



جامعة كربلاء

دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات الميريمية *Salvia officinalis L.* والمركب النانوي له ضد بعض أنواع المبيضات لدى الأطفال في محافظة كربلاء

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة في علوم الحياة / فطريات .

كتبت بوساطة

ميساء تقي عبد الحسن الخزعلي

بإشراف

أ.م.د.سلام أحمد عبد إبراهيم

أ.م.د.بان موسى حسن

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا
إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة «البقرة» الآية (32)

الاهداء

الى :

الكهنة الحسين ونخيل المخطر المستكين وملاذ المؤمنين....بقية الله في أرضه الامام
المنتظر المهدي (عجل الله تعالى فرجه الشريف).

الى :

من تمرنتني بحنانها وساندتني طوال حياتي ونورت لي طريقتي بدعائها وزرعت في نفسي
بذور الصبر والحزم..... أمي الحبيبة

الى :

من علمني أن الدنيا كفاح وسلاحها العلم والمعرفة...وحبب الي قول الحق أبي الحبيب

الى :

سندي في الحياة ورفيق دربي....الى من سار معي الي طلب العلم خطوة بخطوة....
زوجي الحبيب

الى :

هالة الحنان محبة الفهم التي تنهل بالدعاء لي خالتي الحبيبة (أمي الثانية)

الى :

من كان ولازال غيابه حافزا لي في كل وقت وحين لطلب العلم.....عمي الحبيب

الى:

من أشدد بهم أربي أخوتي وأخواتي

الى :

روحي وفلذات عبي وأخلي ماوسيني الله أولادي

الشكر والتقدير

الحمد لله الذي وسع كل شيء فضله ورحمته والصلاة والسلام على خير الانام نبينا محمد وأهل بيته الاطهار . احمد الله واشكره على عظيم نعمه وتوفيقه لي في اكمال دراستي هذه ويطيب لي أن اتقدم بشكري وتقديري الى كل من مد يد العون في تنفيذ عملي هذا ولاسيما استاذاي المشرفان أ.م. د بان موسى حسن وأ.م.د.سلام أحمد لاهتمامهما وتوجيهاتهما السديدة متمنيا لهما التوفيق والنجاح .

كما أتقدم بجزيل الشكر والعرفان الى أ.د.وفاء صادق الوزني و أ.د.علي عبد الكاظم الغانمي و أ.م.د. كوكب عبد الله السعدي من قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة كربلاء لما قدموه من نصيحة ومساندة ومساعدته طيلة فترة الدراسة فجزاهم الله عني خير الجزاء ومتعمهم بالصحة والعافية وجعلها في ميزان حسناتهم .

عرفانا بالجميل أتقدم بالشكر والثناء إلى رئاسة قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء متمثلة ب أ.د.نصير مرزة حمزة لتوفير بعض متطلبات الدراسة دعائي لاستاذي الفاضل بدوام الموفقية والسداد.ولا يسعني إلا أن اقدم شكري وتقديري الى أخواتي وزميلاتي في قسم علوم الحياة/كلية العلوم متمثلة ب أ.م.د.أبتسام عباس ناصر وأ.م.د.ساجدة فليح وم.د.خنساء عبد العالي شهيد وم.اسيل كريم جبار وم.سارة كاظم أبراهيم وم.سحر عبد الرضا جابرو.م.رغد سعد وم.ضمياء أبراهيم علوان لما قدموه من مساندة ودعم معنوي طيلة فتره الدراسة .

كما أود أن أشكر الاساتذه الافاضل أ.د.زيد حسن عبود أ.د. هيثم دلول و أ.م.د.ثامر مهدي مدلول و أ.م.د.احسان مهدي شهيد من قسم الكيمياء /كلية العلوم /جامعة كربلاء لمساعدتهم لي في تفسير بعض إختبارات الدراسة .

اتقدم بالشكر الجزيل الى الدكتور بسام محمد علي من المركز التخصصي لطب الاسنان والعاملين معه والدكتور محمد عبد الرسول والعاملين معه في مستشفى الأطفال التعليمي, في محافظة كربلاء لمساعدتهم لي في تشخيص الحالات المرضية وجمع العينات منها.

لايفوتني أن أشكر زميلات الدراسة هيفاء خطاف وآمال سالم ونضال وهاب و منى جابر نعمه ونبأ محمد عبيس لمساندتهم لي طيلة فترة الدراسة , وأخيرا أشكر كل من قدم يد العون لي لاكمال مشواري العلمي وفاتني ذكر اسمه دعائي لهم بالموفقية والنجاح .

إقرار المشرفين

تشهد ان اعداد هذه الاطروحة الموسومة (دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات الميريمية *Salvia officinalis* L. والمركب النانوي له ضد بعض أنواع المبيضات لدى الأطفال في محافظة كربلاء) قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة /الفطريات.



التوقيع

الاسم : سلام أحمد عبد إبراهيم

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء .

العنوان : كلية الصيدلة /جامعة كربلاء

التاريخ: / /



التوقيع

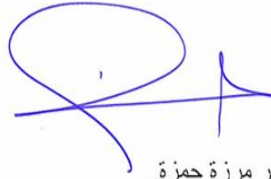
الاسم : بان موسى حسن

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

التاريخ: / /

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الأستاذين المشرفين، أحيل هذه الاطروحة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها.



التوقيع:

الاسم: نصير مرزة حمزة.

المرتبة العلمية: أستاذ .

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء

التاريخ: / /

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الأطروحة الموسومة (دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات الميريمية *Salvia officinalis* L. والمركب النانوي له ضد بعض أنواع المبيضات لدى الأطفال في محافظة كربلاء) تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ماورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الامر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .



التوقيع :

الاسم : ميثم رشيد حميد

المرتبة العلمية : مدرس

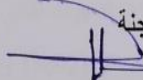
العنوان : جامعة كربلاء/كلية العلوم الإسلامية

التاريخ : / /


إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعين أدناه نشهد بأننا قد اطلعنا على الأطروحة الموسومة (دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات الميرمية *Salvia officinalis* L. والمركب النانوي له ضد بعض أنواع المبيضات لدى الأطفال في محافظة كربلاء) المقدمة من قبل الطالبة ميساء تقي عبد الحسن كجزء من متطلبات نيل شهادة الدكتوراه في علوم الحياة / فطريات ، وبعد اجراء المناقشة العلمية وجد أنها مستوفية لمتطلبات الشهادة و عليه نوصي بقبول الأطروحة بتقدير (امتياز) .

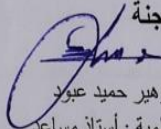
رئيس اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. ماجد كاظم عبود
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية التربية / جامعة القادسية
التاريخ: //

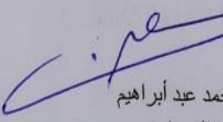
عضو اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. عدنان عبد الجليل الهوف
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء
التاريخ: //

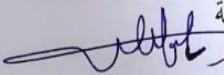
عضو اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. زهير حميد عبود
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية العلوم / جامعة كربلاء
التاريخ: //


عضواً ومشرفاً

التوقيع: 
الاسم: د. سلام أحمد عبد إبراهيم
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية الصيدلة / جامعة كربلاء
التاريخ: //


عضو اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. ياسر ناصر حسين
المرتبة العلمية: أستاذ
العنوان: كلية الزراعة / جامعة كربلاء
التاريخ: //

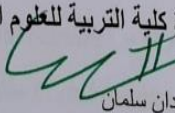
عضو اللجنة

التوقيع: 
الاسم: د. نيبال امطير طراد
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
التاريخ: //

عضواً ومشرفاً

التوقيع: 
الاسم: د. بيان موسى حسن
المرتبة العلمية: أستاذ مساعد
العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء
التاريخ: //

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

التوقيع: 
الاسم: د. حميدة عيدان سلمان
المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: 2023 / 11 / 16

الخلاصة :

تضمنت الدراسة الحالية تشخيص أنواع المبيضات الحساسة والمقاومة للمضادات المسببة لداء المبيضات الفموي لدى الاطفال وتحضير مستخلص نباتي نانوي باستعمال أوراق نبات الميريمية وفصل وتنقية المكونات الفعالة في أوراق النبات واختبار فعاليتها التثبيطية ضد أنواع المبيضات المعزولة , وأوضحت النتائج ما يأتي :

تم الحصول على 83 عينة جمعت من أطفال شخصت سريريا اصابتهم بداء المبيضات الفموي للمدة من 2 / 1 / 2021 ولغاية 2 / 5 / 2021 , وظهرت نتائج العزل والتشخيص وجود نمو في 63 عينة (76%) , 58 عينة منها تعود للخمائر (92%) وتبين ان غالبيتها تنتمي الى جنس المبيضات *Candida* اذ بلغت نسبتها 93.1% (54 عينة) في حين سجلت خمائر أخرى من غير المبيضات نسبة بلغت 6.9% (4 عينات), وكانت السيادة للمبيضات البيضاء *Candida albicans* اذ عزلت بنسبه 53.7% وتليها *C.dubliniensis* بنسبة 18.5%, ثم *C.lusitaniae* في المرتبة الثالثة بنسبة 12.9% وتلاه النوع *C.tropicalis* بنسبة 7.4% و *C.parapsilosis* بنسبة 5.6% و *C.kefyr* بنسبة 1.9% و تم تأكيد تشخيص الأنواع المعزولة باستخدام جهاز الفايترك بوساطة بطاقة التشخيص Vitek 2 YST .

