Production of antibiotic penicillin from local isolate fungi Penicillium chrysogenum

أنتاج المضاد الحيوي البنسلين من عزلة محلية للفطر *Penicillium chrysogenum*

م . بان موسى حسن الزبيدي* أ.د .سامي عبد الرضا الجميلي أ.د. بان طه محمد
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

*البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول .

الخلاصة

حصلنا على عزلة محلية للفطر *Penicillium chrysogenum* منتجة للمضاد الحيوي البنسلين Penicillin كان مصدرها الهواء أستخلص المضاد وتمت تنقيته وبينت نتائج الدراسة أن له تأثير فعال على بكتريا *Staphylococcus aureus* فقد بلغ معدل قطر التثبيط 27 ملم بينما كان تأثيره واطئا"على بكتريا *E.coli* أذ بلغ معدل قطر التثبيط 1ملم كما أكدت الكشوفات والأختبارات التشخيصية نوع المضاد والمستخلص من العزلة المحلية .

Abstract

We can collect isolate of fungus *Penicillium chrysogenum* from air an able to produce antibiotic the activity of these compound were examined against two kinds bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherchia coli* , Results revealed that the activity of this antibiotic appeared highly inhibition against *S.aureus* but its appearance low effect of *E.coli* growth where the average diameter of inhibitory areas reached 1mm . Many techniques were used in this study for purifird compound diagnosis , Results revealed that antibiotic was completely similar to the penicillin

المقدمة

جنس*Penicillium*واسع الأنتشار يعيش غالبا"مترمما"على الكثير من المواد كالخبز والجبن والجلود والأوراق كما تنمو بعض أنواعه على الفواكه والخضروات اثناء التسويق مسببا" لها أعفان فضلا"عن تواجد أنواع عديدة منه في التربة والهواء(1) .

تلوث العديد من أنواع الجنس *Penicillium* الأغذية البشرية والأعلاف الحيوانية من خلال أنتاجها للسموم الفطرية mycotoxin ولكن امراضيتها للأنسان بصورة مباشرة نادرة الا في بعض الحالات الأنتهازية Opportunistic infection التي من الممكن أن تسبب بعض الحالات المرضية كألتهاب القرنية الفطري mycotic keratitis وأمراض الأذن الفطرية Otomycosis (2) .

وتمتلك العديد من أنواعه امكانية دوائية من خلال افراز مركبات حيوية ذات قدرة على تثبيط العديد من البكتريا المرضية مثل المضاد الحيوي البنسلين penicillin الذي استخرج لأول مرة من الفطر *P.notatum* الذي أكتشفه لأول مرة العالم Alexander fleming عام 1929 م , ثم قام العالمان , Heward flory و Arnest chian بأستخلاصه وتنقيته كمركب سنة 1930 م حيث تمكن هذا العلاج من أنقاذ حياة مئات الجنود الجرحى خلال الحرب العالمية الثانية وبسبب هذا الأكتشاف الانساني العظيم حصل كل من الباحثين أعلاه على جائزة نوبل في الطب سنة 1945 م (3) .

يعد النوع *Penicillium chrysogenum* أحد الأنواع المعروفة بقدرته العالية على انتاج البنسلين penicillin (4).

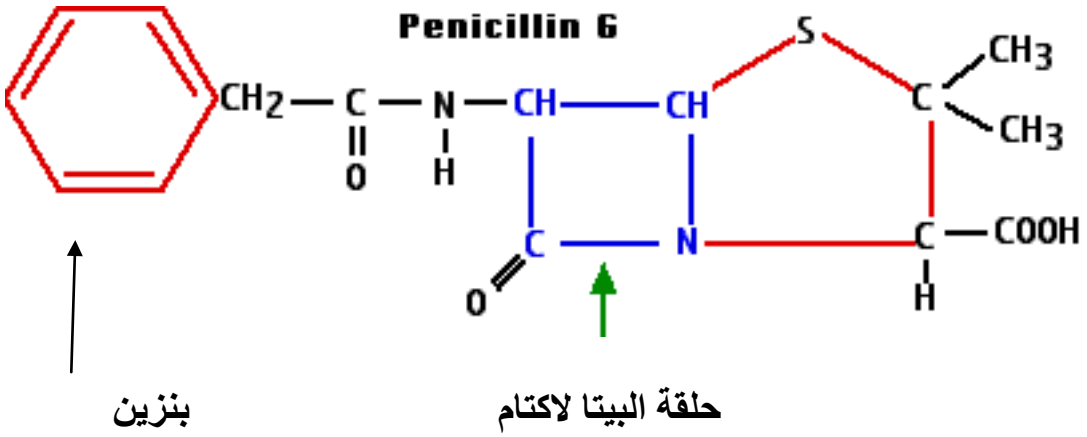
وعلى الرغم أنه ليست كل سلالات الفطر *Penicillium chrysogenum* منتجة للبنسلين Penicillin الا أنه يعتبر من أهم الأعفان المنتجة له (5).

