

Preparation of Nanohybrid antifungal from Nystatin and determination its inhibitory efficiency against *Candida* spp.

Zahraa Shakir Mahmood , Ali Abdul Kadhimi Al-Ghanimi

Karbala University /College of science /Department of biology

Received(May) , Accepted(June) .

Key words: Nanohybrid, Zink Oxide, Nystatin, Biological activities.

Abstract:

A nanohybrid antifungal Nys-ZnO was prepared using sol-gel ion exchange method between the antifungal Nystatin (Nys) and Zinc Oxide. The new nanoantifungal was identified. FT-IR spectroscopy revealed the appearance of new groups in the Nys-ZnO spectrum which indicates the formation of new compound. The X-Ray Diffraction (XRD) spectrum revealed the appearance of new diffraction planes in the nanohybrid antifungal spectrum in compare with the spectrum of zinc oxide. Scanning Electron Microscope (SEM) showed the presence of some change in the Nys-ZnO surface. The two and three dimensional image of the above compound in atomic force microscope confirmed the formation of new antifungal with nanodimensions. The antimicrobial activity of the nanohybrid antifungal was studied against 23 isolates of *Candida*. Results showed that highest inhibition was obtained against isolate *Candida tropicalis* 4 with avarege inhibition zone of 24.08 mm .

تحضير مضاد فطري نانوي هجين من المضاد نستاتين وتحديد كفاءته التثبيطية □ د. *Candida* spp.

زهراء شاكر محمود , علي عبد الكاظم الغانمي

جامعة كربلاء / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

الكلمات المفتاحية : المضاد النانوي الهجين , أوكسيد الزنك , نستاتين , الفعاليات البيولوجية.

الخلاصة :

تم تحضير مركب نانوي هجين Nys-ZnO باستخدام طريقة Sol-Gel للتبادل الايوني بين المضاد الفطري Nystatin(Nys) و اوكسيد الزنك Zinc Oxide . تم تشخيص المضاد الفطري النانوي الجديد ، اذ كشفت مطيافية الاشعة تحت الحمراء عن ظهور مجاميع جديدة في طيف المضاد Nys-ZnO مما يشير الى تكون مضاد فطري جديد كما اوضحت تقنية حيود الاشعة السينية (X-Ray Diffraction, XRD) ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد Nys-ZnO مقارنة بطيف حيود أوكسيد الزنك . واثبت فحص المجهر الالكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope ,SEM) عن ظهور تغيرات في سطح المضاد النانوي كما اثبتت صورتي مجهر القوة الذري (Atomic Force Microscope ,AFM) الثنائية والثلاثية الابعاد ، الحصول على مركب ضمن الابعاد والمقاسات النانوية . درست الفعالية المضادة للإحياء المجهرية للمضاد النانوي قيد الدراسة ضد 23 عزلة من خميرة *Candida* ووضحت النتائج ان اعلى فعالية تثبيطية كانت ضد العزلة *Candida tropicalis* 4 بمعدل تثبيط مقداره 24.08 ملم.

المقدمة:

تعد خميرة الـ *Candida* من الفطريات الإنتهازية التي يمكن أن تسبب داء المبيضات (Candidiasis) لما يقرب من (30-50)% من الأفراد الأصحاء في العالم [1,2]. و تشير الإحصائيات العالمية الى أن خميرة *Candida albicans* تمثل

حوالي 80% من أنواع *Candida spp.* المسببة لهذا المرض و يمكن أن يعزى ذلك الى عوامل ضراوتها المختلفة المتمثلة بتكوين الخيوط الفطرية (Hyphal formation) و الإلتصاق (Adhesion) و إختراق سطح الخلية و تكوين الأغشية الحبيوية (biofilms formation) و التبدل المظهري (phenotypic switching) فضلاً عن إفراز الأنزيمات المحللة مائياً (Hydrolytic enzymes) [3].

إن تزايد معدلات الإصابة بخميرة *C. albicans* في السنوات الأخيرة فضلاً عن زيادة مقاومتها لبعض المضادات الفطرية التقليدية يحتم القيام بدراسات عاجلة للسيطرة على تلك المشاكل [4,5].

و يعد المضاد الفطري Nystatin أول مضاد من مجموعة الـ Polyenes تم إكتشافه عام 1950 و إستخدم بنجاح في المراهم الجلدية السطحية (Topical creams) و الغسولات الفموية (Oral washes) كعلاج لداء المبيضات [6]. دخلت التقنية النانوية في السنوات الأخيرة بشكل واسع في المجالين الطبي و الصيدلاني و يعتقد أنها ستلعب في المستقبل القريب دوراً حاسماً في تشخيص الأمراض و علاجها فضلاً عن الوقاية منها [7] ، و قد نالت المضادات الفطرية نصيبها من تطبيقات هذه التقنية عبر تحضير مضادات نانوية ذات فعالية تثبيطية عالية . و بالنظر الى الأهمية العلاجية للنستاتين تهدف هذه الدراسة الى تحضير مضاد فطري نانوي هجين باستخدام النستاتين .

المواد وطرائق العمل :

تحضير المضاد الفطري النانوي من طبقات اوكسيد الزنك (Zinc oxide) مع المضاد الفطري النستاتين بطريقة Sol gel للتبادل الأيوني

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [8] مع بعض التحوير في تحضير المضاد الفطري النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد الفطري نستاتين قطره - قطره الى محلول اوكسيد الزنك (الناتج من اذابة 1غم من اوكسيد الزنك في 50% ايثانول) وحرك المزيج مغناطيسياً بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وضعت المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 م° لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 م° لمدة 24 ساعة اعقبه فصل الراسب بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر للأأيوني مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 40م° وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيرا خزنه في الثلاجة .