شخصت الانواع المعزولة أيضا جزيئيا باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل بوجود البادئات NS1 و NS8 التي نجحت في مضاعفة المنطقة SrRNA 18, وبناتج تضاعف تراوحت أحجامه بين 1624bp- 1656 وتم ايداعها في قاعدة البيانات Genbank التابعة للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية NCBI وحدد لكل عزلة وعلى التوالي رمز تسلسلي: MZ574137.1, MZ574410.1, MZ376949.1, MZ376951.1, MZ572966.1, MZ574180.1 .

فحصت حساسية الأنواع المعزولة تجاه ستة أنواع من المضادات الفطرية وهي Fluconazole و Voriconazole , Caspofungin , Amphotericin B, Micafungin و Flucytosine , بوساطة جهاز الفايترك وتم تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى لكل نوع وتبين أن جميع العزلات كانت حساسة تجاه جميع المضادات المدروسة عدا الامفوتيريسين والفلوسايتوسين , إذ أظهرت عزلتين من *C.albicans* وعزلة من *C.lusitaniae* مقاومتها تجاه الامفوتيريسين في حين أظهرت عزلة واحدة من النوع *C.dublinsiensis* مقاومتها تجاه الفلوسايتوسين .

حضر مستخلص مائي وكحولي خام لاوراق نبات الميريمية لغرض التعرف على الفعالية التضادية تجاه الأنواع المعزولة وتبين أن كلاهما يحتوي على الصابونينات والتانينات والكاربوهيدرات والكلايكوسيدات والراتنجات والفلافونويدات , على حين وجد أن المستخلص الكحولي يحتوي قلويدات وفينولات مقارنة بالمستخلص المائي. واثبتت الدراسة أن المستخلص الكحولي بجميع التراكيز المختبرة وهي 10 و 25 و 50 و 75 و 100 ملغم /مل أظهر فعالية في تثبيط كافة الأنواع المعزولة الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين مقارنة بالمستخلص المائي الذي أظهر فعالية تجاه جميع الأنواع عند التركيز 100 ملغم /مل . وعند مقارنة تأثير المستخلص الكحولي مع تأثير المضاد الفطري الامفوتيريسين وبنفس التركيز, تبين أن فعالية المستخلص الخام كانت أقل من فعالية مضاد الامفوتيريسين وان الأنواع الحساسة *C.lusitaniae* و *C.tropicalis* و *C.parapsilosis* و *C.kefyr* هي الأكثر تأثرا بالمستخلص والمضاد. وبينت الدراسة أيضا أن أقل تركيز مثبط (MIC) للمستخلص الكحولي تجاه الأنواع الحساسة في أعلاه بلغت قيمته 12.5 مايكروغرام /مل لكل منها, في حين بلغت قيمة التركيز القاتل الأدنى 25 مايكروغرام/مل, وفيما يخص الأنواع المقاومة للامفوتيريسين بلغت قيمة التركيز المثبط الأدنى 200 و 50 مايكروغرام /مل لكل من *C.albicans* و *C.lucitaniae* على التوالي , فيما بلغت قيم التركيز القاتل 400 مايكروغرام /مل, 100 مايكروغرام /مل وعلى التوالي للأنواع آنفة الذكر.

أجريت للمستخلص الكحولي عملية تجزئة باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل تحت الضغط المخلخل (VLC) وتبين وجود أكثر عدد للمركبات في جزء كلوروفورم : أثيل أسيتيت , كما أن هذا الجزء أظهر فعالية عالية في تثبيط الأنواع الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين مقارنة ببقية الأجزاء إذ بلغت معدلات أقطار التثبيط الأنواع الحساسة 14, 16, 19, 21, 20, 21 ملم لكل من *C.dublinensis*, *C.albicans*, *C.lusitaniae*, *C.tropicalis*, *C.kefyr*, *C.parapsilosis* على التوالي و 14, 19 ملم للأنواع *C.albicans*, *C.lusitaniae* المقاومة للامفوتيريسين .

فصلت ونقيت 18 مركبا فعالا باستخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC) عند الطول الموجي 273 نانوميتر , وباستخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحليلية تم تشخيص ثلاثة مركبات فعالة هي Caffeic acid و Ferulic acid و Kaempferol وأن جميع هذه المركبات أظهرت فعالية تثبيطية تجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين .

كما تم خلال الدراسة تحضير مستخلص نانوي هجين من مستخلص الميريمية الكحولي بعد تحميله على أكسيد الزنك وقد أكد ذلك نتائج الفحص بمطيافية الأشعة تحت الحمراء (FTIR) حصول أنزياح في ترددات بعض المجاميع الكيميائية نحو ترددات عالية وأخرى واطئة، كما كشفت مطيافية الأشعة السينية (XRD) عن ظهور مستويات جديدة في طيف المركب النانوي الهجين مقارنة بطيف الحامل أو أكسيد الزنك مما يشير إلى أن المركب قيد الدراسة نانوي. واتضح من نتائج الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM) أن معدل أبعاد أقطار دقائق المركب النانوي الهجين بلغت 62.32 نانومتر أما الفحص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (SEM) فقد كشفت عن ظهور أشكال هندسية منتظمة وعن تكون تراكيب ذات مسامية عالية، وبينت نتائج التحليل بمطيافية الـEDS وجود عناصر الزنك والأكسجين والكربون، مما يدل على نجاح إقحام مركبات المستخلص النباتي بين طبقات أكسيد الزنك ومن ثم تكوين مركب نانوي هجين جديد. وقد أظهر هذا المركب النانوي الهجين فعالية تثبيطية أعلى من فعالية المستخلص الخام وقريبه من فعالية المضاد الحيوي الامفوتيرييسين، وكانت الأنواع الحساسة للمضاد أكثر تحسنا للمستخلص النانوي إذ بلغ معدل التثبيط بطريقة الحفر 18.33, 21.67, 21, 20, 22, 16 ملم وأقل معدل للتركيز المثبط الأدنى بلغ 3.125 مايكروغرام/مل وأقل معدل للتركيز القاتل الأدنى بلغ 6.25 مايكروغرام/مل مقارنة بتحسس الأنواع المقاومة.

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان	التسلسل
1	المقدمة Introduction	1
4	استعراض المراجع	2
4	داء المبيضات الفموي Oral Candidiasis	1-2
5	داء المبيضات الفموي الاولي Primary oral candidiasis	1.1.2
5	داء المبيضات الغشائي الكاذب (السلاق) (Trush) (Pseudomembranous candidiasis)	1.1.1.2
5	داء المبيضات الحمامي Erythematous candidiasis	2.1.1.2
5	داء المبيضات المفرط التنسج Hyperplastic candidosis	3.1.1.2
6	التهاب زوايا الفم . Angular cheilitis	4.1.1.2
6	داء المبيضات الفموي الثانوي Secondary Oral Candidosis	2.1.2
6	العوامل المهيئة للإصابة بداء المبيضات الفموي Predisposing factors	2.2
8	جنس المبيضات <i>Candida</i> Genus	3.2
9	تصنيف المبيضات Classification of <i>Candida</i>	4.2
10	عوامل أمراضية المبيضات Pathogenicity Factors of <i>Candida</i>	4.2
10	الالتصاق Adherence	1.4.2
10	إنتاج الانزيمات الحالة Hydrolytic Enzymes Production	2.4.2
11	التحول المظهري Phenotypic switching	3.4.2
11	إنتاج الاغشية الحيوية Production Biofilms	4.4.2
12	انتاج السموم Toxin production	5.4.2
13	المضادات الفطرية Antifungals	5.2
13	المضادات التي تستهدف الايركوسيتيرول وتكوينه الحيوي .	1.5.2
13	الازولات Azoles.	1.1.5.2
14	البولينات Polyenes	2.1.5.2
14	المضادات التي تثبط تكوين الجدار الخلوي	2.5.2
14	المضادات التي تثبط تكوين الحوامض النووية	3.5.2
14	آلية مقاومة المضادات الفطرية	6.2
16	أستخدام النباتات الطبية في علاج امراض الفم .	7.2
17	نبات الميريمية <i>Salvia officinalis</i>	1.7.2
19	المركبات الفعالة في نبات الميريمية Bioactive compound in <i>Salvia officinalis</i>	2.7.2
19	الزيوت الأساسية Essential oil	1.2.7.2
19	المركبات الفينولية Phenolic compounds	2.2.7.2
20	التقنية النانوية Nanotechnology	8.2
20	المواد النانوية Nanomaterials	1.8.2
21	المركبات النانوية Nanocomposites	2.8.2
23	الحوامل النانوية Nanocarries	3.8.2