يعد البنسلين من المضادات الحيوية القاتلة للبكتريا كونه يتداخل في عملية بناء الجدار الخلوي البكتيري ويحصل ذلك في المرحلة الأخيرة من بناء الجدار والمتمثلة بربط الببتيدات السكرية وتحديدا" الحامضين الامينيين Alanine وGlysine أ ذ يفصل الحامض الاميني الطرفي Alanine بفعل أنزيم Transpeptidase وبذلك يصبح الجدار الخلوي البكتيري فاقد للروابط العرضية بين ببتيداته السكرية مما يحدث خللا" مورفولوجيا" يتمثل بحدوث وهن في صلابة الجدار الخلوي ومع زيادة كتلة البروتوبلاست للخلية فأنه يؤدي الى أنفجارها (6) .

تتكون نواة البنسلين penicillin من اتحاد حلقة الثيازوليدين مع بيتالاكتام β-lactam بالاضافة الى السلسلة الجانبية لكلا الحلقتين وتعتبر الحلقة الرباعية β-lactam هي الجزء الأساس في فعالية البنسلين (7) .

الصيغة الكيميائية للبنسلين هي $R\text{-}C_9H_{11}N_2O_4S$ حيث تمثل R سلسلة جانبية متغيرة وطبيعيا" تم انتاج أربعة أنواع من البنسلين هي V , G , X , K أهمها وأفضلها من حيث الخواص العلاجية هو Penicillin G ويسمى أيضا" Benzypenicillin لأن مجموعة R هنا تمثل حلقة بنزين (Chopra ,1988) .يتطلب أنتاج Penicillin G وجود Phenyl

acetic acid لتكوين السلسلة الجانبية المرتبطة بنواة البنسلين كما تشتق نواة البنسلين من الحوامض الامينية Cystine و Valine وأن نواة البنسلين 6APA لاتتخلق مباشرة وانما يتكون مركب وسطي ثلاثي الببتيد فتتكون هذه النواة الحلقية ويسمى المركب الناتج Iso penicillin N ثم يتشكل البنسلين عن طريق التبادل بالسلسة الجانبية أو تتكون نواة البنسلين لوحدها عن طريق التحلل (8).



التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي penicillin G .

ورغم مرورعشرات السنين على أنتاج البنسلين Penicillin الا أنه يعتبر حتى وقتنا هذا من أكفأ المضادات الحياتية المستخدمة وأكثرها أمانا" وأقلها أعراضا" جانبية على صحة الأنسان أن نجاح هذه المادة في علاج الأمراض البكتيرية وزيادة الطلب عليها أدى الى صعوبة تغطية هذه الطلبات فلجأ العلماء الى تطوير عملية أنتاجه من خلال التحسين الوراثي للسلالات المنتجة والتحكم بمكونات الوسط الزرعي والظروف البيئية الملائمة لعملية التخمر, ومما زاد البحث في هذا المجال صعوبة الحصول على جزيئة البنسلين بواسطة أستخدام الطرق الكيميائية لغرض الأنتاج على المستوى التجاري بسبب التعقيد الكيميائي لهذا المضاد غير أنه يمكن الحصول على التركيب ثنائي الحلقة 6(APA) من خلال التحول الميكروبي لجزيئة البنسلين G بأستخدام الانزيم Penicillin acylase المنتج من قبل سلالات مختلفة من الكائنات الحية أو بأستخدام سلالات مطفرة من الأعفان , تعد الطرق الأحيائية أقل كلفة بكثير من الطرق الكيميائية في الأنتاج حيث تتطلب الأخيرة حدوث عدة تفاعلات في درجات حرارية واطئة في ظروف تنعدم فيها الرطوبة وبأستخدام العديد من المذيبات الكيميائية (9).

بسبب الخدمة الكبيرة التي قدمها البنسلين للبشرية في المجال الطبي منذ الحرب العالمية الثانية حيث وهب فيها العديد من البشر الحياة كمضاد أحيائي ولحد الان ولفتحه الباب على مصراعيه للكشف عن العديد من المضادات الميكروبية التي لم تكتشف بعد وبالنظر لعدم وجود دراسة مسحية محلية في العراق بحسب المصادر المتوفرة حول القدرات الأنتاجية لعزلات الفطر *Penicillium* للمضادات الحياتية جاءت هذه الدراسة لتسليط الضوء على هذا الفطر من حيث فعاليته على أنتاج المضاد الحيوي البنسلين وأمكانية توظيف بعض عزلاته في الصناعة الدوائية مستقبلا".

المواد وطرائق العمل

أولا" : المواد

1.الأوساط الزرعية

A-الأوساط الزرعية الجاهزة

-**آكار المولر هنتون** Muller – Hinton Agar (MHA)

- **الآكار المغذي** Nutrient Agar (NA)

- **المرق المغذي** Nutrient Broth (NB)

- **آكار البطاطا دكستروز** Potato – Dextrose Agar (PDA)

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة الواردة في أعلاه بحسب تعليمات الشركة المنتجة Hemadia / India والمثبتة على العبوة.

B- الأوساط الزرعية المحضرة

1. مرق البطاطا سكروز

Potato Sucrose Broth (PSB)

حضر الوسط من 200 غم من البطاطا المقشرة والمقطعة إلى شرائح رفيعة ثم أضيف لها 500 مل ماء مقطر وطبخت على النار لدرجة الغليان لمدة 30 دقيقة ثم أخذ الراشح بإستخدام ثلاث طبقات من الشاش الطبي ثم أضيف للراشح 20غم سكروز وكمل الحجم إلى1000 مل (10).

