Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

Isolation and Identification of different local isolates of *Candida spp.* By biochemical tests

Sahar Basil Muhammed*[1], Zena wajeeh aljader[2]

[1,2]Department of Biology, College of Education for pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq

E. Mail [1*] sah94bas687874@gmail.com , [2] dr.zena.algader@uomos.edu.iq

(Received April 25, 2021; Accepted June 08, 2021; Available online August 28, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2021.168644, © 2021, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

Study included, 10 local isolates were obtained from 25 isolates of *Candida spp.* From patients infected with Candidiasis in hospitals of Mosul city. The phenotypic, microscopic diagnosis and biochemical tests found the isolates were identified as Candida sp. Local isolates were tested for resistance to 8 different antibiotics and 6 heavy metal salts. All isolates were resistant to most antibiotics with ratio 100%, except for the antibiotic nystatin (Nys), where all isolates showed sensitivity in the ratio 100%. also The isolates showed sensitivity to four of the heavy metals salts in different proportions, while they were resistant to zinc chloride (ZnCl2) and lead acetate Pb (CH3COO) 2 with ratio 100%.

Keyword: *Candida* spp , Candidiasis , Biochemical Testes.)

عزل وتشخيص عزلات محلية مختلفة من الخميرة *Candida* spp. بالاختبارات الكيموحيوية

سحر باسل محمد [1]، د.زينة وجيه الجادر [2]

قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل, العراق

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحصول على 10 عزلات محلية من بين 25 عزلة من الخميرة *Candida* spp. من الأشخاص المصابين بداء المبيضات في مستشفيات مدينة الموصل ، شخصت العزلات باستخدام الصفات المظهرية والزرعية بالاضافة الى الاختبارات الكيموحيوية ، واظهرت نتائج الاختبارات انها تعود الى جنس الـ*Candida* ، اختبرت مقاومة العزلات المحلية لـ 8 انواع مختلفة من المضادات الحيوية و 6 أملاح من المعادن الثقيلة وكانت جميع العزلات مقاومة لأغلب المضادات الحيوية بنسبة 100%، باستثناء المضاد الحيوي النستاتين (Nys)حيث ابدت العزلات جميعها حساسية بنسبة 100% . كما اظهرت العزلات حساسية لأربعة من املاح المعادن الثقيلة بنسب متباينة في حين كانت مقاومة لكل من كلوريد الزنك ($ZnCl_2$)، وخلات الرصاص Pb $(CH_3COO)_2$ وبنسبة 100%.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الكلمات المفتاحية: *Candida* spp. ، داء المبيضات ،الاختبارات الكيموحيوية

المقدمة: Introduction

الخمائر هي فطريات وحيدة الخلية حقيقية النواة عديمة الحركة تكون خلاياها بيضوية الشكل او كروية وفي بعض الأحيان متطاولة , تتكاثر لاجنسياً بالتبرعم Budding والانقسام الثنائي Binary fission [1] أما التكاثر الجنسي فيكون عن طريق تكوين جراثيم اسكية او بازيدية, تتميز مستعمراتها النامية على الوسط الغذائي بألوان مختلفة منها الأبيض، الكريمي، الأصفر، الوردي، البرتقالي ونادراً ماتعطي ميسيليوم حقيقي او قد تشكل أحيانا مايعرف بالميسيليوم الكاذب [2] وهي من الناحية الاقتصادية تعد من أهم الكائنات الحية المستخدمة [3], تتواجد بصورة طبيعية وبصورة مرضية مثل خميرة الـ *Candida* والمعروفة بالمبيضات [4] يوجد حوالي (200) نوع عائد الى جنس *Candida* spp إلا ان هناك حوالي 20 نوعا فقط تكون مسؤولة عن داء المبيضات للإنسان والحيوان [5] وتعتبر إجبارية المعيشة obligate commensal وذلك لقلة وجودها حرة في الأوساط البيئية كالتربة والمياة [6]. تعتبر خميرة الـ *Candida* من الفطريات الإنتهازية والتي يمكن ان تسبب داء المبيضات (Candidiasis) الى ما يقارب من (30–50)% من الافراد الاصحاء في العالم [7]. ينتمي جنس المبيضات الى الفطريات الناقصة (Imperfect Fungi) ضمن شعبة Deuteromycotina صنف Blastomycetes [8]، ولكن وجد أن بعض سلالات هذا النوع تكون سبورات كيسية لذلك صنفت تحت قسم الفطريات الكيسية Ascomycotina صنف Hemiascomyctes [9]. وان داء المبيضات والذي يطلق عليه Candidiasis [10] هو مصطلح واسع يشير الى التهاب الأعضاء الجلدية والمخاطية والداخلية التي تسببها الفطريات من جنس الـ *Candida* والتي يمكن ان تحدث في أي عمر وعادة ماتحدث في حالات ضعف المناعة المكتسبة عن الإصابة ببعض الامراض مثل مرض نقص المناعة المكتسبة. ويسبب داء المبيضات Candidiasis التهاب مجرى الدم والتهاب الأعضاء الداخلية داخل البطن و التهاب االعظم, ويرتبط داء المبيضات إرتباطا وثيقا بالتقدم في التكنولوجيا الطبية ومعترف به على نطاق واسع كسبب رئيس للإصابة بالأمراض والوفيات في المراكز الصحية [11] [12]. تشكل داء المبيضات Candidiasis تهديدا للمرضى الراقدين في المستشفى و الذين يعانون من ضعف المناعة ، وتتفاقم مقاومة الادوية الناشئة بين أنواع المبيضات بسبب قلة توافر المضادات الفطرية والاثار الجانبية المرتبطة بها [13], إذ تتوفر حالياً ثلاثة أصناف من مضادات الفطريات والتي تتميزة بفعاليتها التثبيطية ضد أنواع خميرة *Candida* spp. وتشمل تلك المضادات على مجاميع Polyenes و Azole وEchinocadins [14], ويعد المضاد الفطري النستاتين Nystatin أول مضاد من مجموعة ال polyenes والذي تم اكتشافه عام 1950 واستخدم بنجاح في المراهم الجلدية السطحية Topical creams والغسولات الفمويةOral washes كعلاج لداء المبيضات [15]. وتعد ال *Candida* المسبب الثاني الأكثر شيوعا في الإصابة المهبلية Vaginal infection ويشار اليه أحيانا بالسلاق المهبلي Vaginal thrush او داء المبيضات المهبلي Vaginal candidiasis ويقدر ان 75% من النساء يعانين على الأقل لمرة واحدة خلال فترة حياتهن من داء المبيضات المهبلي وتحدث الإصابة نتيجة للنمو المفرط لخميرة *Candida albicans* [16] ومن العوامل التي تساهم في زيادة الإصابة هي الحمل [17] وعدم التوازن الهرموني وتثبيط المناعة [18] او استخدام مضادات واسعة الطيف [19] .الهدف من البحث عزل أنواع مختلفة من خميرة الـ *Candida* وتشخيصها بالطرق المظهرية والمجهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