24	تشخيص المواد النانوية	4.8.2
24	Microscopy Techniques التقنيات المجهرية	1.4.8.2
25	Spectroscopy Techniques التقنيات الطيفية	2.4.8.2
25	Zeta Potential Measurements قياسات جهد زيتا	3.4.8.2
26	المواد وطرائق العمل	.3
26	الأجهزة والمواد	1.3
26	Equipments and Instruments الأجهزة والمعدات المستعملة	1.1.3
28	المواد الكيميائية والاحيائية Chemical & Biological materials	2.1.3
29	Culture media الأوساط الزرعية	3.1.3
30	العدد المستعملة في تشخيص أنواع المبيضات المعزولة	4.1.3
31	المواد المستعملة في تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR	5.1.3
31	طرائق العمل	2.3
31	تحضير المحاليل والكواشف	1.2.3
31	المحلول الملحي الفسلجي 0.85%	1.1.2.3
31	Amoxicillin solution محلول مضاد الاموكسيلين	2.1.2.3
31	Wagner reagent كاشف واكنر	3.1.2.3
31	Ferric Chloride reagent كاشف كلوريد الحديدك	4.1.2.3
32	Phenol and reagent كاشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز (Sulfuric acid).	5.1.2.3
32	Bendict reagent كاشف بندكت	6.1.2.3
32	Vanillin reagent كاشف الفانيلين	7.1.2.3
32	Preparation of culture media تحضير الاوساط الزرعية	2.2.3
32	وسط اكار السابرويد دكستروز مع الاموكسيلين Sabouraud Dextrose Agar with Amoxicillin	1.2.2.3
33	Sabouraud Broth Medium وسط السابرويد السائل	2.2.2.3
33	Corn meal agar with 80 Tween وسط اكار طحين الذرة مع توين 80	3.2.2.3
33	HiCrome™ Candida Differential Agar وسط	4.2.2.3
33	Pathogenic samples collection جمع العينات المرضية	3.2.3
34	الزراعة والعزل	1.3.2.3
34	التشخيص	2.3.2.3
34	الفحص المظهري للمستعمرات Colony morphology examination	1.2.3.2.3
34	microscopic examination الفحص المجهرى	2.2.3.2.3
34	التشخيص بوساطة الاختبارات الكيميائية الحياتية والفسلجية Physiological and biochemical tests	3.2.3.2.3
36	التشخيص الجزيئي لعزلات المبيضات	4.2.3.2.3
39	فحص حساسية العزلات تجاه المضادات الحياتية	3.3.2.3

39	Preservation Of <i>Candida</i> Isolates حفظ عزلات المبيضات	4.3.2.3
40	جمع وتشخيص وتحضير عينات نبات الميريمية	4.2.3
40	جمع عينات النبات	1.4.2.3
41	تحضير مستخلص نبات الميريمية	2.4.2.3
41	الكشف النوعي عن مجاميع المركبات الكيميائية الفعالة في أوراق نبات الميريمية	3.4.2.3
43	اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي المحضرة ضد أنواع المبيضات المعزولة	4.4.2.3
44	تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل للفطريات الأدنى MFC للمستخلص الكحولي	5.4.2.3
45	تجزئة المركبات الفعالة وفصلها وتشخيصها في المستخلص الكحولي والمائي لأوراق نبات الميريمية	6.4.2.3
48	تحليل بالمركبات الفعالة وتنقيتها وتشخيصها في مستخلص نبات الميريمية باستخدام تقنية السائل عاليه الأداء التحضيرية (Prep.HPLC)	7.4.2.3
50	اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات النقية ضد أنواع المبيضات المعزولة	1.7.4.2.3
50	تحضير المستخلص النباتي النانوي الهجين من المستخلص الكحولي الخام لنبات الميريمية	5.2.3
51	تشخيص المستخلص النباتي النانوي الهجين	1.5.2.3
52	اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي الهجين المحضر ضد أنواع المبيضات المعزولة	2.5.2.3
52	تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل للفطريات الأدنى MFC للمستخلص النانوي الهجين المحضر من أوراق نبات الميريمية	3.5.2.3
52	التحليل الاحصائي	3.3
53	النتائج والمناقشة Results and Discussion	.4
53	عزل وتشخيص أنواع المبيضات	1.4
54	التشخيص المظهري والمجهري والفسلجي لأنواع المبيضات المعزولة	1.1.4
58	تشخيص عزلات المبيضات باستخدام جهاز الفايترك	2.1.4
58	التشخيص الجزيئي لأنواع المبيضات المعزولة	3.1.4
72	فحص حساسية عزلات المبيضات المعزولة تجاه المضادات الحيوية باستخدام جهاز الفايترك	4.1.4
75	المستخلص النباتي لأوراق نبات الميريمية	2.4
75	الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة لمستخلص أوراق نبات الميريمية الخام	1.2.4
76	اختبار فعالية المستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المعزولة	2.2.4
84	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام من أوراق نبات الميريمية ضد	3.2.4

	أنواع المبيضات المعزولة	
87	تجزئة المستخلص الكحولي النباتي الخام	4.2.4
87	تجزئة المستخلص الكحولي النباتي الخام بأستخدام تقنية الـ VLC	1.4.2.4
92	تحديد الفعالية التثبيطية لأجزاء المستخلص الكحولي الخام تجاه أنواع المبيضات المعزولة	2.4.2.4
97	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) لأجزاء المستخلص الكحولي الخام ضد أنواع المبيضات المعزولة	3.4.2.4
100	تحليل بعض المركبات الفعالة و تنقيتها وتشخيصها في مستخلص نبات الميريمية بأستخدام تقنية السائل عاليه الاداء (HPLC).	4.4.2.4
106	اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاة من مستخلص كلوروفورم :أثيل اسيتيت لاوراق نبات الميريمية تجاه أنواع المبيضات المعزولة	5.4.2.4
108	تحضير المستخلص النباتي النانوي الهجين بأستخدام المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية .	3.4
108	تشخيص المستخلص النباتي النانوي المحضر بأستخدام الطرائق الطيفية.	1.3.4
108	التشخيص بأستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (FT-IR)	1.1.3.4
110	الفحص بأستخدام طيف حيود الاشعة السينية (XRD)	2.1.3.4
114	الفحص بأستخدام المجهر الالكتروني الماسح	3.1.3.4
115	التشخيص بأستخدام مجهر القوة الذرية AFM	4.1.3.4
115	التشخيص بأستخدام مطيافية التشتت Energy Dispersive Spectroscopy(EDS)	5.1.3.4
116	الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي النباتي الهجين ضد أنواع المبيضات المعزولة	2.3.4
119	تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص النباتي النانوي الهجين ضد أنواع المبيضات المعزولة	3.3.4
122	الاستنتاجات والتوصيات	
122	الاستنتاجات	
123	التوصيات	
124	المصادر	
129	المصادر العربية	
128	المصادر الأجنبية	
1148	الملاحق	

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	الصفحة
-----------	---------	--------