تشخيص المضاد الفطري النانوي الهجين :

تم تشخيص المضاد النانوي الهجين Nys-ZnO بالطرائق الطيفية وفحوصات مجهري الالكتروني الماسح (SEM , Scanning Electron Microscope) و القوة الذرية (Atomic Force Microscope , AFM) وكما يأتي :

1- التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (FT-IR)

تم عمل قرص من المضاد الفطري النانوي الهجين مع بروميد البوتاسيوم (KBr) بعد طحنهما بصورة جيدة وتم قياس طيف الاشعة تحت الحمراء في مدى من الاعداد الموجية (400-4000) سم⁻¹ .

2- التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية (X-Ray Diffraction, XRD)

تم تشخيص المضاد النانوي الهجين Nys-ZnO باستخدام طيف حيود الاشعة السينية والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها للمضاد الفطري Nys-ZnO وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda = 2d\sin\theta$ لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها.

3- الفحص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM)

تم فحص المضاد النانوي Nys-ZnO بالمجهر الالكتروني الماسح لغرض معرفة شكل السطح للمضاد قيد الدراسة.

4- الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM)

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المضاد الفطري النانوي Nys-ZnO وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الجزيئات النانوية ، اذ تم ارسال النموذج الى د. عبد الكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصه . وتم استخراج معامل البلورية (Crystallinity Index) بالاستعانة بالمعادلة التالية [9] .

$$\text{Crystallinity Index} = D_p / L$$

اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Nys-ZnO و النستاتين الحر □ د الخميرة *C. albicans* :

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Nys-ZnO و النستاتين الحر ضد الخميرة *Candida spp.* وفق طريقة الانتشار في الاكار بواسطة الحفر [10] كما تم تحديد معدل التثبيط الادنى للمضاد النانوي ضد الخميرة قيد الدراسة و ذلك باستخدام تراكيز من المضاد بلغت (5-0.01) ملغم/مل .

النتائج والمناقشة :

تشخيص المضادات النانوية الهجينة

1- التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء

أ - طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الفطري النستاتين

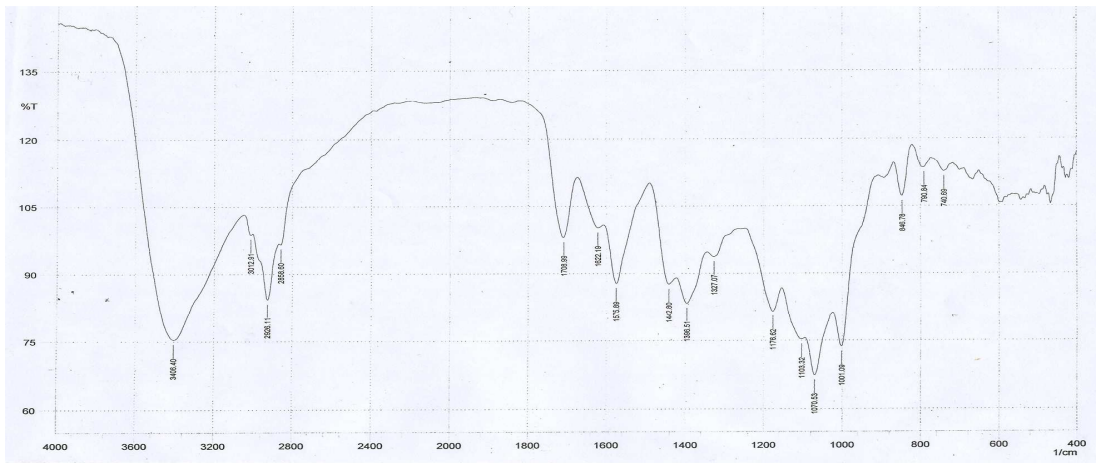
يتضح من الشكل 1 أن النستاتين بحالته الحرة يظهر العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة إذ أن ظهور الحزمة عند التردد 3406 سم⁻¹ يشير الى إهتزاز مط لرابطة الهيدروكسيل O-H للحامض والتي تبدو عريضة (Broad) و شديدة فضلاً عن مط O-H الكحولية والتي يبدو أنها تداخلت مع مط O-H الهيدروكسيل ، كما تشير هذه الحزمة الى وجود مط مجموعة الأمين (NH₂) المتماثل وغير المتماثل وقد طغت عليه الحزمة العريضة لمط O-H . في حين أن الحزمة عند 3012 سم⁻¹ تعزى الى إهتزاز مط C-H الأوليفيني . أما ظهور الحزمتين عند الترددين (2858 و 2926) سم⁻¹ فتشيران الى إهتزاز مط مجموعة CH₃ المتماثل وغير المتماثل ، على التوالي . و تعزى الحزمة عند التردد 1706 سم⁻¹ الى وجود مط لمجموعة C=O للحامض و الأستر ، فيما تشير الحزمة عند التردد 1622 سم⁻¹ الى مط C=C الأوليفينية والتي تكون ضعيفة الشدة . أما ظهور الحزمة عند التردد 1575 سم⁻¹ فتشير الى إهتزاز إنحناء (Bending) لمجموعة الأمين NH₂ [11] .