1. المواد وطرائق العمل : Meterials and Methods

جمع العينات : Sample Collection

تم الحصول على العزلات الخميرية باخذ مسحات من الفم والإدرار والمهبل من المرضى المصابين بداء المبيضات في مستشفيات الموصل وبأعمار مختلفة، في شهر اب وأيلول من سنة2020 بواسطة مسحات قطنية Swabs، وتم زراعة العينات الماخوذة بالمسحات على الوسط الزرعي Sabouraud Dextrose agar (SDA) وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37م° لمدة 48 ساعة . وقد تم اجراء البحث في مختبرات قسم علوم الحياة للدراسات العليا/كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة الموصل.

العزل والتشخيص : Isolation and Identification

زرعت العينات على الوسط Sabouraud Dextrose Agar المحضر من 4 غم دكستروز،1غم ببتون, 1.7 أكار, أُذيبت المكونات في 90 مل من الماء المقطر , وضبط ال pH عند 5.6 ثم عقم بجهاز المعقام, اذيب السكر في 10 مل من الماء المقطر وعقم بالترشيح بعد ان برد الوسط الى 55° م أُضيف اليه السكر وتم صبه في اطباق . وحضنت الاطباق عند درجة حرارة 37م° ولمدة 48 ساعة. وشخصت بالاعتماد على المواصفات المظهرية والكيموحيوية [20] .

الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Testes

1-اختبار تخمر السكريات Sugar Fermentation Test

تم تحضير وسط تخمر السكريات باذابة 4.5 غم من مستخلص الخميرة، 7.5 غم ببتون في 860 مل من الماء المقطر. اذيب 0.1 غم من صبغة المثيل الأحمر في 100 مل من الماء المقطر واخذ منه 40 مل واضيف الى باقي المكونات ، وصب الخليط في دوارق مخروطية بواقع 90 مل لكل دورق ثم عقمت بالمعقام. تم اذابة 2 غم من كل سكر في 10 مل من الماء المقطر واضيف الى الوسط بعد تعقيمه بالترشيح. صبت محتويات كل دورق في انابيب اختبار معقمة بواقع 10 مل لكل انبوبة. تم استخدام 8 أنواع مختلفة من السكر وهي (مالتوز، ، لاكتوز، سكروز، مانوز، أرابينوز، كلاكتوز، كلوكوز ، زايلوز) تم نقل المستعمرات النامية بعمر 48 ساعة حضانة الى الانابيب الحاوية على وسط التخمر ووضعت في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 28م° لمدة 10-12 يوم مع ملاحظة العينات كل 24 ساعة [21].

2-اختبار مقاومة وحساسية الخميرة المحلية للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة

Sensitivity of local Yeast Isolates *Candida spp* for Antibiotic and Heavy Metals

لمعرفة مدى مقاومة وحساسية العزلات للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة تم استخدام وسط SDA بعد ان برد الوسط الى درجة 55–60 م° تم إضافة المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة بالترشيح وبالتراكيز المبينة بالجدول (1)، زرعت العينات بطريقة التخطيط وحضنت لمدة 37م° وسجلت النتائج [22].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

جدول(1) المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة المستخدمة في دراسة حساسية عزلات خميرة *Candida* spp

المضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة	الرمز	المحلول الخزين ملغم/مل	التركيز النهائي مايكروغرام/مل	المذيب
كلورامفينكول	Cm	5	100	كحول مطلق ايثانول
أمبيسلين	Ap	20	100	ايثانول 70%
الايرثرومايسين	Er	10	100	كحول مطلق ايثانول
التتراسايكلين	Tc	10	100	ايثانول 50%
الفلوكونازول	Flc	100	10000	DMSO
بالكيتوكونازول	Ktc	100	10000	DMSO
الايتراكونازول	Itc	100	10000	DMSO
النستاتين	Nys	100	10000	DMSO
كلوريد الزئبق	HgCl2	50	100	ماء مقطر
كبريتات النحاس	CuSO4	50	100	ماء مقطر
كلوريد الكادميوم	CdCl2	50	100	ماء مقطر
كلوريد الكوبلت	CoCl2	100	100	ماء مقطر
كلوريد الزنك	ZnCl2	50	100	ماء مقطر
خلات الرصاص	Pb(CH3COO)2	50	100	ماء مقطر

3-اختبار الكتاليز Catalase Test

اخذت المستعمرات النامية على وسط العزل (YPG) بعمر 48 ساعة وفرشت على شريحة زجاجية ثم اضيف اليها 1-2 قطرة من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز 3% وسجلت النتائج [23].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

4-اختبار تحلل النشا Starch Hydrolysis Test

تم تحضير الوسط باذابة 2.8 غم من الاكار المغذي (Nutrient Agar) و0.3 غم من النشا في 100 مل من الماء المقطر ثم عقم بالمعقام, تم زرع العينات بطريقة التخطيط وبعد 24 ساعة حضانة بدرجة حرارة 28م° اخذت العينات للإختبار بإضافة بضع قطرات من محلول الأيودين بدرجة حرارة المختبر .سجلت النتائج بعد مرور من 1−3 دقيقة من إضافة الأيودين [24].