18	A- شجيرة نبات الميريمية <i>Salvia officinalis</i> , B – أوراق نبات الميريمية <i>Salvia officinalis</i>	1-2
47	تقنية الكروموتوكرافيا تحت الضغط المخلخل (VLC)	1-3
57	مظهر مستعمرات الكانديدا النامية على وسط HiCrome TM 1: <i>C. albicans</i> , 2: <i>C. Candida Differential Agar</i> 4: <i>C.lusitaniae</i> , 5: <i>C. dubliniesis</i> , 3: <i>C.tropicalis</i> , <i>parapsilosis</i> , 6: <i>C. kefyfyr</i>	1-4
59	نتاج تفاعل البلمرة المتسلسل لأنواع المبيضات المعزولة. DNA ladder= 2000 bp ,1= <i>Clavispora lusitaniae</i> . 2= <i>C.albicans</i> ,3= <i>Candida parapsilosis</i> , 4= <i>Kluyveromyces marxianus</i> ,5= <i>Candida tropicalis</i> , 6= <i>C.dublinskiensis</i> , 7,8 = no addition.	2-4
62	الشجرة الوراثية للفطر <i>Candida albicans</i> (محددة بمثلث بنفسجي) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية	3-4
63	الشجرة الوراثية للفطر <i>Candida dubliniensis</i> (محددة بمثلث احمر) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية .	4-4
65	الشجرة الوراثية للفطر <i>Clavispora lusitaniae</i> (محددة بمثلث احمر) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية .	5-4
67	الشجرة الوراثية للفطر <i>Candida tropicalis</i> (محددة بمثلث بنفسجي) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية	6-4
69	الشجرة الوراثية للفطر <i>C.parapsilosis</i> (محددة بمثلث اخضر) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية	7-4
71	الشجرة الوراثية للفطر <i>K. marxianus</i> (محددة بشكل مثلث سمائي) تبيين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية	8-4
81	A-الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي الخام لأوراق نبات الميريمية بتركيز 10 ملغم /مل ضد أنواع المبيضات A- الحساسة للامفوتيريسين , <i>a=C.albicans</i> , <i>b=C.albicans</i> , <i>c=C.lusitaniae</i> , <i>C.dubliniesis</i> , <i>d=C.tropicalis</i> , <i>e=C.tropicalis</i> , <i>f=C.kefyfyr</i> , <i>C.parapsilosis</i> B – المقاومة للامفوتيريسين ومقارنتها مع فعالية الامفوتيريسين <i>bb=C.lucitaniae</i> , <i>aa=C.albicans</i>	9-4
83	تأثير تراكيز المستخلص المائي والكحولي الخام ضد أنواع المبيضات الحساسة لمضاد الامفوتيريسين . <i>a=C.albicans</i> , <i>b=C.albicans</i> , <i>c=C.lusitaniae</i> , <i>C.dubliniesis</i> , <i>d=C.tropicalis</i> , <i>e=C.tropicalis</i> , <i>f=C.kefyfyr</i> , <i>C.parapsilosos</i>	10-4
84	تأثير تراكيز المستخلص المائي والكحولي الخام على أنواع المبيضات المقاومة لمضاد الامفوتيريسين . <i>aa=C.albicans</i> , <i>bb=C.lusitaniae</i>	11-4
89	أجزاء المستخلص الكحولي الخام الناتجة من تقنية VLC . 1:هكسان , 2: الهكسان :كلوروفورم , 3: كلوروفورم , 4: كلوروفورم : أثيل أسيتيت , 5: أثيل أسيتيت , 6: ايثانول , 7:	12-4

	ميثانول	
91	كروماتوغرام تقنية الطبقة الرقيقة (TLC) لاجزاء المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميريمية باستخدام نظام الفصل كلوروفورم -أثيل أسيتيت (20-80 %) . 1. : الهكسان , 2: هكسان: كلوروفورم , 3: كلوروفورم , 4 : كلوروفورم : أثيل أسيتيت , 5 : أثيل أسيتيت , 6 : أيثانول , 7 : ميثانول	13-4
95	الفعالية التثبيطية لاجزاء المستخلص النباتي الخام ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين . a: <i>C.albicans</i> , b: <i>C.tropicalis</i> , c: <i>C.lusitaniae</i> , <i>C.dubliniesis</i> , d: <i>C.kefyr</i> , <i>C.parapsilosos</i> : 1: الهكسان , 2: هكسان - كلوروفورم , 3: كلوروفورم , 4 : كلوروفورم - أثيل أسيتيت , 5 : أثيل أسيتيت , 6 : أيثانول , 7 : ميثانول	14-4
96	الفعالية التثبيطية لاجزاء المستخلص النباتي الخام ضد سلالات الأنواع المقاومة للامفوتيريسين . aa: <i>C.albicans</i> , bb: <i>C.lusitaniae</i> : 1: الهكسان , 2: هكسان - كلوروفورم , 3: كلوروفورم , 4 : كلوروفورم - أثيل أسيتيت , 5 : أثيل أسيتيت , 6 : أيثانول , 7 : ميثانول .	15-4
101	كروماتوغرام تحليل مستخلص كلوروفورم - أثيل أسيتيت لمستخلص الميريمية الكحولي باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC) عند الطول الموجي 273 نانوميتر .	16-4
102	طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمركب Caffeic acid	17-4
102	كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Caffeic acid	18-4
103	منحنى المعايرة القياسي للمركب Caffeic acid	19-4
103	طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمركب Ferulic acid	20-4
104	كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Ferulic acid	21-4
104	منحنى المعايرة القياسي للمركب Ferulic acid	22-4
105	طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمركب Kaempferol	23-4
105	كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Kaempferol	24-4
106	منحنى المعايرة القياسي للمركب Kaempferol	25-4
108	الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاه من مستخلص كلوروفورم : أثيل اسيتيت لاوراق نبات الميريمية ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين . a: <i>C.albicans</i> , b: <i>C.dubliniesis</i> , c: <i>C.lusitaniae</i> , d: <i>C.tropicalis</i> , e: <i>C.parapsilosos</i> , f: <i>C.kefyr</i> Kaempferol =8 , Ferulic acid =5 , Caffeic acid =1	26-4
109	طيف الأشعة تحت الحمراء لأكسيد الزنك النانوي	27-4
110	طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص النباتي النانوي الهجين	28-4
111	طيف حيود الأشعة السينية لطبقات أكسيد الزنك النانوي.	29-4
111	طيف حيود الأشعة السينية للمستخلص النانوي النباتي الهجين	30-4
112	صورة أكسيد الزنك النانوي تحت المجهر الإلكتروني الماسح	31-4
113	صورة للمستخلص النباتي النانوي باستخدام المجهر الإلكتروني	32-4

	الماسح	
114	صورة أو أكسيد الزنك النانوي تحت مجهر القوة الذرية (a) صورة ثلاثية الأبعاد (b) صورة ثنائية الأبعاد. (c) مخطط يوضح أقطار دقائق أكسيد الزنك النانوية.	33-4
115	صورة المستخلص النباتي النانوي الهجين تحت مجهر القوة الذرية (a) صورة ثلاثية الأبعاد (b) صورة ثنائية الأبعاد. (c) مخطط يوضح أقطار دقائق المستخلص النباتي النانوي الهجين.	34-4
116	طيف تحليل مطيافية التشتت للمستخلص النباتي النانوي الهجين	35-4
118	الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين . $a=C.albicans$, $b=C.lusitaniae$, $c=C.dubliniensis$, $d=C.tropicalis$, $e=C.kefyr$, $f=C.parapsilosos$	36-4
119	الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر ضد سلالات الأنواع المقاومة للامفوتيريسين . $aa=C.albicans$, $bb=C.lusitaniae$	37-4

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	رقم الجدول
7	العوامل المهيئة للإصابة بداء المبيضات الفموي وأسباب حدوثها	1-2
9	أنواع المبيضات الأكثر شيوعا في الحالات السريرية وبيئاتها	2-2
15	أليات مقاومة الفطريات للمضادات الحيوية	3-2
24	بعض أنظمة توصيل المركبات النباتية الفعالة أو العلاجات المصنعة ذات الفعالية المضادة للفطريات	4-2
26	الأجهزة والمعدات المستعملة	1-3
28	المواد الكيميائية والاحيائية المستعملة	2-3
29	الأوساط الزرع الجاهزة	3-3
30	العدد المستخدمة في تشخيص أنواع المبيضات	4-3
30	المواد الموجودة في عدة استخلاص DNA	5-3
30	البوادىء المستخدمه في تفاعل البلمرة المتسلسل	6-3
31	مكونات عدة Ready To Go PCR Beads	7-3
38	ظروف تفاعل PCR	8-3
46	أنظمة الفصل المستخدمة في تجزئة المستخلص الكحولي الخام للنبات	9-3
47	أنظمة الفصل المستخدمة في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	10-3
48	ظروف الفصل باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC) المستخدمة لتنقية المركبات الفعالة في النبات قيد الدراسة	11-3
48	برنامج الفصل المتدرج باستخدام جهاز Prep.HPLC	12-3