ب - طيف الاشعة تحت الحمراء لطبقات لأوكسيد الزنك

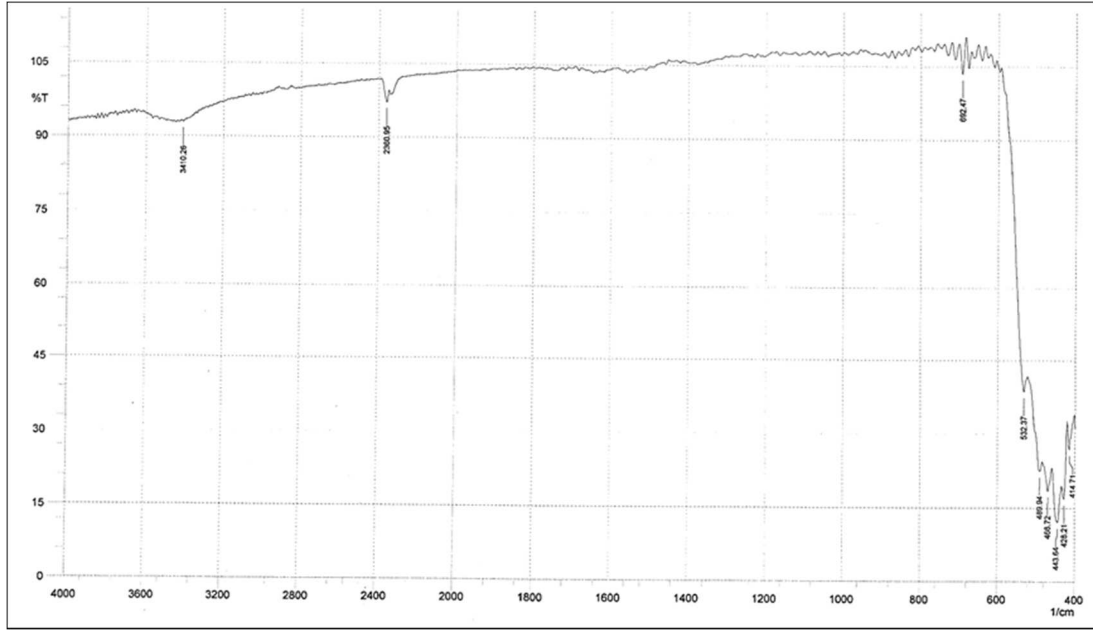
أظهرت طبقات أوكسيد الزنك حزمة غير واضحة واقعة عند التردد (400 – 500) سم⁻¹ والتي تعزى الى إهتزاز رابطة المعدن Zn-O [12] كما هو موضح في الشكل 2 .

ج - طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين (Nys-ZnO)

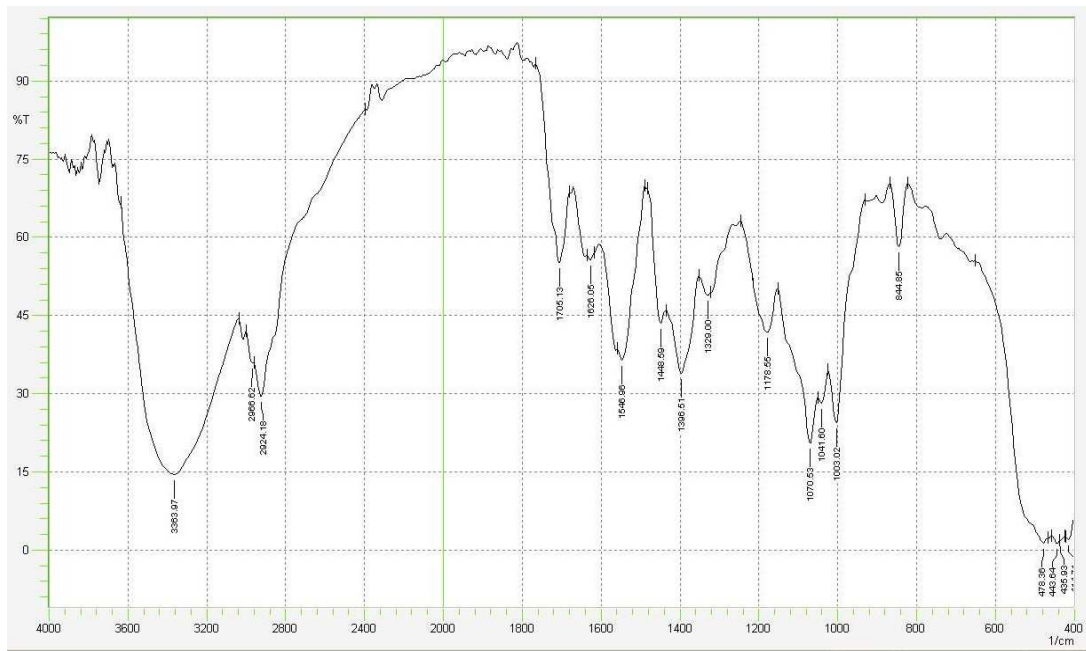
من ملاحظة الشكل 3 يتضح أن المضاد النانوي الهجين يظهر العديد من الحزم المميزة الجديدة التي تدل على نجاح عملية إقحام المضاد نستاتين بين طبقات أوكسيد الزنك . إن ظهور الحزمة عند التردد 3363 سم⁻¹ يعزى الى مط مجموعة O-H للحامض أما الحزمة عند التردد 3000 سم⁻¹ فتعزى الى مط C-H الأوليفينية ، بينما يعزى ظهور الحزمتين عند الترددين (2966 و 2924) سم⁻¹ الى وجود مط مجموعة CH₃ غير المتماثل والمتماثل ، على التوالي . وتعود الحزمة عند التردد 1705 سم⁻¹ الى مط C=O للحامض والأستر . وتعود الحزمة ضعيفة الشدة عند التردد 1626 سم⁻¹ الى مط C=C الأوليفينية ، فيما يعزى ظهور الحزمة عند التردد 1564 سم⁻¹ الى إهتزاز حني لمجموعة NH₂ و قد حصل فيها إنزياح نحو تردد أقل [11] .