5-اختبار الجيلاتين Gelatin Liquefaction Test

تم تحضير الوسط في 100 مل من الماء المقطر وذلك باذابة 12 غم جيلاتين (Gelatin)، 0.5 غم ببتون (pepton) و0.3 غم مستخلص لحم البقر (beef extract). عقم الوسط ثم صب في أنابيب إختبار ووضعت بشكل مائل لكي تتصلب، تم نقل المستعمرات النامية الى انابيب الاختبار وحضنت لمدة 48 ساعة بدرجة 28م° في حالة تحلل الوسط توضع الانابيب في الثلاجة بدرجة 4م° لنصف ساعة بعدها سجلت النتائج[25].

6-اختبار تكوين ألانبوب الجرثومي Germ tube Formation Test

اخذ جزء من المستعمرة ووضعها في انبوب اختبار معقم يحتوي على 0.5 مل من مصل دم الانسان وحضنت بدرجة 37م° لمدة 4-2 ساعات [26] .

7-اختبار تكوين الابواغ الكلاميدية Chlamydospores Production Test

تم تحضير الوسط باذابة 17 غم من Corn meal Agar ثم لقح الوسط بمستعمرات من خميرة المبيضات وحضنت في 30م° وتمت مراقبتها لمدة 3-5 أيام، بعد إنتهاء الفترة نقلت مستعمرة واحدة الى شريحة نظيفة وصبغت بصبغة اللاكتوفينول الزرقاء، تركت لتجف ووضع غطاء الشريحة عليها ثم فحصت تحت المجهر لرؤية السبورات الكلاميدية [27].

8−اختبار النمو على وسط كروم اكار Growth Test on Chrom Agar

أُجري هذا الاختبار باخذ جزء من مستعمرة الخميرة النامية على وسط SDA بعمر 24 ساعة وزرعت على وسط اكار الكروم حسب تعليمات الشركة المجهزة وحضنت لمدة 24−48 ساعة بدرجة حرارة 37 م ° [28].

9- اختبار تاثير اختلاف درجات الحرارة على النمو

Test the Effect of Temperature Differences on Growth

تم في هذا الاختبار استخدام وسط (SDA) حيث اخذت العينات وزرعت بطريقة التخطيط على الوسط وحضنت بدرجات حرارية مختلفة هي 45،37،28،23 م ° لمدة 48 ساعة وبعدها سجلت النتائج [46].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

النتائج والمناقشة : Results and discussion

تشخيص العزلات المحلية Diagnosis of Local Isolates

تم الحصول على 10 عزلات محلية من خميرة الـ *Candida* والتي تم عزلها من أجزاء مختلفة من جسم الانسان الفم والمهبل والإدرار وشخصت بشكل مبدئي بالإعتماد على الشكل الخارجي Morphology للمستعمرات والصفات المجهرية, فظهرت المستعمرات بالوان متباينة ما بين الأبيض والكريمي ذات حواف ملساء واسطح ناعمة لماعة شكل (1) .تتفق هذه النتيجة مع [29] و[30] من حيث الصفات المظهرية للمستعمرات.

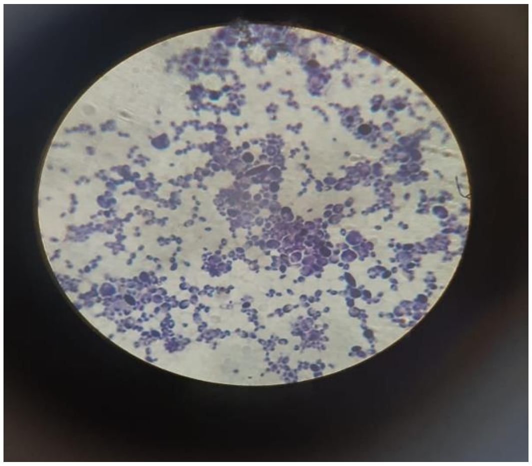
شكل (1) المظهر الخارجي للمستعمرات المفردة من جنس الـ *Candida* spp.

الفحص المجهري Microscopic Test

ظهرت المستعمرات تحت المجهر كروية الشكل الى بيضاوية وكانت مفردة او متبرعمة مع وجود خيوط فطرية كاذبة Pseudohyphae أحيانا ،إضافة الى كونها موجبة لصبغة كرام شكل (2). وهذا يتفق مع [31] من حيث شكل الخلايا.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.



(أ) خلايا عزلات *Candida* spp تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (x100).
(ب) خلايا عزلات *Candida* spp. مصبوغة بصبغة كرام بقوة تكبير (X100)

الاختبارات الكيموحيوية لعزلات خميرة الـ *Candida spp.*

Biochemical Test for isolates yeast *Candida* spp.