2. الوسط التخمري FM المستخدم في إنتاج المضاد Fermentation media .

- $NaNO_3$ 2.5g , $ZnSO_4.H_2O$ 0.05g , Lactose 10g , K_2HPO_4 1g , $FeSO_4.7H_2O$ 0.02g , Glucose 5g , Trypton 4g , Corn extract 20 g , Yeast extract 4g, KCl 0.2g , $MgSO_4.7H_2O$ 0.05g
- ذوبت المواد في لترمن الماء المقطر مع تعديل الرقم الهيدروجيني إلى 6 (11) .
- عقمت جميع الأوساط الزرعية بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121م ◦ وتحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة – 20 15 دقيقة , تركت الأوساط بعد التعقيم لتبريدها إلى درجة حرارة 45 مْ ثم أضيف المضاد الحيوي الكلورومفنيكول Chloramphenicol لتثبيط نمو البكتريا للأوساط المستخدمة لعزل وتشخيص الفطر *Penicillium* أما بقية الأوساط الزرعية والتخمرية فلم يضاف المضاد الحيوي.

2. عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* المنتجة للبنسلين:تم الحصول على عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* المنتجة للمضاد الحيوي البنسلين من الهواء وشخصت بالأعتماد على الشكل المظهري والخصائص المجهرية وبالأستناد على المفاتيح التصنيفية:(13; 12) .

3. مصدرالعزلات البكتيرية: تم الحصول على عزلتي البكتريا قيد الدراسة وهي *Staphylococcus aureus* كعزلة بكتيرية موجبة لصبغة غرام و *Escherichia coli* كعزلة سالبة لصبغة غرام من مستشفى الحسين العام / وحدة المختبرات المركزية في محافظة كربلاء وتم تأكيد تشخيصها بأستخدام جهاز (Vitek) .

ثانيا" : طرائق العمل

1. تقييم كفاءة عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* على إنتاج المضادات.

a. تقدير الفعالية التثبيطية لعزلة الفطر *P. chrysogenum* بطريقة أقراص الآكار .

أستخدمت طريقة أقراص الآكار حسب ما جاء به (14)

1.تحضير اللقاح البكتيري : حضر وسط المرق المغذي N.B ثم لقح الوسط بخمسة مستعمرات من كل نوع من أنواع البكتريا *Escherichia coli* و*Staphylococcus aureus* المنماة على وسط N.A كلا" على حدة حضنت العزلات البكتيرية المزروعة بدرجة حرارة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم أخذ من النمو السابق لقاح بحجم 0.1 مل وزرع على وسط مولر هنتون وبطريقة النشر بواسطة Swab معقمة وبصورة متجانسة , تركت العينات لتجف 10 – 15 دقيقة .

2.تحضير لقاح عزلة الفطر *P. chrysogenum* : زرعت عزلة الفطر *P. chrysogenum* على الوسط PDA , وذلك بوضع قرص قطره 5 ملم في مركز الطبق من عزلة فطرية نقية , وبواقع ثلاث مكررات حضنت الأطباق بدرجة حرارة 25 م° لمدة 10 أيام .

3.تنفيذ المعاملات : أخذت أقراص بوساطة ثاقب فليني بقطر5 ملم من المستعمرات الفطرية المهيأة مسبقا" بحسب الفقرة 2 ووضعت على سطح المولر هنتون اكار المزروع بالبكتريا والمهيأ بحسب الفقرة 1 وبواقع أربعة أقراص لكل طبق وبثلاث مكررات ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة بعدها تم حساب أقطار مناطق التثبيط بأستخدام مسطرة مدرجة .

b. تقدير الفعالية التثبيطية لعزلات الفطر *Penicillium* بطريقة الحفر : أستخدمت طريقة الأنتشار في الآكار بواسطة الحفر بحسب ما جاء به (15) .

1.تحضير اللقاح البكتيري : حضر اللقاح البكتيري كما ورد سابقاً في الفقرة (1.a) وبعد أن جفت الأطباق المزروعة بالبكتريا قيد الدراسة على وسط المولر هنتون أكار عملت حفر بواسطة الثاقب الفليني بقطر 5 ملم وبواقع أربع حفر لكل طبق وبأبعاد متساوية .

2.تحضير راشح عزلات الفطر *chrysogenum Penicillium* :زرعت عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* على وسط PDB حيث وضع 250 مل من الوسط في فلاسكات معقمة سعة 500 مل , لقحت الأوساط بعد التعقيم وبواقع 3 أقراص بقطر 5 ملم وبواقع ثلاثة مكررات ثم حضنت الدوارق بدرجة حرارة 25 ± 2 م◦ لمدة 12 يوم ثم رشحت محتويات كل دورق عبر أوراق ترشيح واتمان رقم 1 (Whatman No.1) لفصل الكتلة الحيوية أخذ الراشح لأختبار فعاليته تجاه العزلات البكتيرية موضوع الدراسة .

3.تنفيذ المعاملات : بوساطة محقنة طبية معقمة وضع 0.1 مل من الراشح الفطري المحضر في الفقرة السابقة في كل حفرة التي عملت في الأطباق المزروعة بالبكتريا المحضرة في الفقرة 1 وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة , حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 م° وفحصت بعد 48 ساعة حسبت أقطار مناطق التثبيط (ملم) حول الحفر الحاوية على راشح عزلة الفطر بأستخدام مسطرة مدرجة.