الشكل (1) : طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الفطري النستاتين



الشكل (2) : طيف الاشعة تحت الحمراء لطبقات اوكسيد الزنك

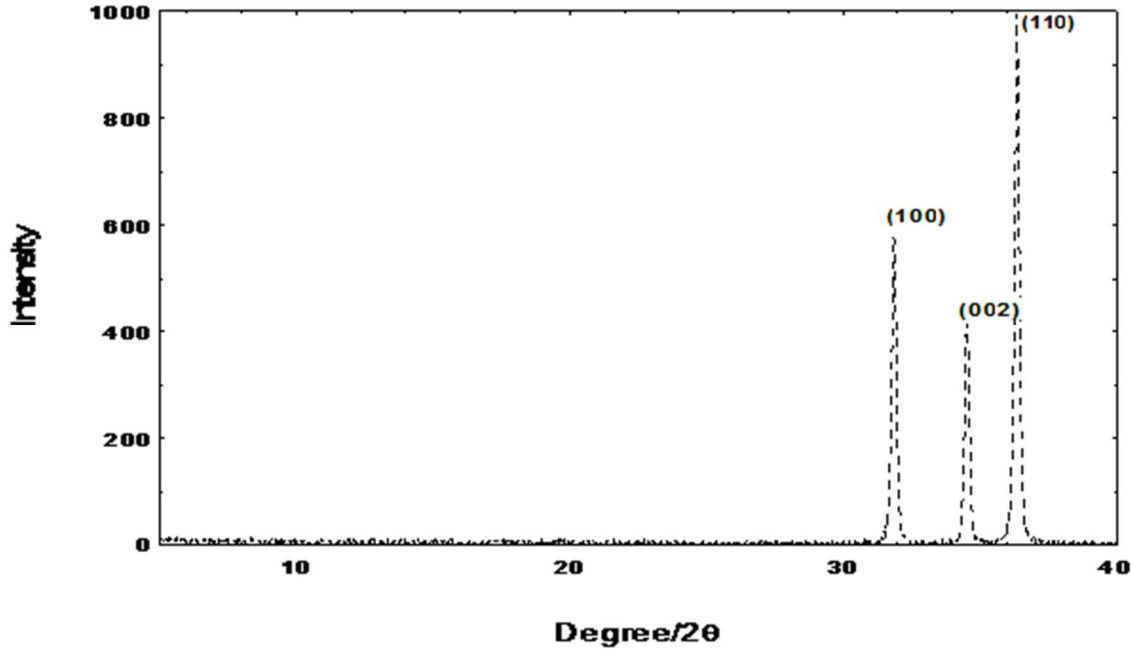


الشكل (3): طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO

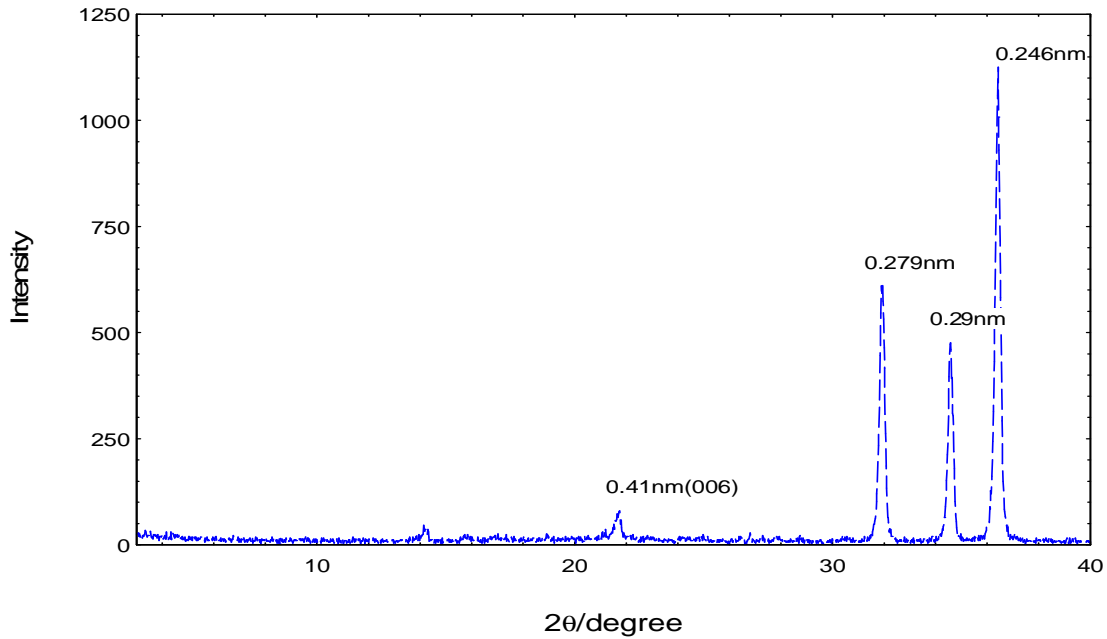
2- التشخيص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية

تم دراسة طيف حيود الأشعة السينية للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO فضلاً عن طبقات أوكسيد الزنك (ZnO) لمعرفة الإختلاف في سمك الطبقة قبل عملية إقحام المضاد الفطري النسنتاين بين طبقات أوكسيد الزنك .
 يبين الشكل 4 طيف حيود الأشعة السينية لأوكسيد الزنك ويظهر فيه حيود المستويات (100) عند الزاوية 31.29° ولها مسافة بلورية (d) تساوي 0.281nm والمستوي (002) عند زاوية 34.82° بمسافة بلورية تساوي 0.259nm اما المستوي (101) فقد ظهر عند الزاوية 36.29° وله مسافة بلورية تساوي 0.247nm [12] . و عند إجراء عملية التبادل الأيوني بين طبقات أوكسيد الزنك و المضاد النسنتاين يظهر حيود للمستوي (006) بمسافة بلورية 0.41nm ، إضافة الى وجود المستويات

العائدة الى طبقات أكسيد الزنك مما يدل على أن طبقات أكسيد الزنك لا تزال تحافظ على تركيبها الطبيعي وأن المضاد الستاتين قد إنحسر بين طبقات أكسيد الزنك كما هو موضح في الشكل 5 .