بعد الحصول على عزلات خميرة الـ *Candida spp* وتشخيصها من حيث الفحص المجهري والشكل الخارجي للمستعمرات. تم اجراء الاختبارات الكيموحيوية وكالاتي :

1- اختبار تخمر السكريات Sugars Fermentation Tests

بينت النتائج ان جميع العزلات كانت قادرة على تخمير السكريات (كلوكوز ،سكروز ، مالتوز ، مانوز ، كالاكتوز) وبنسبة 100% حيث تغير لون الوسط من اللون الأحمر الى اللون الأصفر دلالة على تخمير السكر في حين لم تتمكن جميع العزلات من تخمير السكريات (لاكتوز) وبنسبة 100%. شكل (3). ان عدم قدرة العزلات على تخمير سكر اللاكتوز يعود لعدم قدرتها على انتاج انزيم β_galactosidase والذي يعمل على تكسير اللاكتوز الى كلوكوز وكالاكتوز لتتمكن الخميرة من استهلاكه كمصدر كاربوني [32] اما سكر الزايلوز فكانت العزلات (C1,C2,C3,C5,C9) غير قادرة على تخمير السكر ،جدول (2). هذه النتائج تتفق مع [33] و[34].من حيث قدرة الخميرة على تخمر السكريات وعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

جدول(2) قدرة عزلات خميرة الـ *Candida spp.* على تخمير أنواع مختلفة من السكريات.

العينات	مالتوز	لاكتوز	سكروز	مانوز	كلاكتوز	كلوكوز	زايلوز
C1	+	_	+	+	+	+	_
C2	+	_	+	+	+	+	_
C3	+	_	+	+	+	+	_
C4	+	_	+	+	+	+	+
C5	+	_	+	+	+	+	_
C6	+	_	+	+	+	+	+
C7	+	_	+	+	+	+	+
C8	+	_	+	+	+	+	+
C9	+	_	+	+	+	+	_
C10	+	_	+	+	+	+	+

(+) نتيجة موجبة   (−) نتيجة سالبة

شكل(3) اختبار تخمر السكريات لعزلات الـ *Candida* spp

1-سكر الكلوكوز 2-سكر المانوز 3- سكر اللاكتوز

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

2-اختبار مقاومة وحساسية عزلات خميرة *Candida spp* للمضادات الحيوية واملاح المعادن الثقيلة

Sensitivity of local Yeast isolates *Candida* spp for Antibiotic and Heavy metals

بينت النتائج تباين العزلات المحلية للخميرة في مدى مقاومتها للمضادات الحيوية فقد أظهرت العزلات مقاومتها لكل من الامبسلين (Am)، كلورامفينيكول (Cm)، تتراسايكلين (Tc)، الايرثرومايسين (Er)، الفلوكونازول (Flu)، الكيتوكونازول (Keto)، الايتراكونازول (Itro) وبنسبة 100% ، أما بالنسبة للمضاد الحيوي الفطري النستاتين (Nys) فقد كانت جميع العزلات المحلية حساسة لهذا المضاد عند التركيز النهائي 1000 ميكروغرام/مل وبنسبة 100% جدول (3). تعود قدرة النستاتين لقتل الجراثيم او تثبيط نموها الى تفاعله مع الاغشية الخلوية مسببا اضراراً للخلية مما يؤدي الى تغيير في نفاذية الخلية الانتقائية ، بناء على النتائج التي حصلنا عليها فان النستاتين هي الأكثر فعالية في العزلات المدروسة بالمقارنة مع المضادات الفطرية الأخرى وهذا يتفق مع [35] و[36] من حيث مقاومتها للمضادات الفطرية (فلوكونازول و كيتوكونازول وايثروكونازول) وحساسيتها للمضاد الفطري النيستاتين وقد تعزى مقاومة العزلات للمضادات أعلاه الى الية التعبير المفرط Overexpression لجينات ال CDR وبالتالي زيادة البروتينات الناقلة التي ستضخ المضاد الفطري الى خارج الخلية الفطرية وتتفق النتيجة مع [37] في اختبار الحساسية الذي اجراه على36 عزلة من الـ *Candida* والمعزولة من مواضع مختلفة من جسم الانسان تجاه المضادات الفلوكونازول, الكيتوكونازول, الايتروكونازول والكلوتريمازول.

يتضح من الجدول (3) ان جميع العزلات المحلية لخميرة *Candida* spp كانت مقاومة لكل من كلوريد الزنك($ZnCl_2$)، وخلات الرصاص $Pb(CH_3COO)_2$ وبنسبة 100%, في حين كانت العزلات حساسة لكل من كلوريد الزئبق ($HgCl2$) بنسبة 100% ولكبريتات النحاس ($CuSO_4$) بنسبة 80% وكلوريد الكادميوم ($CdCl_2$) بنسبة 90% وكلوريد الكوبلت ($CoCl_2$) بنسبة 40%، يعود السبب الى ان المعادن الثقيلة ترتبط بالاوكسجين والنتروجين ومجموعة الكبريت المائية في البروتين التابع لخلية الخميرة مما يؤدي الى حدوث تغيرات في النشاط الانزيمي فقد وجد ان الزئبق يمنع تنفس الخميرة [38] حيث ان حساسية العزلات كانت واضحة لكلوريد الكادميوم باستثناء العزلة (C4) التي أبدت مقاومة له وتمكنت من النمو في الوسط . ان وجود الكادميوم او املاحه في بيئة الخمائر يؤدي الى استثارة الاستجابة للحرارة او بيروكسيد الهيدروجين وهذه الاستجابة متخصصة جدا حيث ان هناك 32 جين يتم حثها عند المعاملة بالكادميوم والتي تساهم في تصنيع الحوامض الامينية الحاوية على الكبريت واللازمة لتصنيع الكلوتاثايون Glutathione enzyme وهذا الانزيم يسيطر على تركيز العناصر بعملية الاقتناص او الاحتجاز [39].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