49	ظروف التحليل باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحليلية (HPLC)	13-3
50	برنامج الفصل المتدرج لعملية التحليل باستخدام HPLC	14-3
53	نتائج الفحص الزرع للحالات المشمولة بالدراسة	1-4
54	توزيع لحياء المجهرية المعزولة من حالات داء المبيضات الفموي حسب نوع المسبب	2-4
55	اجناس الخمائر وانواعها المعزولة من عينات الدراسة	3-4
56	نتائج الاختبارات الفسلجية لتشخيص أنواع المبيضات المعزولة	4-4
57	نتائج تشخيص عزلات أنواع المبيضات المعزولة باستخدام وسط HiCrome™ <i>Candida</i> Differential Agar (M1297A)	5-4
58	احتمالية التشخيص لأنواع المبيضات المعزولة باستخدام جهاز الفايترك	6-4
60	الرموز التسلسلية المحددة في البنك الجيني لأنواع المبيضات المعزولة	7-4
61	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>C.albicans</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI.	8-4
63	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>C.dublinskiensis</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI	9-4
64	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>Clavispora lusitaniae</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI.	10-4
66	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>Candida tropicalis</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI.	11-4
68	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>Candida parapsilosis</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI.	12-4
70	مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية للفطر <i>Kluyveromyces marxianus</i> المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI	13-4
74	فحص حساسية أنواع المبيضات المعزولة تجاه المضادات الفطرية باستخدام جهاز الفايترك.	14-4
76	الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الميريمية .	15-4
78	الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين.	16-4
79	الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين.	17-4
80	الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي الخام لأوراق نبات الميريمية و المضاد الفطري الامفوتيريسين B ضد أنواع المبيضات المعزولة.	18-4

19-4	قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل للفطريات الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام والمضاد الفطري الامفوتيريسين من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات الحساسة .	86
20-4	قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل للفطريات الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام والمضاد الفطري من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين	87
21-4	أجزاء المستخلصات الناتجة من عملية التجزئة بتقنية (VLC)	88
22-4	عامل ألتحرك والوان المكونات الكيميائية المفصولة في أجزاء المستخلص النباتي الكحولي الخام	92
23-4	الفعالية التثبيطية لأجزاء مستخلص أوراق نبات الميريمية الخام الناتج من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين.	93
24-4	الفعالية التثبيطية لأجزاء مستخلص أوراق نبات الميريمية الخام الناتج من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين .	94
25-4	قيم التركيز المثبط والقاتل الأدنى لأجزاء المستخلص الكحولي الناتجة من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين	98
26-4	قيم التركيز المثبط والقاتل الأدنى لأجزاء المستخلص الكحولي الناتجة من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين	99
27-4	المركبات التي تم فصلها باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC).	101
28-4	الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاة من مستخلص كلوروفورم : أثيل اسيتيت لأوراق نبات الميريمية تجاه أنواع المبيضات المعزولة	107
29-4	التحليل الدقيق للعناصر الموجودة في المستخلص النباتي النانوي	118
30-4	الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي الهجين لأوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المعزولة	120
32-4	قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين.	121

قائمة المختصرات

<i>Candida guilliermondii</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>Candida krusie</i>	<i>C. krusie</i>
<i>Candida kefy</i>	<i>C. kefy</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>
<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>

<i>Candida dubliniensis</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>Salvia officinalis</i>	<i>S.officinalis</i>
Thin layer chromatography	TLC
Hight Performans Liquid Chromotography	HPLC
Gas Chromotography	GC
<i>Candida glabrata</i>	<i>C .glabrata</i>
Zero-dimensional	0-D
One- dimensional	1-D
Two-dimensional	2-D
Scanning Electron Microscopes	SEM
Transmission Electron Microscopes .	TEM
Energy Dispersive X-ray Analyzer	EDAX
X-ray Photoelectron Spectroscopy	XPS
Secondary Ion Mass Spectrometry	SIMS
Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer	ICP-MS
Nuclear Magnetic Resonance	NMR
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	FTIR
X-ray Diffraction	XRD
Polymerase Chain Reaction	PCR
Basic Local Blast Alignment Search Tool	BLAST
National Center For Biotechnology	NCBI
Minimum Inhibitory Concentration	MIC
Minimum Fungicidal Concentration	MFC
Vaccum Liquid Chromotography	VLC
Preparative High Pressure Liquid Chromography	Prep.HPLC
milli Absorbance Unite	mAu

1-المقدمة Introduction

داء المبييضات الفموي (Oral candidiasis) أحد الامراض الفطرية الشائعة التي تصيب الغشاء المخاطي المبطن للفم او الحنك أو اللسان أو البلعوم , وتظهر على هيئة بقع بيضاء أو كريمة واضحة الحدود (Altaee & Alzubaidy, 2020). وهذا الداء تسببه فطريات تنتمي الى جنس المبييضات *Candida* ، وهذا الجنس يضم عددا من الأنواع , تعد المبييضات البيضاء *C.albicans* الأكثر شيوعا إذ تسجل نسبة 80% من بين الخمائر المعزولة من الفم ، يليه *C. kefyr* على التوالي (Raju& Shashank,2011).

تعيش المبييضات على نحو طبيعي في الفم وكذلك في الجهاز الهضمي والجهاز التناسلي الأنثوي والجلد ، وتصبح من مسببات الأمراض في ظل ظروف صحية خاصة ، ولاسيما عند الأطفال وكبار السن ، وفي النساء أثناء فترة الحمل ، وعند مرضى السكري ومن يعانون من نقص الفيتامينات وسرطان الدم ومن يتعرضون للعلاج بأستعمال المضادات الحيوية لفترة طويلة وعند مرضى الإيدز (Anane et al.,2007).

تمتاز المبييضات بامتلاكها عوامل ضراوة خاصة تساعدها على أحداث الامراض والتغلب على دفاعات المضيف ، اذ يمكن أن تنمو في أشكال مظهرية مختلفة تتراوح من الخميرة أحادية الخلية إلى الخيوط الكاذبة أو الخيوط الحقيقية ,تمتلك القدرة على إفراز الإنزيمات خارج خلوية ، مثل الانزيمات الحالة للبروتينات (proteinases) ، الانزيمات الحالة للدهون المفسفرة (phospholipases) ، الانزيمات الحالة للدم (hemolysin) ، والانزيمات الحالة للدهون (lipolytic) ، كما تتميز أيضا بقدرتها على تكوين الأغشية الحيوية التي تلعب دورا رئيسيا في التسبب في المرض ، اذ يُعتقد أن الخلايا الموجودة في الأغشية الحيوية تظهر مقاومة عالية للأدوية المضادة للفطريات وللجهاز المناعي للمضيف (Mohammad et al., 2019). كما أن لبعض أنواعها مثل *C.albicans* و *C. dubliniensis* القابلية على تكوين الأنبوب الجرثومي وإنتاج السموم وهذه لها دور مهم في النمو المفرط للمبييضات لأنها تسهل الالتصاق وتغلغل الأنسجة والغزو اللاحق للمضيف (Altaee &Alzubaidy , 2020).

يتم علاج الأمراض التي تسببها المبييضات باستخدام المضادات الحيوية التقليدية التي تشمل البولينات {مثل الامفوتيرييسين B (Amphotericin B), النستاتين (Nystatin) } والازولات {مثل الفلوكونازول (FLuconazole), الاتراكونازول (Itraconazole) } و Echinocandins