2.أستخلاص وتنقية المضاد الحيوي البنسلين من عزلة الفطر *P. chrysogenum* .

a- **تنمية عزلة الفطر *P. chrysogenum* :** نميت عزلة الفطر *P. chrysogenum* على الوسط التخمري (FM_2) بإضافة قرص بقطر 5 ملم من مستعمرة نقية نامية على وسط PDA وبعمرسبعة أيام , حضن الوسط تحت درجة حرارة 22 م° وpH 6لمدة 10 يوم وبعد مرور فترة الحضن رشح الوسط بأستخدام أوراق ترشيح لفصل الكتلة الحيوية وأخذ الراشح .

b- **أستخلاص المضاد الحيوي البنسلين :**أخذ الراشح الذي تم الحصول عليه في الفقرة السابقة وأضيف له ما يعادله من خلات الأثيل Ethyle acetate وضع المزيج في قمع الفصل ورجّ جيداً لمدة 15 دقيقة مع مراعاة فتح صمام قمع الفصل بين فترة

وأخرى لتفريغ الغازات ركبّ قمع الفصل على حامل وفتح صمام القمع للحصول على الطبقة الكحولية وأهمال الطبقة المائية وضع المستخلص الكحولي في فرن بدرجة 40 م° حتى جف تماماً بعدها تم وزن الناتج الجاف .

c-الكشف عن المضاد وتنقيته :

أستخدمت تقنية كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) حسب طريقة (1986) Fried and Sherman لتحديد نقاوة المضاد وتحديد معدل الأنسياب له حيث أضيف للمستخلص الفطري المجفف 5 مل من خلات الأثيل Ethyle acetate ثم حملت المادة على صفائح TLC كماحملت مادة البنسلين القياسية Standard penicillin كقياس لـ RF المستخلص ومعرفة درجة نقاوته حيث أخذ ما يقارب 15 مايكروليتر من محلول مادة البنسلين القياسية وضعت نفس الكمية من مستخلص عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* وبثلاث مكررات بين كل منهما مسافة 20 ملم تركت البقع لتجف ثم وضع لوح (TLC) في حوض الفصل الحاوي على الطور المتحرك Hexan % 25 – (Ethyle acetate % 75) ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية .

3.أختبار الفعالية التضادية للبنسلين المنقى ضد نوعي البكتريا موضوع الدراسة :

زرعت البكتريا موضوع الدراسة بنوعيها *S. aureus* والـ *E. coli* على وسط آكار المولر هنتون Mullar – Hinton agar بأخذ لقاح قدره 0.1 مل وبتركيز 1×10^8 خلية/مل منمى على وسط N.B وبعمر 24 ساعة , زرع اللقاح البكتيري بطريقة النشر بوساطة Swab معقم وبصورة متجانسة على كافة الطبق تركت الأطباق لتجف 10 – 15 دقيقة ثم عملت حفر بواسطة ثاقب فليني بقطر 5 ملم وبواقع 4-5 حفر لكل طبق وبأبعاد متساوية ثم ذوبت كمية مقدارها 0.02 غم المضاد النقي في 2 مل من الماء المقطر المعقم أي ما يعادل 10 ملغم / مل وبوساطة محقنة طبية معقمة وزع المضاد في الحفربحجم 0.1 مل وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة حضنت الأطباق تحت درجة حرارة 37 م° ولمدة 24 ساعة تم قياس أقطار التثبيط (ملم) بواسطة مسطرة مدرجة.

4.تشخيص المضاد الحيوي المستخلص: أخضع المضاد المنقى والمنتج من قبل عزلة الفطر *P.chrysogenum* لعدة أختبارات لتحديد التركيب الكيميائي الأولي وكالاتي:

a.كشوفات المجاميع الفعالة:أجريت بعض الكشوفات الكيميائية والتفاعلات اللونية على المضاد لمعرفة تركيبه الكيميائي بحسب ماجاء به (16).

1.كشف الأمين: أخذ 1 مل من محلول المضاد المستخلص المنقى ومزج مع 1 مل من كاشف النهايدرين Nenhydren عرض المزيج لدرجة حرارة 12م° لمدة 3 دقائق وذلك للكشف عن وجود مجموعة أمين حرة من خلال ظهور لون بنفسجي للمركب .

2.كشف مولش: وضعت كمية 1 مل من محلول المضاد النقي مع مل من محلول الفانفثول الكحولي α – nephthol رجّت المادتين جيداً ثم أضيفت بضع قطرات من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 وبدون تحريك , أن ظهور حلقة بنفسجية دليل على وجود مجموعة كاربوهيدراتية .

3.الكشف عن آصرة الآمايد : وضعت كمية 0.025 غم من المضاد النقي الجاف في 10 مل من محلول NaOH بتركيز % 20 وسخن المزيج تحت درجة حرارة 70 م° لمدة دقيقة واحدة أن تغير ورقة زهرة عباد الشمس دليل على أيجابية التفاعل .

b.أختبار طيف الأشعة تحت الحمراء FT – IR .