جدول3.إختبار الحساسية للمضادات الحيوية وأملاح المعادن لعدد من عزلات خميرة *Candida* Spp

المضادات الحيوية وأملاح المعادن	الرمز	التركيز النهائي UG/ML	عزلات الخميرة قيد الدراسة									
			C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
كلورامفينكول	Cm	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
امبسلين	AP	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ايرثرومايسين	Er	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
تتراسايكلين	Tc	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
فلوكونازول	Flu	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
كيتوكونازول	Ktc	10000	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ايتراكونازول	Itc	10000	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
النستاتين	Nys	10000	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
كلوريد الزئبق	$HgCl_2$	10000	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
كبريتات النحاس	$CuSO_4$	100	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R
كلوريد الكادميوم	$CdCl_2$	100	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S
كلوريد الكوبلت	CoCl2	100	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S
كلوريد الزنك	ZnCl2	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
خلات الرصاص	Pb(CH3COO)2	100	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

R= Resistant S=Sensitive

3-اختبار انتاج الكتاليز Catalase Test

بينت نتائج الاختبار قدرة جميع العزلات على انتاج انزيم الكتاليز وبنسبة 100% .يستدل على النتيجة الموجبة بظهور فقاعات غازية بسبب تحلل البيروكسيد الى غاز الاوكسجين وماء وتتفق هذه النتائج مع [40] بعد اختبار 90 عزلة تعود لانواع مختلفة من جنس الـ Candida، 58 عزلة منها كانت موجبة لإختبار الكتاليز .

4- اختبار تحلل النشا Starch Hydrolysis Test

أظهرت النتائج قدرة العزلات على تكوين مركبات الاميلود التي تتمكن من تحليل النشا والذي يكشف عن قدرة الاحياء المجهرية على تحليل النشا باستخدام الايودين حيث يغمر سطح المستعمرات بكمية مناسبة منه، وان ظهور الهالة الشفافة حول المستعمرة النامية تدل على تحلل النشا مما يؤكد افرازها لانزيم الاميليز،. وان قدرة الـ*Candida* على تحليل النشا يعود الى ان النشا مادة كاربوهيدراتية عبارة عن نوعين من الوحدات الأولى هي اميلوز Amylose والتي تكون بشكل سلاسل مستقيمة من الكلوكوز والثانية هي اميلوبكتين

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

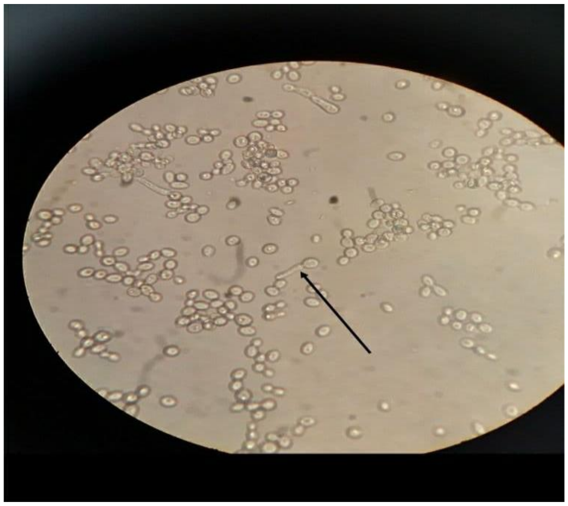
Amylopectin ذات السلاسل المتفرعة من الكلوكوز ولكي تتمكن الخميرة بصورة خاصة والاحياء المجهرية بصورة عامة من تحليل النشا فلا بد لها ان تكون قادرة على افراز انزيم الفا وبيتا اميليز لكسر سلاسل الاميلوز المستقيمة وكذلك يجب ان تكون قادرة على افراز انزيم 1-6 glucosidase لكسر سلاسل الاميلوبكتين المتفرعة وهذه النتيجة مقاربة لنتائج [41] من حيث قدرة العزلات على تحلل النشأ بنسبة 70%.

5-اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin Liquefaction Test

بينت نتائج هذا الاختبار قدرة العزلات على تحلل الجيلاتين، وذلك لقدرتها على انتاج انزيم الجيلاتينيز Gelatinase enzyme الذي يعمل على تحليل بروتين الجيلاتين المكون الأساسي للوسط. هذه النتائج تتفق مع[42] عندما اختبر 172 عينة تمكنت من تحلل الجيلاتين بإستثناء 6 منها كانت غير قادرة على تحليله.

6-اختبار تكوين الانبوب الجرثومي Germ tube formation Test

أظهرت نتائج الشكل (4) بان معظم العزلات المحلية لم تتمكن من تكوين الانبوب الجرثومي بعد وضعها في انبوبة حاوية على مصل الدم لمدة 2-4 ساعات باستثناء العزلات (C6 وC8) حيث ظهرت قابليتها على تكوين الانبوب الجرثومي والذي يعد صفة تشخيصية للنوع *C. albicans* وهذه النتيجة جاءت مطابقة لنتائج [43] الذي ذكر ان *C. albicans* لها القدرة على تكوين انبوب الإنبات .