(مثل Micafungin ، Caspufungin)، ولغالبية هذه المضادات تأثيرات جانبية منها السمية الخلوية، وعدم انتظام ضربات القلب المرتبطة بالامفوتيريسين، والسمية الكبدية المرتبطة بالفلوكونازول، والسمية القلبية واضطرابات الجهاز الهضمي المنسوبة الى الايتراكونازول، أما سمية الفوريكونازول تظهر في الاضطرابات العصبية والكبدية. هذه الاثار الجانبية مع الاستعمال المفرط والعشوائي لهذه المضادات أدى إلى تطوير سلالات من المبيضات مقاومة للمضادات (Castillo et al., 2018)، مما دعت الحاجة الى تطوير عوامل مضادة للفطريات احدث من سابقتها واكثر امانا وذات طيف واسع وتكبح عوامل الضراوة التي تشارك في امراضية المبيضات *Candida spp.* وتقضي عليها (Kidd et al., 2016). من هذه العوامل استعمال النباتات كعلاج لعدد من الامراض (Mohammad et al., 2013)، وكمثال عليها نبات الميريمية *S. officinalis* المعروف بأسم Sage وتستعمل على نطاق واسع ومنذ القدم في الطبخ والتحضيرات الطبية كمضادات للاكسدة ومضادات للميكروبات و مضادات للالتهابات ومنظمات هرمونية وللتحكم بالحالات الخفيفة الى المتوسطة لمرض الزهايمر إضافة الى فعاليتها المضادة للاورام الخبيثة (Martins et al., 2015). يمتاز نبات الميريمية بامتلاكه مركبات كيميائية فعالة مختلفة التي تتضمن التربينات الثنائية والتربينات الثلاثية والفلافونيدات والحوامض الفينولية وزيت الميريمية الذي يحتوي على Thujone (Almedia et al. 2019). حاليا استعملت عدد من تقنيات الاستخلاص للكشف عن هذه المركبات الفعالة منها النقع (maceration)، التهضيم (digestion)، الاستخلاص بالغليان (decoction)، الترشيح (percolation)، الاستخلاص المستمر الحار، الاستخلاص بالموجات فوق الصوتية والاستخلاص بموجات الميكروويف (Jakovljevic et al., 2019)، واستعملت ايضا تقنيات الكروماتوغرافيا لفصل عدد من هذه المركبات الفعالة وتنقيتها وتشخيصها مثل تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography) (TLC)، الكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) (High Performans Liquid Chromotography) والكروماتوغرافيا الغازية (GC) (Gas Chromotography).

يضاف الى ذلك فقد ظهرت في بداية القرن العشرين تقنية جديدة عرفت باسم التقنية النانوية التي دخلت على نحو واسع في المجالين الصيدلاني والطبي والزراعي إذ أنها قدمت فرصة لتصميم وانشاء عوامل دوائية تكون متخصصة لتثبيط الاحياء المجهرية ومن بينها *Candida albicans*، وذلك من خلال إنتاج جسيمات ذات أبعاد نانوية تتراوح بين 1- 100 نانوميتر ذات خصائص جديدة ومحسنة بناء على حجم وتوزيع وشكل الجسيمات مقارنة

بالجسيمات الأكبر حجما التي تكونت منها, وذلك بأستعمال طرائق متعددة منها الكيميائية أو الفيزيائية أو الحيوية , وتعد الطرائق الحيوية أكثر أمانا من الطرائق الأخرى وتنتج مواد صديقة للبيئة , لاتحتاج طاقة , وهي رخيصة وسريعة (Castillo et al .,2018) , اذ تستعمل فيها نواتج أيضية ثانوية للاحياء المجهرية كالفطريات, والبكتريا , والفايروسات والطحالب أو تستعمل المستخلصات النباتية في إنتاج الجسيمات النانوية او في عمل توليفة (Combination) مع مواد أخرى وتكوين مركبات جديدة , لغرض إيصالها الى الموقع المحدد (et al.,2016) (Saliem).

إن زيادة الإصابة بالامراض الفطرية الانتهازية ومنها داء المبيضات الفموي في الوقت الحاضر, وزيادة مقاومة المبيضات للمضادات الحياتية التقليدية, أدى الى زيادة الخطر الذي يهدد صحة الانسان , وبناءا على ذلك فقد هدفت الدراسة الحالية الى إيجاد بديل آمن وفعال لمعالجة داء المبيضات الفموي متمثلا بنبات الميريمية وإختبار كفاءة بعض مكوناته ضد الفطريات المسببة للمرض الى جانب إختبار فاعلية المستخلص النانوي للنبات , ومقارنة كفاءته مع المستخلص الخام للنبات والمضادات الحيوية في تثبيط نمو المبيضات وذلك من خلال المحاور الآتية :

- عزل أنواع المبيضات المسببة لحالات داء المبيضات الفموي لدى الاطفال في محافظة كربلاء وتشخيصها باستعمال الطرائق التقليدية والطرائق الجزيئية.
- فحص حساسية أنواع المبيضات المعزولة والتعرف على السلالات الحساسة والمقاومة للمضادات الفطرية الحيوية .
- التحري عن الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق نبات الميريمية تجاه أنواع المبيضات المعزولة الحساسة والمقاومة لبعض المضادات.
- فصل بعض المركبات الفعالة الموجودة في مستخلص أوراق نبات الميريمية وتنقيتها وتشخيصها والتحري عن فعاليتها التثبيطية تجاه أنواع المبيضات المعزولة .
- تحضير مستخلص نباتي نانوي هجين باستخدام أكسيد الزنك وتشخيصه .
- أختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي الهجين تجاه الأنواع المعزولة الحساسة والمقاومة للمضادات .

2- أستعراض المراجع Literatures Review

1-2 : داء المبيضات الفموي Oral Candidiasis

يعد تجويف فم الانسان موقعا فريدا من نوعه في أن يكون مستعمرا بالبكتريا والفطريات والميكوبلازما والفيروسات وحتى البروتوزوا منذ الساعات الست الأولى من الولادة , ومع ذلك فإن الطابع المميز لتجويف الفم يحدد نوع الاحياء المجهرية القادرة على الاستمرار, فالاسطح المتخصصة مثل حليمات سطح اللسان والظهارة الحرشفية الكيراتينية وغير الكيراتينية تؤثر على الاستعمار وتوزيع الكائنات الحية المجهرية داخل الفم , الى جانب العوامل الفسلجية مثل الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة والمغذيات واللعب , وتكون العلاقة بين الكائنات الحية المجهرية متناغمة ومع ذلك يمكن أن تتغير ويحدث المرض . إذ يمكن أن يحدث اضطراب في هذا الاستقرار بسبب تناول المضادات الحيوية والتناول المتكرر للكاربوهيدرات القابلة للتخمير وجراحات الفم والتغيرات في دفاعات المضيف (Marsh & Martin , 2003) .

تشكل الفطريات جزءا من الاحياء المجهرية للفم وتعد المبيضات أكثر أنواع الفطريات شيوعا داخل تجويف الفم , وقد تكيفت لتعيش كفلورا طبيعية. اذ تنتشر في جميع أنحاء الفم وأكثر المواقع شيوعا هو ظهر اللسان وتحت ظروف معينه مثل جفاف الفم , والتدخين , وتسوس الاسنان , وعلاج السرطان , وزراعة الأعضاء . وتتحول هذه الفطريات الى ممرضات وتسبب مرضا يطلق عليه داء المبيضات الفموي . وقدشخص هذا المرض لأول مرة من قبل فرانسوا فيلو عام 1883 , ويكثر بين الأطفال وكبار السن خاصة عند أولئك الذين يرتدون أطقم الأسنان ولدى الافراد الذين يعانون من ضعف المناعة , وفي حالات كثيرة يعد هذا المرض مؤشرا على وجود مرض جهازى مثل داء السكري. (Sharma, 2019 ; Taylor et al.2014) .

يظهر داء المبيضات الفموي بمظاهر سريرية مختلفة ومن أكثر تصانيف داء المبيضات الفموي الشائعة الاستخدام هي تلك التي تم اقتراحها من قبل Lehner في عام 1987 التي تضمنت تصنيف داء المبيضات الفموي على نوعين أساسيين هما (Tarcin , 2011):

- 1- داء المبيضات الفموي الاولي Primary oral candidiasis .
- 2- داء المبيضات الفموي الثانوي Secondary oral candidiasis .

1.1.2: داء المبيضات الفموي الاولي Primary oral candidiasis

1.1.1.2: داء المبيضات الغشائي الكاذب (السلاق)

(Pseudomembranous candidiasis) (Trush)

ان هذا النوع من داء المبيضات الفموي تكون الإصابة به حادة و هو شائع في الأطفال حديثي الولادة ، والمرضى الذين يعانون من نقص المناعة وخاصة الإيدز ومرضى السكر والمرضى الذين يتناولون الكورتيكوستيرويدات وذوي العلاج طويل المدى بالمضادات الحيوية وأمراض الدم والأورام الخبيثة الأخرى . ويظهر على شكل بقع متجمعة بيضاء إلى صفراء مائلة للبيضاء تشبه اللبن الرائب أو الجبن، وتتكون من خلايا ظهارية متقشرة ، ومجموعات متشابكة من خيوط فطرية ، وفايبرين ، ومواد نخرية . ويمكن إزالة البقع عن طريق المسح بلطف ، تاركًا وراءه سطحًا حماميًا ونزيفًا في بعض الأحيان ويكون مكان الإصابة عادة في تجويف الفم ، أو سقف الفم ، أو اللسان واللثة وفي الحالات الصعبة تمتد الى البلعوم والمريء (الخفاجي والمعموري, 2019) .