الشكل (4) : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) لطبقات أكسيد الزنك



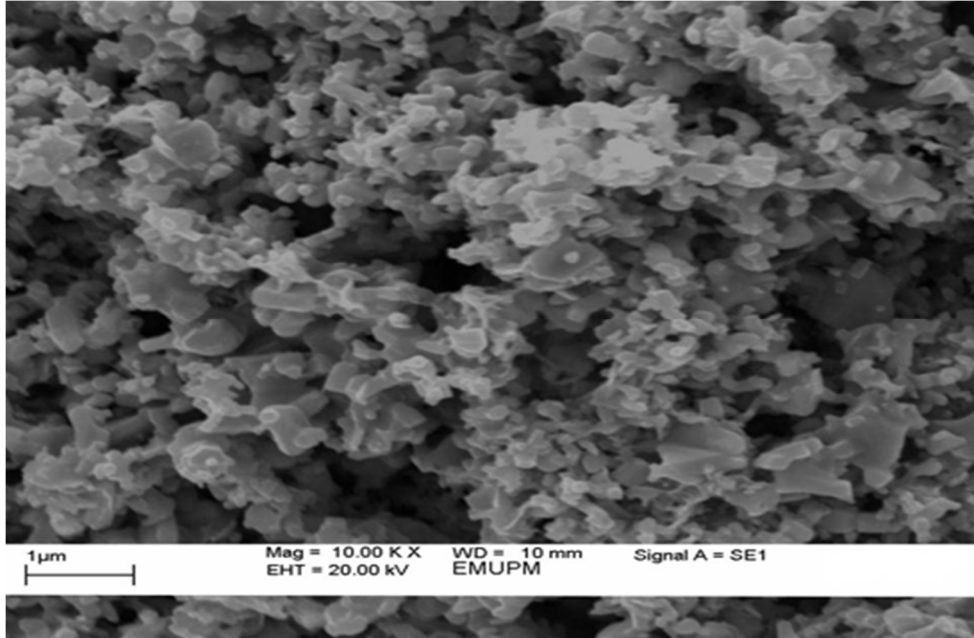
الشكل (5) : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO

3- الفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح (SEM)

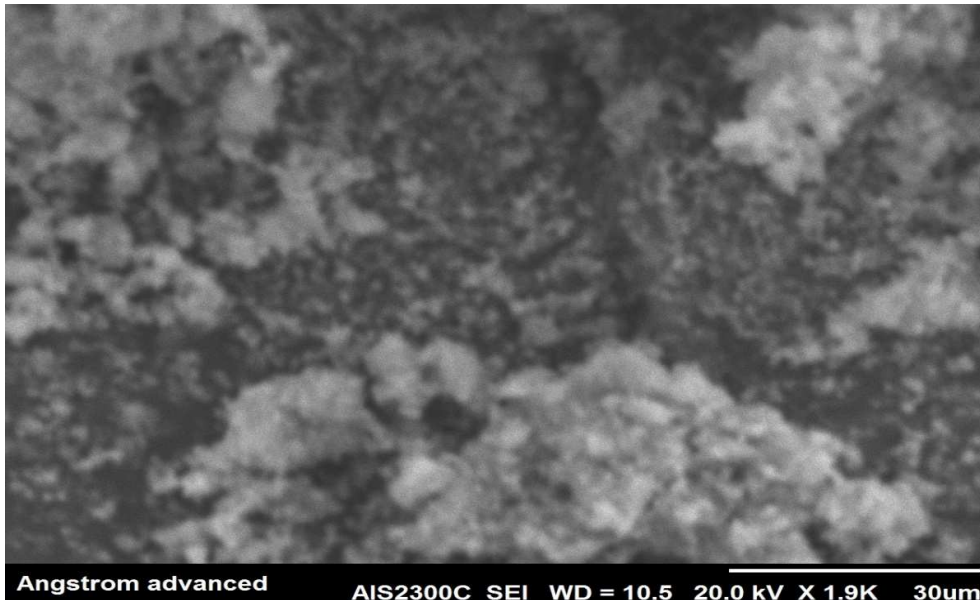
تم دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي Nys-ZnO وكذلك سطح طبقات أكسيد الزنك باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM).

يبين الشكل 6 صورة المجهر الإلكتروني الماسح لطبقات أكسيد الزنك إذ تشاهد الأشكال السداسية واضحة المعالم والتي تظهر فيها وريقات الأوكسيد متراكبة فوق بعضها البعض بأشكال وأحجام غير منتظمة [12]، إن هذه الأشكال تتحول الى شكل غير

مسامي عند تكون المضاد النانوي الهجين Nys-ZnO الناتج عن التفاعل المباشر لطبقات أكسيد الزنك مع المضاد النستاتين الحر مما يدل على نجاح عملية إقحام المضاد الى طبقات أكسيد الزنك كما في الشكل 7 .
تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما حصل عليه [13] إذ أدى إقحام المضاد octyl gallate بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد الى تكوين تراكيب ذات مسامية عالية .
في حين أشار [14] الى أن إقحام المضادات Ampicillin و Streptomycin و Kanamycin في جزيئات الذهب النانوية (Gold nanoparticles) يؤدي الى الحصول على تراكيب مكعبية (Cubic structures) وقضيبية (Rod) و شبيهة بالنجمة (Extended star like structure) ، على التوالي .