تم قياس طيف الأشعة تحت الحمراء Fourier Transform InfraRed بأستخدام جهاز FT – IR / Shimidzu / Japan) (8400S لتحديد أهم المجاميع الفعالة للمضاد الحيوي المستخلص أجريت التجربة في كلية العلوم / جامعة الكوفة .

c. أختبار تحديد عناصر CHNS .

حيث تم أختبار المضاد النقي للكشف عن وجود المركبات الكيميائية الكربون C , الهيدروجين H, النتروجين N , الكبريت S ومعرفة تراكيزها في المركبات المنقاة وأستخدم لهذا الغرض الجهاز (Euro Ea Elemental Analyser / Italy) (CHNS) أجريت التجربة في كلية العلوم / جامعة الكوفة.

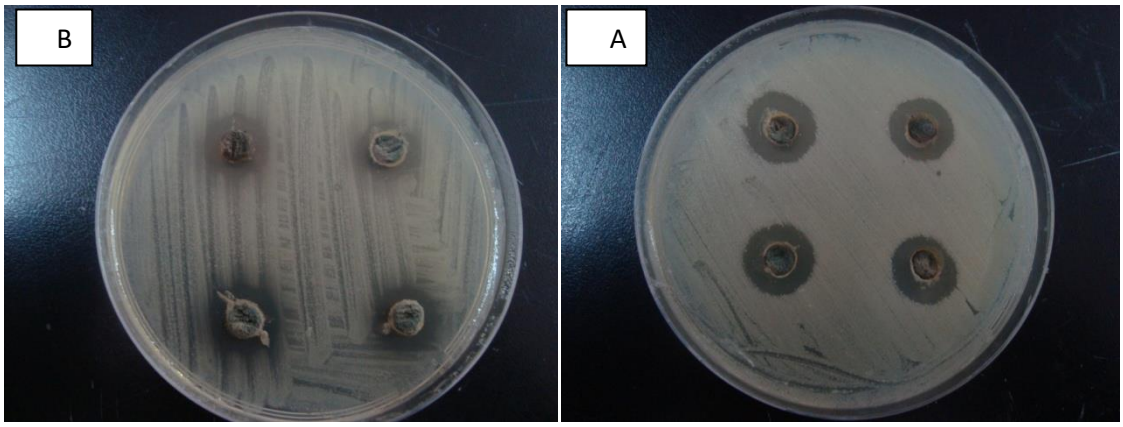
d. حساب الأمتصاصية الضوئية.

ذوب المضاد الحيوي النقي في الميثانول حيث أخذ 0.01 ملغم من المضاد الجاف وذوب في 5 مل من الميثانول , أستخدم الميثانول كبلانك Blank لقياس الأمتصاصية بوساطة جهاز Uv – Spectrophotometer أجريت التجربة في كلية الصيدلة / جامعة كربلاء.

النتائج والمناقشة

1.تقييم كفاءة عزلة الفطر *Penicillium chrysogenum* على إنتاج المضادات.

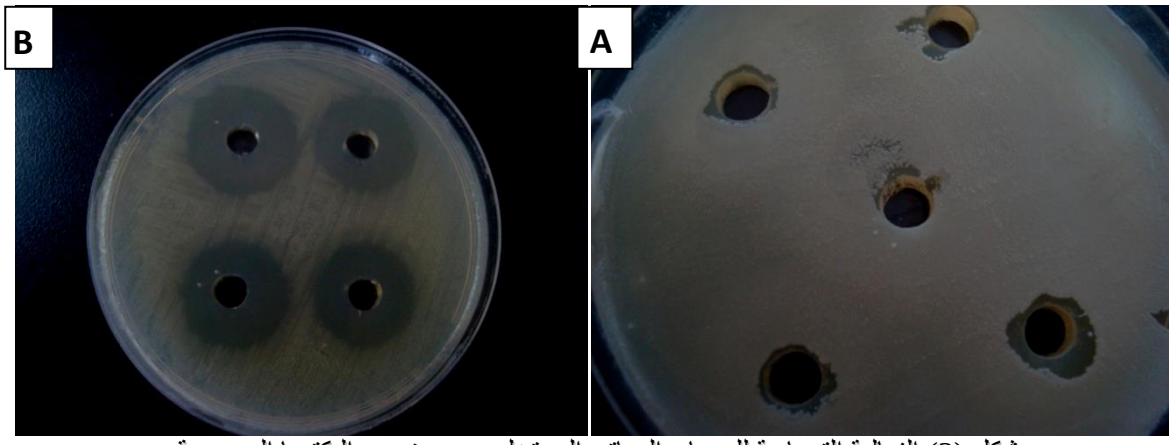
تم الحصول على عزلة الفطر *P.chrysogenum* المنتجة للمضاد الحيوي البنسلين من الهواء , ذكر Lippincott *et al* (2007) أن المصادر الأساسية للأحياء المجهرية المنتجة للمضادات الحيوية هي الهواء والتربة .كما تجدر الاشارة هنا الى أن أول مضاد حيوي أكتشف كان عن طريق تلوث هوائي بالفطر *P . notatum* (نقلا" عن 17). كان لعزلة الفطر *P. chrysogenum* قدرة تثبيطية لنوعي البكتريا حيث كان معدل أقطارالتثبيط 12 ملم ,9 ملم لكل من بكتريا *S. aureus* و *E. coli* على التوالي وبطريقة أقراص الأكار (شكل 1) .