2.1.1.2 : داء المبيضات الحمامي Erythematous candidiasis

داء المبيضات الحمامي نادر نسبيًا ويظهر على نحو حاد ومزمن , سابقًا كان يُعرف باسم التهاب الفم بالمضادات الحيوية (Antibiotic sore mouth) ، نظرًا لارتباطه بالاستخدام المطول للمضادات الحيوية الواسعة الطيف. وعادة ما يُرى الشكل المزمن في مرضى فيروس نقص المناعة الذي يشمل ظهر اللسان والحنك وأحيانًا الغشاء المخاطي الشدق. وسريريا ، يظهر كمنطقة حمامية موضعية مؤلمة وهو الشكل الوحيد من داء المبيضات المرتبط بالألم . تظهر الإصابة فيه عادة على ظهر اللسان (Patil et al.,2015).

3.1.1.2 : داء المبيضات المفرط التنسج Hyperplastic candidosis

يطلق عليه أيضا مصطلح candidal leukoplakia وتكون على نحو بقع مرتفعة قليلاً ، ملتصقة ، متجانسة أو عقيدية بيضاء لا يمكن محوها. تكثرفي المنطقة الصوارية من الغشاء المخاطي للفم، وفي كثير من الأحيان ظهر اللسان, وجميع المرضى الذين يعانون من المبيضات المفرطة التنسج هم من المدخنين في العموم الغالب (Mallya & Shrikara, 2019).

4.1.1.2 : التهاب زوايا الفم Angular cheilitis

يظهر التهاب زوايا الفم سريريًا على شكل آفات حمامية متشققة تؤثر على زوايا الفم كما ان وجود طيات جلد الوجه والتجاعيد على طول مفاصل الشفة والطيات الأنفية ، خاصة عند كبار السن ، قد تسبب تراكم اللعاب وبيئة رطبة مما يؤدي إلى التهاب الشفة الزاوي. وهو شائع الانتشار في المرضى الذين يرتدون أطقم الأسنان مع انخفاض أبعاد الإطباق العمودي والذين يعانون من نقص الحديد أو فيتامين B₁₂ (Tarcin , 2011).

2.1.2: داء المبيضات الفموي الثانوي Secondary Oral Candidosis

يشمل هذا النوع من الامراض داء المبيضات المخاطي الجلدي المزمن Chronic Mucocutaneous Candidosis الذي يحدث في الجلد والأظافر والأغشية المخاطية. ويرتبط حدوثه بوجود خلل في المناعة الخلوية كما في حالات متلازمة نقص المناعة المشترك الحاد ، ومتلازمة نزلوف (التنسج الليمفاوي الغدة الصعترية) ، ومتلازمة دي جورج (عدم تنسج الغدة الصعترية الخلقى) ومتلازمة فرط الغلوبولين المناعي E واعتلال الغدد الصماء وعلى وجه الخصوص مرض أديسون (Patil et al.,2015 ; Tarcin , 2011).

2.2: العوامل المهيئة للإصابة بداء المبيضات الفموي Predisposing factors

تنشأ الإصابة بداء المبيضات الفموي بسبب حدوث تغيير في دفاع العائل حيث تؤدي العوامل المناعية وغير المناعية أدوارا حاسمة في تهيئة الظروف المواتية لانتشار المبيضات (Sharma, 2019) , وتم توضيح هذه العوامل وأسباب حدوثها وميكانيكية مساهمتها في حدوث داء المبيضات الفموي في الجدول (1-2) و حسب ماأشار اليه (Ghom & Ghom 2014).

جدول (1-2) : العوامل المهيئة للإصابة بداء المبيضات الفموي وأسباب حدوثها (Ghom & Ghom ,2014)

العوامل	السبب	ميكانيكية التأثير
-عوامل موضعية	- قلة العناية بنظافة الفم - جفاف الفم . - كثرة إستخدام المضادات الحيوية . - طقم الاسنان	- يعزز التصاق الميكروبات واستعمارها - عدم وجود تأثير اللعاب المضاد للميكروبات. - يثبط نمو البكتريا المنافسة في الفم . - تعزل الانسجة الرخوة عن اللعاب مما يسبب الجفاف ويقدم بذلك بيئة مناسبة لنمو الميكروبات
- عوامل جهازية 1- ضعف وظيفة الجهاز المناعي 2-الضعف العام	- حديثي الولادة - نقص المناعة الوراثي -الايدز -العلاج بالكورتيكوستيرويدات - قلة كريات الدم . - فقر الدم , سوء التغذية , سوء الامتصاص . - داء السكري .	- عدم تطور الكفاءة المناعية على نحو كامل . - عيوب مناعية خلطية أو خلوية محددة - ضعف الاستجابة المناعية الخلوية - تثبيط وظيفة المناعة . - استنفاد الكريات البيض في الدورة الدموية الناجم عن العلاج الكيميائي وفقر الدم اللاتنسجي - ترقق البطانة الظهارية , قلة وصول الاوكسجين للانسجة . - ارتفاع نسبة السكر والاحماض الكيتونية في الدم .

3.2: جنس المبيضات Candida

المبيضات هي أشباه خمائر انتهازية عالمية, حقيقية النواة, غير ملونة, غير محاطة بكبسولة, هوائية أو اختيارية التهوية, تتكاثر لاجنسيا بأنتاج أبواغ برعية, تتباين في احجامها ما بين 3-15 مايكروميتر وتتميز عن باقي الخمائر بوجود سكريات متعددة في جدارها الخلوي وقدرتها على تكوين أشكال مختلفة فقد تكون وحيدة الخلية أو تظهر بشكل خيوط فطرية كاذبة أو حقيقية, (Tamo, 2020). وهناك عوامل متعددة تؤثر على عملية التحول تشمل قلة الاوكسجين ووجود الوسط السائل ووجود الاحماض الامينية الخالية من الكبريت ووجود مصدر للكربون متعدد السكريات ووجود مصل الدم اضافة الى درجة الاس الهيدروجيني التي تبلغ 7.5 (الخفاجي و المعموري, 2019).

يعد جنس المبيضات من الخمائر الشبيهة بالفطريات (Yeast like fungi) وهي جزءا من الفلورا الطبيعية التي تتواجد في الفم والقناة المعوية والمهبل والجلد وبأماكنها أن تسبب عددا من الأمراض (Mallya & Shrikara, 2019). يشمل جنس المبيضات على 200 نوع, 20 نوعا منها فقط مسؤولة عن الحالات المرضية في الانسان, ومن أكثرها شيوعا *C. albicans* في الحالات الطبيعية والحالات المرضية بينما الأنواع الأقل شيوعا تتضمن *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. Guilliermondi* و *C. dubliniensis*, كما تم تسجيل حالات مختلطة من *C. albicans* و *C. glabrata* ووجد أن هذا يعزز من الغزو الفطري وتلف الأنسجة (Patel, 2022). ويوضح الجدول (2-2) التالي أنواع المبيضات الشائعة في الحالات السريرية وبيئتها التي تنتشر فيها (Tamo, 2020).

جدول (2-2): أنواع المبيضات الأكثر شيوعا في الحالات السريرية وبيئاتها (Tamo, 2020)

بينتها	الأنواع الأكثر شيوعا
الغشاء المخاطي المبطن للفم, القناة الهضمية, القناة التناسلية والقناة التنفسية. وتشكل 75% من أنواع المبيضات المعزولة من الانسان .	<i>C. albicans</i>
القناة الهضمية والقناة البولية التناسلية.	<i>C. glabrata</i>
الجلد	<i>C. parapsilosis</i>
التربة, المياه, القناة الهضمية, القناة البولية والقناة التناسلية .	<i>C. tropicalis</i>
الغذاء (الالبان).	<i>C. krusei</i>
	الأنواع الأقل شيوعا
الطيور, القناة الهضمية .	<i>C. dubliniensis</i>
الجلد.	<i>C. guilliermondii</i>
القناة الهضمية .	<i>C. lusitaniae</i>
الغذاء, القناة الهضمية, القناة البولية, القناة التنفسية .	<i>C. kefyr</i>
الحيوانات.	<i>C. lipolytica</i>
حالات داء المبيضات للاظافر.	<i>C. ciferrii</i>
القناة الهضمية.	<i>C. inconspicua</i>
الميا, الغذاء (منتجات الالبان).	<i>C. rugosa</i>
الجلد.	<i>C. famata</i>
المهبل.	<i>C. africana</i>

4.2 : تصنيف المبيضات *Candida* Classification of

ذكر (Koundal & Cojandaraj (2020 أن جنس المبيضات تصنف ضمن مملكة الفطريات وضمن قسم الفطريات الكيسية وكما مبين في التصنيف أدناه :

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Saccharomycetes

Order: Saccharomycetales

Family: Saccharomycetaceae

Genus: *Candida*.