شكل 4- تكوين الانبوب الجرثومي Germ tube لبعض انواع الـ Candida

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

6-اختبار تكوين السبورات الكلاميدية Chlamydospore formation Test

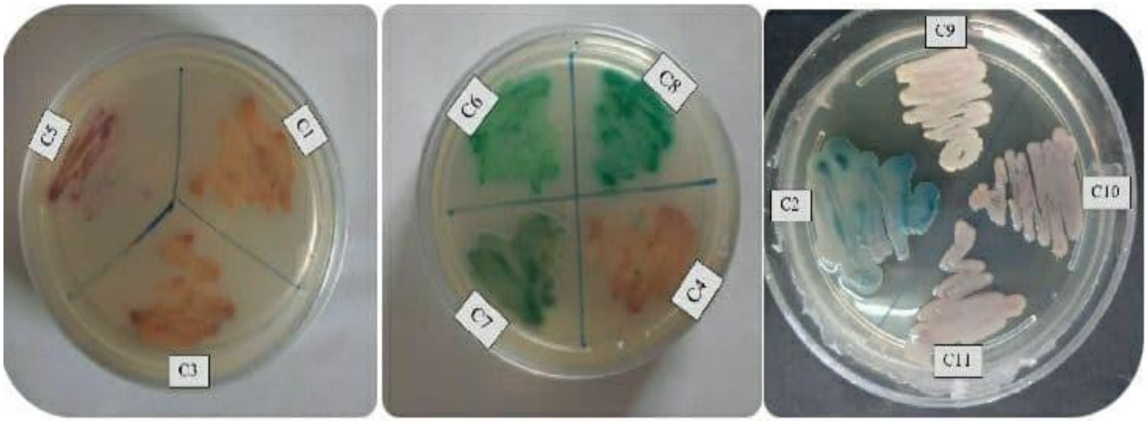
اوضحت نتائج الشكل (5) عدم قدرة العزلات المحلية على تكوين السبورات الكلاميدية عند تنميتها على وسط Corm meal Agar لمدة خمسة أيام من التحضين باستثناء العزلات (C6 وC8)التي تمكنت من تكوين السبورات الكلاميدية وهي صفة تشخيصية للنوع *C.albicans* ،وهذه النتيجة تتطابق مع [44] من حيث قدرة الخميرة *C.albicans* على تكوين السبورات الكلاميدية وتستعمل هذه الميزة لتحديد وتمييز *C.albicans* عن بقية أنواع المبيضات الأخرى .

شكل(5) تكوين السبورات الكلاميدية Chlamydospore لبعض أنواع الـ *Candida*

7-اختبار النمو على وسط الكروم اكار Growth test on Chrom Agar

تم تشخيص أنواع المبيضات *Candida* spp المعزولة على الوسط التفريقي Chrom Agar حيث ظهرت بالوان مختلفة وكل لون يعتبر صفة تشخيصية لنوع معين من أنواع *Candida spp.* فكانت العزلات (C1 و C3 و C4 و C10) بلون وردي فاتح ، (C2) بلون الأزرق ، (C5) باللون البنفسجي ، (C6 و C8) باللون الأخضر الفاتح ، (C7) باللون الأخضر الغامق ، (C9) باللون الأبيض الكريمي. اذ يشير اللون الأخضر الفاتح الى *C.albicans* ، واللون الأزرق الى *C.tropicalis* ، واللون الكريمي الى *C.Parapsilosihs* ، واللون الوردي الفاتح الى *C.krusei*، واللون البنفسجي الى *C.glabrata* واللون الأخضر الغامق الى *C.dubliniensis* حسب تعليمات الشركة المجهزة للوسط شكل (6). تتفق هذه النتائج مع ماتوصلا اليه[45].

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/



شكل(6)-خمائر *Candida* spp على وسط Chrom Agar

8- اختبار تاثير اختلاف درجات الحرارة على النمو

The effect of temperature differences on growth Test

تشير النتائج الى قدرة العزلات على النمو في مدى واسع من درجات الحرارة حيث أبدت العزلات نمواً ضعيفا عند درجة 23 م° لمدة 48 ساعة ، وأظهرت نموا بدرجة 28 م° ، بينما كان افضل نمو في درجة حرارة 37 م° لمدة 48 ساعة، في حين توقف النمو بدرجة 45 م° [46] باستثناء العزلات (C7 وC8) حيث أظهرت نمواً ضعيفا شكل(7) ،ان لاختلاف درجات الحرارة تاثير على معدل النمو للخميرة فتأثيرها اما مثبط او محفز او قاتل ، ففي الدرجات الحرارة المنخفضة والتي تتراوح (0-10) م ° تبقى انزيمات الخميرة في حالة سكون نسبي فلا يحدث تمثيل غذائي لكن مع ارتفاع درجات الحرارة الى الدرجة المثلى 35-37 م° ، يبدأ نشاط انزيمات التمثيل الغذائي على اشده، ان إرتفاع درجات الحرارة الى ما فوق 44 م° تعمل على تغيير طبيعة السايتوبلازم وما يحتويه من بروتينات وانزيمات ، ترتبط سمة التحمل الحراري ارتباطا وثيقا ببنية غشاء الخلية وتحديدا محتوى الدهون فيها كما قد يخضع لتحكم العديد من الجينات ، وعلى الرغم من تحديد البعض منها الا ان الكشف عنها بالكامل لايزال قيد الدراسة [47]. تتفق هذه النتائج مع ما ذكره [48] في دراسته على خميرة الـ *Candida* وتاثير درجات الحرارة عليها فاظهرت النتائج بان افضل نمو كان عند 37 م° في حين يتوقف النمو عند 45 م° .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 3, 2021 (150-166)
Special Issue for Proceeding of 3rd National (1st international conference of biology) (ICBSUM 2021) 5, 6 July
College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq.