شكل (1) القدرة التثبيطية للفطر P. chrysogenum(المستخلص الخام) لنوعي البكتريا S. aureus وE. coli
A:القدرة التثبيطية للفطر ضد بكتريا S. aureus B: القدرة التثبيطية للفطر ضد بكتريا E.coli

2.أستخلاص وتنقية المضاد : أستخلص المضاد من راشح عزلة الفطر *P.chrysogenum* المنتجة والنامية على الوسط التخمري FM_2 ونقي بتقنية TLC وبأستخدام الطور المتحرك (Hexan % 25 – Ethyle acetate % 75) أعطى معدل أنسياب Rf قدره 53 % كان مشابه تماما في لون التألق ومعدل الأنسياب للبنسلين القياسي .

3. أختبار الفعالية التضادية للبنسلين المنقى ضد نوعي البكتريا موضوع الدراسة:بينت النتائج أن المضاد النقي والذي أعطى معدل الانسياب (53 % Rf) كان فعالا" في تثبيط نمو البكتريا *S.aureus* اذ بلغ معدل أقطار التثبيط 27ملم بينما كان ضعيفا"جدا"في تأثيره على بكتريا *E.coli* حيث بلغ معدل أقطار التثبيط 1 ملم , وهذه النتيجة تعطي مؤشر على أن المضاد محدود الطيف وبهذا يكون مشابه للبنسلين القياسي ليس فقط بقيمة معدل الجريان النسبي Rf ولون التألق ولكن أيضا"مشابه له من حيث الفعالية التضادية اتجاه انواع البكتريا أذ ان البنسلين يؤثر بفعالية عالية تجاه البكتريا الموجبة لصبغة غرام في حين تكون فعاليته ضعيفة أتجاه البكتريا السالبة لصبغة غرام , إذ إن البنسلين يؤثر في عملية بناء الجدار الخلوي البكتيري ويحدث ذلك عند اخر مرحلة من بناء الجدار المتمثلة بمنع حدوث بناء البيتيدات السكرية أو glucopeptide وبالتالي يكون الجدار هش مما يؤدي الى تمزق الجدار وموت البكتريا , بينما تضم البكتريا السالبة لصبغة غرام كميات من ال mucopeptide المحتوية على حامض المورامين muramin acid وهذه الطبقة بدورها محاطة بطبقة مزدوجة مؤلفة من الفوسفوليبيدات phospholipid وهذه الطبقة هي التي تعطي صفة المقاومة للبكتريا السالبة لصبغة غرام تجاه البنسلين لانها تمثل حاجز يمنع وصوله الى جدار البكتريا (18).



شكل (2) الفعالية التضادية للمضاد الحياتي المستخلص ضد نوعي البكتريا المدروسة .
A :بكتريا *E.coli*.
B :بكتريا*S.aureus*.

4.تشخيص المضاد الحياتي المستخلص

أولا" : كشوفات المجاميع الفعالة .

أعطت الأختبارات اللونية للمضاد الحيوي المستخلص النتائج التالية:

1- كشف الأمين :أعطى الكشف نتيجة سالبة وهذا يعني عدم وجود مجموعة أمين حرة NH^2.

2- كشف مولش : كانت نتيجة الكشف سالبة كذلك وهذا يدل على عدم وجود مجموعة كاربوهيدراتية

3- كشف الأمايد : أعطى كشف الأمايد نتيجة موجبة دليل على وجود مجموعة N-H .

أثبتت الكشوفات اللونية التي خضع لها المضاد الحيوي المستخلص عدم وجود مجموعة أمين حرة بالأضافة لعدم أحتوائه على مجموعة كاربوهيدراتية بينما تلونت زهرة الشمس دلالة على وجود آصرة أمايد مما يعكس طبيعته الببتيدية وهذا يتفق مع (16) .

ثانيا": أختبار FT-IR .

أشارت النتائج الى وجود حلقة البيتا لاكتام β-Lactam وحلقة الثايوزول Thiols ring أضافة الى الحلقةالأروماتية Aromatic ring في المضاد الحياتي المستخلص (الجدول 1) (الشكل 3) , مما يدل على أن هذا المركب هوالبنسلين G حيث تعد حلقة β-Lactam من أهم مميزات مجموعة البنسلينات ووجود الحلقتين الأروماتية والثايوزول يؤكد هوية المضاد (8).

ثالثا": أختبار CHNS.

دلت نتائج أختبار CHNS أحتواء المضاد على العناصر الكيميائية الكربون C , الهيدروجين H , النتروجين N , الكبريت S ولكن بنسب مختلفة وكما موضح في الجدول (2) الشكل (4) .

