرات الخلوية، وهي كل من نفاذية الخلية، وعدد الخلايا، والمحتوى النووي فضلاً عن نفاذية غشاء المايتكوندريا، وتحرر Cytochrome C منها ، في خطوة تعد الأصعب على الإطلاق، وبمدى فعالية مستخلص حامض الكافئيك المنقى كللت التجربة بالنجاح، إذ لوحظ أَنَّ لمستخلص حامض الكافئيك المنقى تأثيراً واضحاً على المؤشرات الخلوية، باستعمال التراكيز العالية، إذ ازدادت نفاذية الجدار الخلوي بمقدار 41 % عند التركيز الاعلى 200 مايكروغرام / مل، وانخفضت نسبة الخلايا الحية حتى بلغت 58 % عند نفس الجرعة . وتبين التأثير المعنوي على الكثافة النووية عند التراكيز 50,100,200 مايكروغرام / مل على التوالي، والتي بلغت 47 و 37.3 و 23.2 % مقارنةً مع معاملة السيطرة ،ولوحظ زيادة في نفاذية غشاء المايتوكندريا، انعكس على تحرر Cytochrome C منه عند التراكيز العالية من المستخلص المنقى، بينما لم يظهر

أي تأثير معنوي عند التراكيز الواطئة. وفي نتيجة مماثلة تستحق الإشادة بها تم متابعة تأثير سكر β-glucan المنقى على المؤشرات الخلوية، وتبين زيادة في معدل نفاذية غشاء الخلية ومحتواها النووي، وزيادة في تثبيط عدد الخلايا، وفي نفاذية غشاء المايتوكندريا، وتحرر سايتوكروم C عند التراكيز العالية، والذي شجع الخلايا على الموت الخلوي المبرمج. يُعَدَّ هذا العمل إنجازاً علميا كبيراً، إذ يفتح معه ابواباً عدة لعلاج السرطان.

Abstract

Seeking to achieve our scientific progress, it had been important to find safe alternatives from nature to be used as antibiotics and medicines to maintain human health far from serious diseases. Therefore, with a main support from Fungi Laboratory in the Research Centre of Department of Biology, College of Education for Pure Sciences, Mosul University/ Iraq .The study It included a field survey of the Ganoderma white-rot fungi, which are living among various types of trees and crops in Ninevah for the period (July 2019 – January 2020). The study came up with fruiting bodies in different distributions, numbers, and families. The isolates were identifiedmolecularly through the chain polymerase reaction based on specific primers of ITS gene by (650 base-pair) fasciculus in each. The nucleotide sequences indicated isolates of *Ganoderma resinaceum* ، *G.applanatum* ، *G.sp* ، *G.oregonense* ، *G.cupreolaccatum* ، *G.tuberculosum* ، *G.curtisii* ، *G.cf.resinaceum* ، *G.adspersum* و *G.lucidum*,it's recorded for the first time in Iraq and in Gene bank.

To know the content of the natural compounds kept in some fungi. Three types of obtained fungi species, *G.curtisii*, *G.cupreolaccatum and G.oregonense* were selected to extract active compounds by using sequential solvents. Initially the non-polar solvents, petroleum ether and chloroform, were used and then followed by using semi-polar solvent, Acetone, and finally using a polar solvent, IMS. This process is performed with the extractor, Soxhlet, and then the extraction is done with hot water. Various types of fatty acids were identified by using Gas Liquid Chromatograph (GLC). Fifteen fatty acids are extracted from the selected fungi: Butyric acid , Myristic, Palmaitic- acid, Hepadecanoic, Stearic acid, Oleic acid, Enolic acid, Eicosenoic acid, Arachidic acid, Linolenic acid, Erucic acid, Arachidonic acid, Tricosanoic acid, Cisdocosadienoic, and Nervonoic. High- Performance Liquid

Chromatography (HPLC) was also used for identifying phenolic compounds: Kaempferol, Quercetin, Catchin, Rutin, Apigenin, Vanillic acid, Cumarine, Caffeic acid, and Ferulic acid

Volatile oils were also identified with Gas Liquid Chromatograph (GLC) after extraction with a modified Clevenger. Eight of them were observed: Camphor, Sabinene, Terpinen, Myrcene, Limonene, Cineole, Linalool, and Alph-Pinene. However, Amino acid analysis device showed that the selected fungi isolates contain various acids: Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Glycine, Threonine, Phenylalanine, Arginine, Isoleucine, Cysteine, methionine, Leucine, and Proline.