الشكل (6) : صورة بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM) لطبقات اوكسيد الزنك

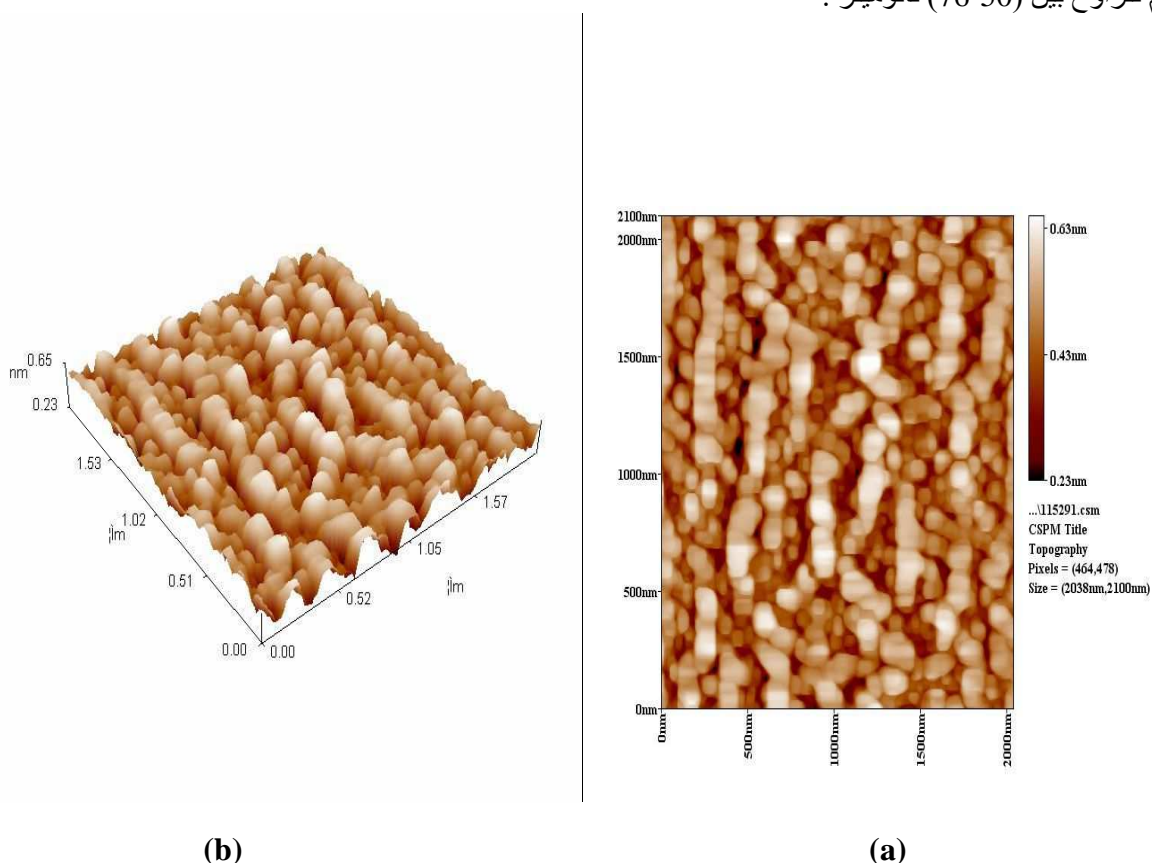


الشكل (7) : صورة بالمجهر الألكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO

4- الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM)

تم دراسة السطح الخارجي للمضاد الفطري النانوي الهجين قيد الدراسة . و يبين الشكل **8a** صورة ثنائية الأبعاد للمضاد الفطري Nys-ZnO تظهر فيها تجمعات جزيئية ذات أشكال شبه كروية . كما يظهر الشكل **8b** صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح المضاد النانوي الهجين و يلاحظ فيها إرتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 0.65 nm مما يشير الى تصنيع مضاد نانوي هجين من المضاد نستانين الحر و طبقات أكسيد الزنك . ويتضح من الجدول **1** أن معدل أحجام جزيئات (Means of particle size) للمضاد النانوي Nys-ZnO هي بحدود 78.34nm . و قد أدت عملية تحضير هذا المضاد الهجين الى الحصول على جزيئات بأقطار (30 و 35 و 40 و 45 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70 و 75 و 80 و 85 و 90 و 95 و 100) نانومتر بنسب (1.42 و 1.06 و 4.61 و 3.55 و 3.55 و 7.45 و 5.32 و 10.28 و 4.26 و 6.03 و 7.80 و 9.22 و 4.26 و 4.26 و 3.19) % ، على التوالي . و إعتماًداً على البيانات المتحصل عليها من الجدول **1** و طيف حيود الأشعة السينية (شكل **5**) فقد تم حساب معامل البلورية (Crystallinity Index) للمضاد قيد الدراسة و إتضح أنه يساوي 1.77 .

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجده [15] إذ تم الحصول على جزيئات مضادات نانوية هجينة ذات أشكال كروية بمعدل أحجام تتراوح بين (50-76) نانومتر .



الشكل (8) : صورة ثنائية الأبعاد (a) و ثلاثية الأبعاد (b) للمضاد Nys-ZnO بواسطة مجهر القوة الذرية

الجدول (1) : أقطار وحجوم و تجمعات جزيئات المضاد النانوي الهجين Nys-Zno بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

Avg. Diameter:78.34 nm								
Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume(%)	Cumulation(%)
30.00	1.42	1.42	70.00	4.26	41.49	110.00	3.90	84.40
35.00	1.06	2.48	75.00	6.03	47.52	115.00	3.55	87.94
40.00	4.61	7.09	80.00	7.80	55.32	120.00	2.84	90.78
45.00	3.55	10.64	85.00	9.22	64.54	125.00	2.48	93.26
50.00	3.55	14.18	90.00	4.26	68.79	130.00	3.55	96.81
55.00	7.45	21.63	95.00	4.26	73.05	135.00	3.19	100.00

60.00	5.32	26.95	100.00	3.19	76.24			
65.00	10.28	37.23	105.00	4.26	80.50			

التحليل الدقيق للعناصر :

أوضحت نتائج التحليل الدقيق للعناصر إحتواء المضاد النانوي الهجين Nys-ZnO و النستاتين الحر على نسب من الكربون و الهيدروجين و النيتروجين بلغت (19.851 و 3.439 و 0.0) % و (54.788 و 8.049 و 0.755) % ، على التوالي . ومن خلال هذه النتائج يتضح أن نسبة النستاتين المحمل على أكسيد الزنك بلغت 36.23 % .

الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO ضد عزلات خميرة الـ *Candida*

درس الفعل التثبيطي للمضاد الفطري النانوي الهجين Nys-ZnO ضد 23 عزلة من خميرة الـ *Candida* إشملت على 17 عزلة *C. albicans* و عزلتين *C. krusei* و عزلتين *C. parapsilosis* فضلاً عن عزلتين *C. tropicalis* . و يتضح من الجدول 2 أن الفعل التثبيطي للمضاد قيد الدراسة كان أقوى ضد العزلات *C. albicans* المعزولة من البول والجلد و الأظافر كما تميزت العزلة 17 *C. albicans* بمقاومتها لهذا المضاد . و من ملاحظة الجدول ذاته يتضح أن الفعل التثبيطي للنستاتين الحر ضد العزلات ذاتها كان أقوى من تأثير المضاد الفطري النانوي الهجين Nys-ZnO .

من ملاحظة نتائج تحليل العناصر CHN يتضح أن نسبة النستاتين المحمل على طبقات أكسيد الزنك كانت 36.23 % مما يعني أن المضاد الفطري النانوي الهجين Nys-ZnO يكون أقوى من النستاتين الحر في فعله التثبيطي إذا ما إستخدمت نفس التراكيز من النستاتين .

إن آلية الفعل التثبيطي للنستاتين ضد الفطريات تتمثل بارتباطه بالاركوستيرون الموجود في غشاء الخلية الفطرية مما يؤدي إلى حصول تغيرات في نفاذية الغشاء يتمخض عنها تحرر أيون البوتاسيوم و السكريات و المواد الايضية [16,17,18] . يعتقد ان تمزيق غشاء الخلية مسؤول عن موت الخلية الفطرية .

لم تتوفر دراسات سابقة عن الفعل التثبيطي للمضاد النانوي الهجين Nys-ZnO ضد عزلات *Candida spp.* في حين أشارت العديد من الدراسات الى الفعل التثبيطي للنستاتين الحر ضد هذه الأنواع من الخمائر ، فقد أوضح [19] أن قيمة التركيز المثبط الأدنى للمضاد الفطري نستاتين ضد عزلات خميرة *C. albicans* المعزولة من المرضى بلغت 0.25 ملغم / لتر . و في دراسة أخرى وجد [20] أن النستاتين يمتلك فعالية تثبيطية ضد 53 عزلة من خميرة *C. albicans* و 4 عزلات من خميرة *C. tropicalis* .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للجدول 2 أن هناك فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين المضاد النانوي Nys-ZnO والنستاتين الحر حيث تفوق المضاد النستاتين الحر بمعدل تثبيط 23.38 ملم على المضاد النانوي قيد الدراسة بمعدل تثبيط 18.18 ملم . كما بينت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين تراكيز المضادات إذ أوضحت النتائج أن هناك زيادة في معدل التثبيط لكل تركيز ويزداد هذا التثبيط مع زيادة تركيز المضاد الحر و المضاد النانوي و بفروقات معنوية ($p < 0.05$) . كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين عزلات الخميرة *Candida sp.* إذ كانت أكثر العزلات تحسناً للمضاد العزلة 4 *C. tropicalis* بمعدل تثبيط 24.08 ملم و أقلها تحسناً للمضاد العزلة *C. albicans* 17 بمعدل تثبيط 13.29 ملم .

الجدول (2): الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Nys-Zno و المضاد Nys الحر □ د الخميرة *Candida spp.*

معدل العزلات	Nys						Nys-Zno						المركبات
	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	تركيز المركب (ملغم/مل)
	قطر التثبيط بالملم												عزلات الخميرة
21.58 DE	30.5	29.5	28	25	19.5	10.5	29.5	26	25	20.5	15	0	<i>C. krusei</i> 1
21.71 D	30.5	29	27.5	25.5	22.5	12	30	26.5	25	18	14	0	<i>C. albicans</i> 2
17.33 I	26.5	25	24	21.5	18	0	29.5	25	20	18.5	0	0	<i>C. parapsilosis</i> 3
24.08 A	35	31	30	26	22	12.5	33	27	25	21	16.5	10	<i>C. tropicalis</i> 4
19.17 G	30	26.5	25	21.5	19.5	13.5	24	22	21	15.5	11.5	0	<i>C. albicans</i> 5
22.33 C	32.5	31.5	29.5	25.5	20	12.5	30	27.5	24.5	21	13.5	0	<i>C. parapsilosis</i> 6
18.63 H	26.5	25	24	21	18	11	32	22	18	15	11	0	<i>C. krusei</i> 7
19.42 G	30	30	25	25	17	0	30.5	24.5	19.5	16.5	15	0	<i>C. tropicalis</i> 8
21.13 E	31	30	29	26	20.5	0	31	26	23	20	17	0	<i>C. albicans</i> 9
22.79 BC	32	32	30.5	26.5	23.5	13.5	30.5	25	23	21.5	15.5	0	<i>C. albicans</i> 10
17.5 I	33	33	31	28.5	25	0	30.5	29	0	0	0	0	<i>C. albicans</i> 11
23.13 B	33	30	29	26.5	22	13	29.5	27	24	19.5	14	10	<i>C. albicans</i> 12
19.25 G	31.5	29.5	26	24	21.5	0	28	22	20.5	16	12	0	<i>C. albicans</i> 13
21.79 D	32	31	29.5	26	22.5	0	30	28.5	25.5	22	14.5	0	<i>C. albicans</i> 14