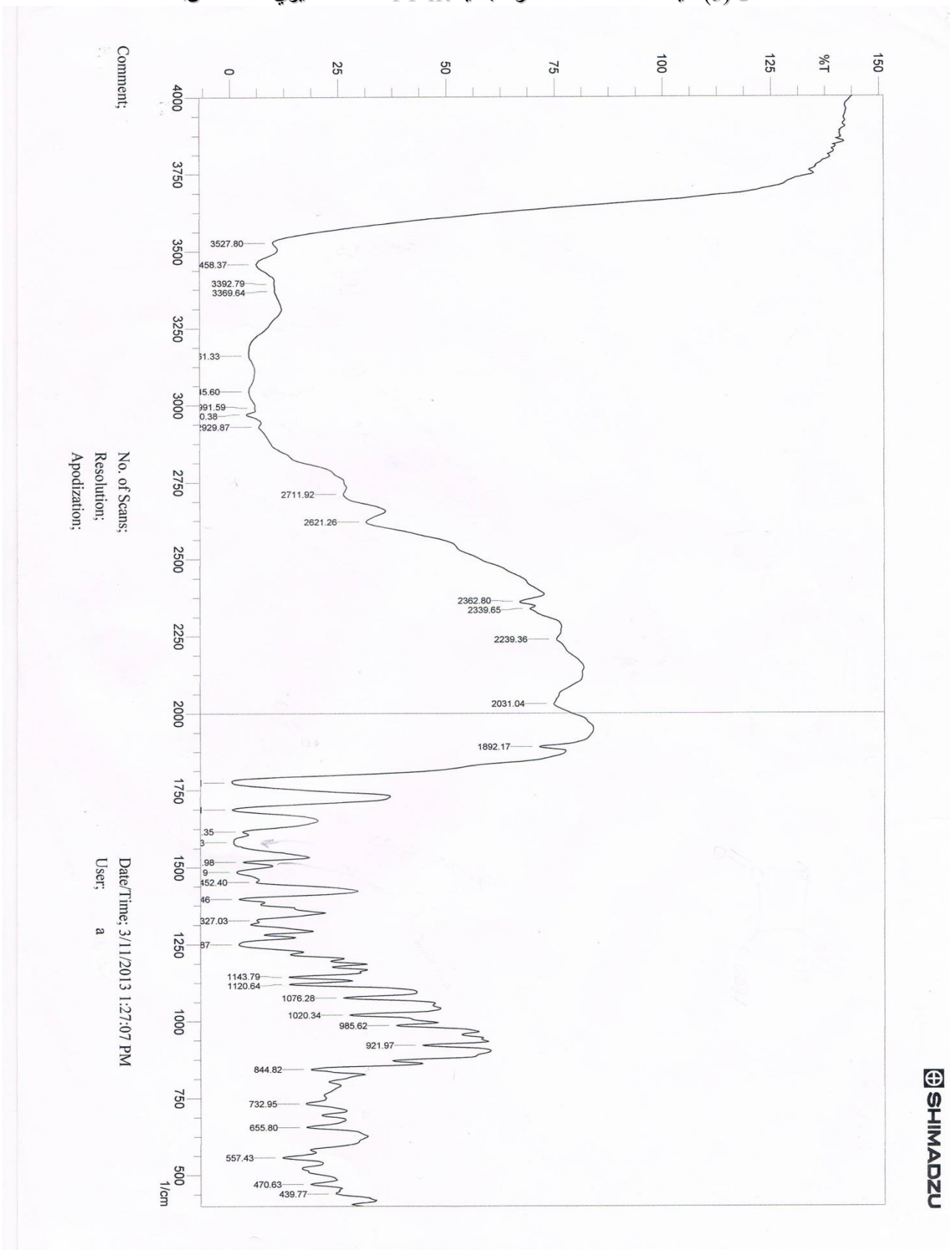
جدول (1) حزم الأمتصاص والمجاميع الكيميائية العائدة للمضاد الحيوي المستخلص.

التردد Vibration	قيم الأمتصاصية Absorption	المجموعة الفعالة funictional group
S-H (stretch)	2600 W	Thiols ring
C=O (stretch)	1750 S	Carboxylic acid
C=C (stretch)	1600- 1450 M	Aramatic ring
C-H (stretch)	3000-3100 M-S	Olefins / Aromatics
N-H (bend)	1510- 1575	Amides
OH (stretch)	3400 br	Carboxylic acid

جدول (2) نسب عناصر الكاربون C ,النتروجين N ,الهيدروجين H ,الكبريت S في تكوين المضاد الحيوي المستخلص.

المركب	نسب العناصر			
	S	N	H	C
المضاد الحيوي المستخلص	11.607	3.966	5.421	50.325

شكل (3) طيف الأشعة تحت الحمراء بتقنية FT-IR للمضاد الحيوي المستخلص.



شكل (4) أختبار CHNS للمضاد الحيوي المستخلص.