To estimate the antimicrobial activity against of some pathogenic bacteria, the different extractions showed an inhibition activity after 24 hours. This inhibition was varied per the extract type, concentration, and tested bacteria type. In addition,it was obvious that petroleum ether of fatty acids extracted from *G.oregonense* had an inhibitory activity of 41 mm at 400mg/ml against *Escherichia coli*. However, phenolic compounds extracted from *G.cupreolaccatum by using acetone showed the most inhibition against Staphylococcus aureus* which showed a decomposition diameter of 38 mm at the concentration of 400 mg/ml. As the volatile oil extracted from the fungus isolate *G.curtisii* had a decomposition diameter of 43mm against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* at the above concentration, β-glucan also approved its inhibition for the harmful bacteria in 46mm of the decomposition against *Escherichia coli.*

Anti-oxidant activity, on the other hand, showed the effective role of the different fungus extracts in DPPH free radical scavenging. The phenol which was extracted by the IMS solvent from the fruiting body of *G.cupreolaccatum* had the maximum of nhibiting 79.85% at the

concentration 800 mg/ml, compared with the standard anti-oxidant Vitamin C which was 62.46% at the same concentration.

The results of The Cytotoxicity test with MTT technology of the caffeic acid purified from *G. cupreolaccatum* on the cell line of Hep G2 and the natural cell line, WRL68, using different concentrations 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/ml, revealed a high toxic effect of caffeic acid on the cell line of hepatitis cancer. The inhibition percentage was increasing with the rise of the used acid concentration which was 57% at the concentration of 3.0 mg/ml, while there was not any effect for the purified acid on the natural cell line. Instinctively, the toxicity results of β-glucan purified from *G.curtisii,* on the same cancer line, showed toxicity differences among the used concentrations of purified sugar. However, the toxicity increases when the sugar concentration increases too. The former can also affect the percentage of cancer cell inhibition. The highest inhibition 52% was at the concentration of 3.0 mg/ml, while cancer cell inhibition percentage was 14% at the lowest concentration 1.0mg/ml. Cytotoxicity test observed also the changes that occurred on the hepatitis cell line such as : cell permeability, cell number, nuclear content, as well as mitochondria membrane permeability and its release of the cytochrome. The ever hardest step, with great belief in the ability of the purified caffeic acid, the experiment was successfully accomplished. The extract of purified caffeic acid had a clear effect on the cell indications with using high concentrations. The permeability of the cell membrane was increased to be 41% at the highest concentration of 200mg/ml, as living cells decreased to be 58% on the same dose. An enormous effect was also shown in the nuclear density at the concentration 200, 100, 50 mg/ml respectively to be 47, 37.3, and 23.2%, compared with treatment control. Adding that, a decrease of the mitochondria membrane permeability was observed to help in releasing its cytochrome at high concentration on the

purified extract, while there was no effect at low concentrations. Similarly, worth mentioning that pursuing the effects of the purified β-glucan on cell indications revealed: increasing the cell membrane permeability and its nuclear content, increasing cell number inhibition, and increasing the mitochondria membrane permeability and releasing its cytochrome at high concentration. At last, this has led cells to programmed cell death. Thus, this has been a great scientific accomplishment for the treatment of cancer.

University of Mosul

College of Education for Pure Sciences

Separation and Identification of Some Secondary Metabolite Compounds from of Some Species of the Fungi *Ganoderma* Genus and Antibacterial, Antioxidant and Anticancer Valuation. Nineveh / Iraq

Hiba Fires Saadoon Altaii

Ph.D.Thesis

Biology

Supervised by

Prof.

Dr. Ayad Chachan

Assist. Prof.

Dr. Shimal Y.Abdul-Hadi

2021 A.D. **1443A.H.**