23.17 B	32.5	30	30	28	24.5	10	29.5	28.5	26.5	23.5	15	0	<i>C. albicans</i> 15
23.04 B	34.5	31	30	27	21.5	12	30	29	25.5	22	14	0	<i>C. albicans</i> 16
13.29 J	34	32	30.5	26.5	24.5	12	0	0	0	0	0	0	<i>C. albicans</i> 17
20.38 F	28.5	27.5	26	24	17.5	0	30.5	28	25	20.5	17	0	<i>C. albicans</i> 18
22.33 C	32	30	29	26.5	16.5	0	37.5	30.5	27.5	22	16.5	0	<i>C. albicans</i> 19
21.13 E	31	30	29	25.5	18.5	0	33.5	27.5	25.5	20	13	0	<i>C. albicans</i> 20
21.63 D	31.5	29	28	26.5	18	0	32.5	29	26	23	16	0	<i>C. albicans</i> 21
21.42 DE	28.5	27.5	27	26	19.5	0	34.5	28.5	26.5	22.5	16.5	0	<i>C. albicans</i> 22
21.67 D	30	29	28.5	25.5	17	0	36.5	29.5	25.5	23	15.5	0	<i>C. albicans</i> 23
	31.15 a	29.52 b	28.09 c	25.39 d	20.39 f	5.76 i	29.67 b	25.59 d	21.83 e	18.33 g	12.74 h	0.87 j	معدل التركيز
	23.38 A						18.18 B						معدل المركبات

* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين عزلات الخميرة.

* الحروف الكبيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين المركبات.

* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p < 0.05$) بين تراكيز المركبات.

العامل	المركبات	العزلات	التركيز	التداخل
LSD _{0.05}	0.140	0.476	0.243	1.650

المصادر :

- 1- **Cortes, J.A. ; Reyes, P. ; Gomez, C. Buitrago, G. and Leal, A.L.**(2011).Fungal blood stream infections in tertiary care hospitals in Colombia.**Rev Iberoam Micol.**28:74-8.
- 2- **Zuluaga, A. ; de Bedout, C. ; Restrepo, C.A. ; Parra, H.H. ; Arteaga, M.A. and Restrepo, A.**(2010). Susceptibility to fluconazole and voriconazole of *Candida* species isolated from intensive care units patients in Medellin,Colombia(2001-2007).**Rev Iberoam Micol.**27:125-9.
- 3- **Nicholls, S. ; MacCallum, D. ; Kaffarnik, F. ; Selway, L. ; Peck, S. and Brown, A.** (2011). Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. **Fungal Genet Biol**, vol.48, pp. 297-305.
- 4- **Lai, C.C. ; Tan, C.K. ; Huang, Y.T. ; Shao, P.L. and Hsueh, P.R.**(2008). Current challenges in the management of invasive Fungal infections. **J Infect Chemother.**14:77-85.
- 5- **Cavaleiro, C. ; Pinto, E. ; Goncalves, M.J. and Salgueiro, L.**(2006). Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte , *Aspergillus* and *Candida* Strains. **J Appl Microbiol.**100:1333-8.
- 6- **Hazen, E.L. and Brown, R.**(1950). **Science** ,112,423.(Cited from Onyewu and Heitman , 2007).
- 7- **Nilesh, J. ; Ruchi, J.; Navneet ,T. ; Brham, P. Gupt; Deepak, K. Jain ; Jeetendra, B. and Surendra, J .** (2010) . NANOTECHNOLOGY: A SAFE AND EFFECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEM . **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research** . ISSN-0974-2441. Vol. 3, Issue 3.
- 8- **Kolekar , T.V. ; Yadav, H.M. ; Bandgar, S.S. and Deshmukh, P.Y.**(2011). Synthesis By Sol-gel Method And Characterization Of Zno Nanoparticles. **Indian Streams Research Journal**, Vol. I, Issue. I, DOI : 10.9780/22307850.
- 9- **Pine, X.; Medina-Ramirez, R.; Mernaughc, R. and Liu, J.** **Biointerfaces** , 77:82-89. (2010).
- 10- **Egorove,N.S.**(1985).Antibiotics ascientific approach. **Mir Publishers**, Moscow.
- 11- **Silverstein, R.M. ; Webster, F.X. and Kiemle, D.J.**(2005). "Spectrometric Identification of organic compounds " **7th Ed. John Wiley & Sons . INC.** Printed in the United States of America .
- 12- **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.
- 13- **Shaheed, S.A. ; Al-Ghanimi, A.A.K. and Bashi, A.M.**(2014). Preparation of nanohybrid compound from the food preservative octyl gallate and studying some of its biological activities. **MSc.Thesis**.
- 14- **Bhattacharya,D.;Saha,B. ; Mukherjee,A. ; Santra,C. and Karmakar,P.**(2012).Gold nanoparticales conjugated antibiotics; stability and functional evaluation. **Naosience and nanotechnology** ,2(2):14-21.
- 15- **Zarina, L. and Nada, A.**(2014). Green approach for synthesis of Silver nanoparticles from marine *Streptomyces*-MS 26 and their antibiotic efficacy, **J. Pharm. Sci. & Res.** Vol. 6(10),321-327.
- 16- **Carrillo-Muñoz , A.J.; Brió, S. and Quindós, G.** (2001). A new generation of anti-fungal drugs. **Rev Iberoam Micol;** 18: 2-5.
- 17- **Carrillo-Muñoz, A.J. ; Quindós, G. and López-Ribot, J.L.**(2004). Current develop-ments in antifungal agents.**Curr Med Chem Anti Infective Agent.** 3: 297-323.
- 18- **Zotchev , S.B.**(2003). Polyene macrolide antibiotics and their applications in human therapy.**Curr Med Chem.**10: 211-223.
- 19- **Mahmoudabadi, Z. and Drucker, D.B.** (2006). Study of the effect of amphotericin B , nystatin and miconazole on the polar lipids of *C . albicans* and *C . dubliniensis*. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products.** Vol. 1, 18-25.

20-Salehi, Z. ; Seifi, Z. and Mahmoudabadi, A. Z.(2012).Sensitivity of vaginal isolates of *Candida* to eight antifungal druges isolated from Ahvas , Iran.**Jundishapur J Microbiol**, 5(4):574-577.