جدول (4).تاثير اختلاف درجات الحرارة على نمو *Candida* spp

العينات	درجة حرارة 23مo	درجة حرارة 28مo	درجة حرارة 37مo	درجة حرارة 45مo
C1	+	+	+	-
C2	+	+	+	-
C3	+	+	+	-
C4	+	+	+	-
C5	+	+	+	-
C6	+	+	+	+
C7	+	+	+	-
C8	+	+	+	+
C9	+	+	+	-
C10	+	+	+	-

+ ظهور نمو   _ عدم ظهور نمو نمو

الاستنتاجات

إمكانية عزل خميرة *Candida* spp من مستشفيات الموصل من المرضى المصابين بداء المبيضات . ان الخميرة قيد الدراسة كانت مقاومة للعديد من المضادات الحيوية وحساسة لمضاد النستاتين . وتباينت في حساسيتها ومقاومتها لاملاح المعادن الثقيلة كما انها كانت غير قادرة على تخمر سكر اللاكتوز بينما لها القدرة على تخمير عدد كبير من السكريات . وان هذه العزلات لها القدرة على النمو في مدى واسع من درجات الحرارة ولها الامكانية على تحلل النشا والجيلاتين وإنتاج انزيم الكتاليز ووالبعض منها تمكنت من إنتاج الانبوت الجرثومي وكانت قادرة أيضا على انتاج السبورات الكلاميدية.

المصادر:

1- J. Z. Bresha **“**The yeast “ Arabic buplishing ,King Saaud university .S A,2012. (in Arabic).

2- K. A. AL-Kafaji and Z. K. AL-Maamory “the most important medical fungi ,Isolation ,identification and treatment” Albasaer bublishing Lebnan Beirut,2013. (in Arabic).

3- C. Kurtzman, W. Fell, T. Boekhout and V. Robert “ Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: The yeasts, a taxonomic study”, 5th edn. Elsevier,Boston, pp 87–110 ,2011.

4- AL-Yasiry, A. M. Dental health of osteopenia diabetes mellitus male patients. Med. J. Babylon, 15(2), 118_123. 2018.

5- A.Al - Hussainy and M. Kadhim “Isolation and identification of dermatophytes fungi from under two year children in diaber location ”,Al-Qadisiyah journal for pure science , Vol 19 No 3 pp 98–109 ,2014.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

6- J. Hannula “Clonal types of oral yeasts in relation to age health and geography”. Academic Dissertation, Instituente of Dentistry Department of Periodontology, University of Helsinki , Finland. PP: 1 -57, 2000.

7- J.A. Cortes, P. Reyes, C. Gomez, G. Buitrago and A.L. Leal “Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia” .Rev Iberoam Micol. ,28:74-8,2011.

8- F.L.Mayer, D. Wilson and B. Hube, “Candida albicans pathogenicity mechanisms Virulence”., 4(2), p.119_128. 2013

9- H.L. Cheah, V. Lim, and D. Sandai “Inhibitors of the glyoxylate cycle enzyme ICL1 in Candida albicans for potential use as antifungal agents”. PloS one, 9(4). 2014.

10- J. A. Barnett “ A history of research on yeasts 12 : medical yeasts part I , Candida albicans Yeast” , 25 : 385-417 , 2008

11- B. J. Kullberg and M. C. Arendrup “Invasive candidiasis’’. N. Engl. J. Med. 373, 1445–1456 ,2015.

12- T. P. McCarty and P. G. Assae “Pappas, Invasive candidiasis”. J. Infect. Dis. Clin. North Am. 30, 103–124 ,2016.

13- L.Kunyeit, A., KA, and R. P. Rao,” Application of Probiotic Yeasts on Candida Species Associated Infection”, Journal of Fungi, 6(4), 189, 2020

14- C. Onyewu, and J. Heitman, “Unique applications of novel antifungal drug combinationns” Anti-Infective Agents in Medical Chemistry , 6,3-15, 2007.

15- E.L. Hazen and R.Brown (1950). Science ,112,423.(Cited by Onyewu and Heitman) , 2007.

16- J. D. Sobel “Genital candidiasis” Medicine, 38(6): 286-290,2010 .

17- S. E. Brown, J. A.Schwartz, C. K. Robinson, D. E. O’Hanlon, L.Bradford and X .He. “The vaginal microbiota and behavioral factors associated with genital Candida albicans detection in reproductive-age women.Sex. Transm”.Dis. 46, 753–758. doi: 2019

18- J. YanoSobel, J. D., Nyirjesy, P., Sobel, R., Williams and V. L., Yu, Q., Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. BMC Womens Health 19:48. doi: 10.1186/s12905-019-0748-8, 2019.

19- A. Shukla, and J. D. Sobel “ Vulvovaginitis caused by Candida species Following antibiotic exposure”Curr. Infect. Dis. Rep. 21:44. doi: 10.1007/s11908-019-0700-y. 2019

20- R. M,Atlas A. E. Brown and L.C.,Parks," Laboratory Manual Experimental Microbiology ."Mosby – Year Book, Inc. 17(3) pp 283-289 (1995).

21- Y. Kourkoutas, S. Dimitropoulou, R.Marchant and I. M. Banat”Whey liquid waste of dairy industry as raw material for fermentation with the thermophilic Klyveromyces marxianusI”MB3. J. Environ. Sci. Tech; 7:226-233,2001.

22- Dar , N. Isolation and Characterization of Heavy Metals Resistant yeast from Industrial Effluents and their Use in Environmental Cleanup . ph. D. Thesis Punjab ,Univ.Lahore .Pakistan ,2004.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

23- Mac Faddin "Biochemical tests for Identification of Medical bacteria Macro – and micronutrient in alkaline soils" Commun Soil Sci. Plant Anal. , Vol. 8 , p. 195-207 , 1980.

24- A. Neama "Biochemical tests used in the identification" College of education for pure sciences ,Diyala University (In Arabic) ,2013.

25- S. Neji, I.Hadrich, H. Trabelsi, S. Abbes, F. Cheikhrouhou, H. Sellami and A. Ayadi"Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis complex isolates recovered from clinical specimens". Journal of biomedical science, 24(1), 1-16 .2017

26- B. E. Forbes, D.F. Sahm and A.S. Weissfeld." Bailey and Scott's Diagnostic microbiology" , 12th ed. Mosby Elsevier.,Texas, USA, 2007.