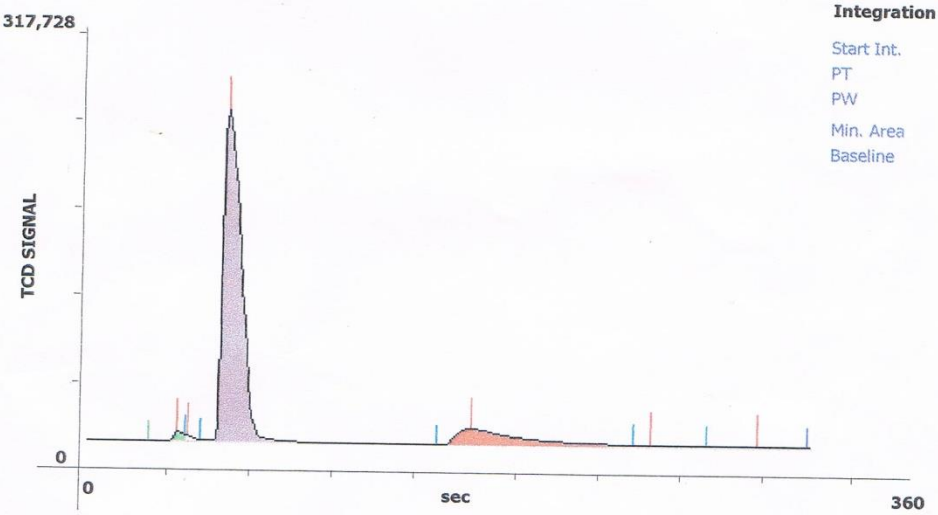
EuroEA Elemental Analyser

AutoRun name	:	25-MARCH (129)
Date of print	:	25 Mar 2013
Time of print	:	14:22:43
Operator	:	EVR
Balance Operator	:	EVR
Configuration	:	CHNS
Sample name	:	
Sample position #	:	18
Type	:	Smp
Sample weight	:	1.327 (mg)
Calibration type	:	Linear

Instrumental Parameters

Carrier (kPa)	Purge (ml/min)	Oxygen (ml)	Delta P O2 (kPa)	Sampling Delay (s)	Run Time (s)	Front (°C)	Rear (°C)	Oven (°C)
80	80	20	35	6	320	980	Off	115

Chromatogram



Integration Parameters

Start Int.	1
PT	1
PW	1
Min. Area	1000
Baseline	Front

Results

R

Element	RT (s)	Start (s)	End (s)	Area	Area %	Element %
Nitrogen	40	28	44	3,583	1.144	3.966
Carbon	61	51	154	261,841	83.615	50.325
Hydrogen	169	154	241	43,802	13.988	5.421
Sulphur	248	241	273	3,924	1.253	11.607
Oxygen	-	-	-	-	-	-

	Intercept	Slope	Correlation
Nitrogen	0.031	6.042013 E-06	0.984838
Carbon	0.010	2.513482 E-06	0.995876
Hydrogen	0.025	1.081209 E-06	0.962661
Sulphur	0.099	1.400099 E-05	0.909858
Oxygen	-	-	-

25 Mar 2013 14:22:43 AutoRun: 25-MARCH (129)

المصادر:

1-Samson,R.A.;Houbraker,J.;Thrane,U.;Frisvad,J.C.(2010) Food and Indoor fungi. Fungal Biodiversity centre.The Nether lands.P.1-398.

2-Samson ,R.A.; Pitt ,J.I .(1985).Advances in penicillium and Aspergillus systematic . Springer .ISBN 978 (5):306-422.

3-Ligon ,B.(2004)"Penicillin Its discovery and early development ". Simen pediator infect Dis 15(1):52-57.

4-Domsch ,K . H.; Gams, W .; and Anderson ,Traute-Heidi. (1980) Compendium of soil fungi .Vol.I and II.Academic press. PP : 941.

5-Dayalan ,A .J.;Darwen ,P.; Prakash, S .(2011) Comparative study production , purification of penicillin by *penicillium* isolated from soil and citrus sample . Asian pacific J of tropical biomedicine .10:1016-2221

6-Rhee, K.Y.;Gardiner, D.F. (2004)" Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of gram –positive bacterial infection". Clin. Infect . Dis". 39(5):755-765.

7-الفاخوري , د .ميسون .(2004) علم الأدوية السريري . دار المناهج . عمان –الأردن .

8-الداغستاني , د. هالة . (2002) .علم الأحياء المجهرية العملية . دار الصفاء .عمان – الأردن.

9-Swaroopa, R.A.;Jelly, A.;Ramakrishna, S.V.(2004)Kinetic studies of penicillin production during batch and repeated batch in fluidized bed bioreactor with agar immobilized *penicillium chrysogenum* cell. Indian. J.Biotech.3:394-399.

10-Colle,J.G.;Fraser,A.G.;Marminon,R.P.;and Simmon,A.(1996)Mackie and Mecarteny practical medical microbiology .14th –ed.The Churchill living stone .Inc.,U.S.A.

11- البوني,عبد العزيز محمد.(1990). أساسيات الفطريات العملي . جامعة الفاتح /كلية العلوم . الطبعة الأولى . طرابلس – ليبيا .

12-Moubasher ,A.H.(1993)Soil fungi in Qatar and other arab countries .Doha ,university of Qatar ,center of scientific and applied research .First published.

13-Nell,J.C.(1936)The mould fungi of new Zealand.The genus *Penicillium*. Plant diseases divition,Plant research burean, Palmerston North.

14-Toba ,T.; Samant , S . and Itoh , T. (1991) .Assay system for detecting bacteriocin in microdilution wells .Lett . Appl . Microbiol .,13:102-104.

15- Egarov ,N.S .(1985) .Antibiotics Scintific Approch . Mir publishers . Moscow.

16-Saadalla ,R .A. (1980) .Biochemistry practical manual . Basrah university press .Basrah .Iraq .P(111).

17-Rifkind ,D.; Freeman ,G .(2005) The nobel prize winning discoveries in infectious diseases . London,UK : Academic press .pp :43-46

18-Wesely ,W.E.G.; and Prasad,Y. (2008) Antibacterial activity of the bio-multidrug resistant *Staphylococcus aureus (*MRSA) .Research article. Department of Biotech, MCAS,Rasipuram ,India.