27- R.S. Gupta, R. Baral, B. Khanal and B. Gupta" Phenotypic Characterization of Clinical Isolates of Candida Species in Eastern Part of Nepal". Res, J.Pharm, Biol. Chem, Sci.,7(2): pp.204-212, 2016.

28- D.R.Hospenthal , M.L.Beckius , K.L. Floyd , L.L. Horvath , and C.K.Murray ,. "Presumptive identification of Candida species other than C.albicans , C.krusei and C.tropicalis with the chromogenic medium CHROMagar candida" 3 (5) . pp:1-10,2006.

29- M. M. Belan Ali, S. M. Abdullah, and K. I. Othman "Isolation and Identification Candida spp from Urine and Antifungal "Susceptibility Test". Ira. J. Sci., 59(4B), 1981-988,2018.

30- H. Abdulla, and E.A.Mustafa," Rapid Detection of Candida species Isolated from Denture Stomatitis Patients using Phenotypic methods and Chromogenic agar media" Al-Raf, Dent J.20(1), pp 125_133, 2020.

31- T.Wibawa, and A.T. Aman" Virulence of Candida albicans isolated from HIV infected and non infected individuals" SpringerPlus, 4(1), p.408,2015.

32- Y. Kourkoutas, S. Dimitropoulou, R.Marchant and I. M. Banat"Whey liquid waste of dairy industry as raw material for fermentation with the thermophilic Klyveromyces marxianusI"MB3. J. Environ. Sci. Tech; 7:226-233,2000.

33- S. A,Marinho, , A. B.,Teixeira, , O. S. Santos,R.F., Cazanova ,C.A.S,Ferreira., , K., & Oliveira , , S. D. D. , Cherubini. "Identification of Candida spp. by phenotypic tests and PCR. Brazilian Journal of Microbiology", 41(2), 286-294,2010.

34- S. Giri, and M. J. Kindo. "Evaluation of five phenotypic tests in the identification of candida species" Nat J Lab Med, 4, 13-18,2015.

35- G. N.B. Brito , A. C . Inocêncio S. M. R. Querido , A. O. C. Jorge and C. Y. Koga Ito " In vitro antifungal susceptibility of Candida spp . oral isolates from HIV - positive patients and control individuals" . Braz . Oral Res . , 25 (1) : 28-33 . 2010.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

36- F . Amran; M. N. Aziz , H. M . Ibrahim , N. H. Atiqah , S. Parameswari , M. R. Hafiza and M. Ifwat .” In vitro antifungal susceptibilities of Candida isolates from patients with invasive candidiasis in Kuala Lumpur Hospital” , Malaysia . J. Med . Microbiol . , 60 : 1312 - 1316 , 2011.

37- T. C. White , S . Holleman , L. F. Mirels and D. A. Stevens , “Resistance mechanisms in clinical isolates of Candida albicans “. Antimicrob ,Agents Chemother . , 46 (6) 1704-1713 , 2002.

38- M. M., Kukde Basak, S., & , D. S. SeloKar, Effect of Heavy Metal Ions on Candida Isolated from HIV Positive Patients. Journal of Clinical & Diagnostic Research, 13(4),2019.

39- A. R. S. A., Al-Khafaji Gel electrophoresis. College of Science for girls, Babylon University Master thesis (In Arabic) (2016).

40- S. K. R.Oliveira, D. C. V.dos Anjos, , L. H. B. Gonçalves, T. A. F. Ferro, S. G. Monteiro, P. D. M. S. Figueiredo, and C. de Andrade Monteiro,” PREVALÊNCIA E PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR ISOLADOS DE Candida PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE SECREÇÃO VAGINAL, Revista de Patologia Tropical”/Journal of Tropical Pathology, 42(2). 2013.

41- A. Aruna, M. Nagavalli, V. Girijashankar, S. P. D., Ponamgi, V. Swathisree and L. Venkateswar Rao, “Direct bioethanol production by amylolytic yeast C andida albicans”, Letters in applied microbiology, 60(3), 229-236, 2015.

42- S. Neji, I.Hadrich, H. Trabelsi, S. Abbes, F. Cheikhrouhou, H. Sellami and A. Ayadi”Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among Candida parapsilosis complex isolates recovered from clinical specimens”. Journal of biomedical science, 24(1), 1-16,2017.

43- T. Matare, P. Nziramasanga, L. Gwanzura and V. Robertson, “ Experimental germ tube induction in Candida albicans: An evaluation of the effect of sodium bicarbonate on morphogenesis and comparison with pooled human serum”. BioMed Res. Inter, 2017.

44- B. Böttcher, C. Pöllath, P. Staib, B. Hube and S. Brunke “Candida species rewired hyphae developmental programs for chlamydospore formation”. Fro. Microbiolo.,7 ,17, 2016.

45- N. M. S. Abdulkhaleq”Prevalence of staphylococcus species and candida species in pregnant and nonpregnant women in genital tract with detection of norA and sdrM genes”,University of Diyala,Collage of Science, 2020.

46-C. Pataro, A. Santos, S. R.Correa, P. B. Morais; V. R. Linardi and C.A . Rosa”Rev. Microbiol”.,29: 104-108,1998 .

47- S. G. Nadeem, A. Shafiq, S. T. Hakim, Y. Anjum, and S. U. Kazm ” Effect of growth media, pH and temperature on yeast to hyphal transition in Candida albicans.open journal of medical microbiology ,vol.3,no.3, 2013 .

48- F. C. Odds, “ Effects of temperature on anti-Candida activities of antifungal antibiotics ”. Antimicrobial agents and chemotherapy, 37(4), 685-691 (1993).

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/