4.2: عوامل أمراضية المبيضات *Candida* Pathogenicity Factors of

1.4.2: الالتصاق Adherence

ان عملية التصاق المبيضات على خلايا المضيف يعد خطوة ضرورية لحدوث الاستعمار الاولي كما أنه يسهم في استمرار الكائن الحي داخل المضيف. فخلايا المبيضات تلتصق بأنواع مختلفة من خلايا المضيف منها الخلايا الظهارية, والخلايا الطلائية والخلايا البلعمية. وتسهم أنواع متعددة من البروتينات في عملية الالتصاق, ومنها بروتينات الكلوتينين التي يتم التعبير عنها من قبل الخميرة *C.albicans*, توجد هذه البروتينات في جدار الخلية الفطرية وترتبط بروابط ببتيدية متنوعة مع الثدييات مما يسبب في تراكم الخلايا من خلال الالتصاق المتماثل وكذلك تتجمع مسببات الامراض الميكروبية الأخرى للتوسط في العدوى متعددة الميكروبات (Williams et al.,2011). يمكن ان تلتصق المبيضات على الاسطح الحيوية مثل سطوح الخلايا الطلائية, والاسطح غير الحيوية مثل الاسنان المصنوعة من الاكريليك والسليكون (Fanning & Mitchill,2012).

2.4.2 : إنتاج الانزيمات الحالة Hydrolytic Enzymes Production

تمتاز المبيضات بقدرتها على افراز الانزيمات الذائبة بالماء بما في ذلك أنزيمات phospholipases, lipases, aspartyl proteinases, phosphomonoesterase, hexosaminidase, ومن بين هذه الانزيمات حظيت انزيمات aspartyl proteinases بأكبر قدر من الاهتمام على نطاق واسع فهي تعد أساسية في تطور عدوى المبيضات, وتقوم هذه الانزيمات بإنجاز عدد من الوظائف الكيموحيوية فهي تسهم في هضم الجزيئات لغرض تغذية الخميرة وتهضم جدران المضيف لتسهيل عملية الالتصاق والغزو فضلا عن التأثير على الجهاز المناعي للمضيف من ناحية مقاومته للمضادات الميكروبية (Bhat et al.,2011). تظهر انزيمات الاسبارتيل نشاطها في بيئات حامضية واطئة $pH > 4$ (). يفرز هذا النوع من الانزيمات من قبل أنواع معينة من المبيضات. اذ وجد أن السلالات التي

تعزل من حالات داء المبيضات الفموي تنتج مستويات أعلى من انزيمات الاسبارتيل مقارنة بالسلاطات التي تعزل من الحالات المرضية الأخرى (Williams et al.,2011) .

أما أنزيمات phospholipases فتعمل على تحليل واحد أو أكثر من الروابط الاسترية glycerophospholipids ويعد النوع *C.albicans* النوع الوحيد الذي يفرز هذا النوع من الانزيمات ووجد أن له علاقة بفعالية الانبوب الجرثومي في إختراق الغشاء المخاطي للمضيف من خلال إزالة المستضدات المصنعة على أسطح الخلايا (Bhat et al.,2011). وفيما يخص انزيمات lipases أشار Chaffin(2008) الى أن هذه الانزيمات تعمل على تحليل الاواصر الاسترية للدهون منتجة بذلك احماض دهنية حرة و monoacylglycerols وكليسيرول كما أنها تلعب دورا مهما في تموضع الإصابة .

3.4.2: التحول المظهري Phenotypic switching

يمكن أن تظهر أنواع المبيضات ، ولا سيما *C.albicans* ، تناوباً مظهرياً تتضمن الأشكال الخميرية والخيط الفطري الكاذب والخيوط الحقيقية , اعتماداً على الظروف البيئية. ويُعتقد أن الخيوط الفطرية تؤدي دوراً مهماً في غزو الأنسجة والمواد الحيوية إذ وجد أن المبيضات التي تنتج الخيوط تظهر مقاومة أكبر للبلعمة ، كما أظهرت الأبحاث في المختبر أن سلالات *C. albicans* و الأنواع الأخرى من غير *albicans* التي تفتقر إلى تكوين الخيوط تظهر قدرة أقل على غزو الأنسجة (Williams et al.,2011) . كما أشار Karkowska-Kuleta et al. (2009) الى قابلية خميرة المبيضات البيضاء على التحول من الشكل الخميري الأبيض الناعم الى الشكل المعتم الخشن (Opaque), هذا التغيير هو إشارة الى عمليات واسعة النطاق تنطوي على تغيير الكثير من الخصائص الجزيئية والكيميائية الحياتية التي هي مفيدة للخميرة من أجل البقاء داخل جسم المضيف .

4.4.2 : إنتاج الاغشية الحيوية Biofilms Production

يمكن تعريف الأغشية الحيوية على أنها تجمعات من الكائنات الحية الدقيقة ، غالباً ما تكون مرتبطة بسطح ومغلقة داخل مصفوفة متعدد السكريات و خارج المادة الأساس والتي تنتجها الكائنات الحية الدقيقة . وتعد حالة الأغشية الحيوية هي الطريقة المفضلة لنمو الكائنات الحية الدقيقة في البيئات الطبيعية. كما تم التوصل الى أن سلالات المبيضات ذات القدرة العالية على تكوين الأغشية الحيوية تكون على النحو العام أكثر ضراوة من غيرها. فالأغشية الحيوية تلعب

دوراً في حماية الخلايا الفطرية من تأثير التنظيف الميكانيكي الطبيعي لللعاب والسائل اللثوي المفصلي كما أنه يمثل حاجزاً دفاعياً ضد تغلغل العوامل المناعية للمضيف والمضادات الميكروبية (Williams et al., 2011). وتتم عملية إنتاج الاغشية الحيوية بمراحل متعددة, أول هذه المراحل هي عملية الالتصاق حيث تلتصق خلايا الخميرة المعزولة بالمادة الاساس لتكوين طبقة قاعدية من الخلايا. تليها مرحلة تكاثر الخلايا وتكوين الخيوط ، حيث تبدأ خلايا الخميرة في التمدد وتتطور إلى خيوط خيطية. هذه هي خطوة البدء التي تقوم بها الخلايا بتغيير شكلها وغزو الغشاء المخاطي للمضيف أو البلاستيك أو الأسطح البوليمرية الأخرى في الأجهزة الطبية , حيث يتم إفراز مجموعة من الإنزيمات المتحللة بالماء ، مثل proteinases, haemolysins و phospholipase ، بواسطة *C. albicans* ، مما يسمح للفطر بغزو انسجة المضيف أو الركائز الصلبة الأخرى. و آخر مرحلة هي مرحلة النضج حيث يكون إنتاج الخيوط الفطرية مصحوبا بإفراز مواد بوليمرية خارج الخلية. تشتمل على α -mannan و β -1,6 glucan ، و β -1,3 glucan (Pereira et al., 2021).

5.4.2: إنتاج السموم Toxin production

تقوم المبيضات البيضاء بإفراز نوعين من السموم وهما السموم ذات الوزن الجزيئي العالي (High molecular weight toxins) والسموم ذات الوزن الجزيئي الواطئ (Low molecular weight toxins) (Iwata et al., 1984). السموم ذات الوزن الجزيئي العالي تشمل نوعين الأول منهما يسمى الكانديتوكسين (Candidotoxin CT) وله وزنة الجزيئي 75000 دالتون يتألف من أربع وحدات ثانوية اذا فقد أي منهما فانه يفقد سميته , يؤثر على الجسم عن طريق تقلص العضلات (Klotz et al., 2010) اما النوع الأخر من السموم فهو الكلايكوبروتين الكانديدي (Candidal glycoprotein) وهو بروتين سكري وزنه الجزيئي 50000 دالتون (Iwata et al., 1984). أما بالنسبة للسموم ذات الوزن الجزيئي الواطئ فتشمل ست مركبات سامة تختلف في الوزن الجزيئي والتأثير السام والتركييب الكيماوي تركيب هذه السموم هو إما Phenylpropanoate او Lipopolysaccharide او Extracellular polysaccharide أو هي مركبات ايضية ووسطية (Iwata and Yamanoto, 1983).

5.2 : المضادات الفطرية Antifungals

يمكن علاج داء المبيضات بمضادات الفطريات التي تنتمي إلى فئات مختلفة من الأدوية وتستهدف عمليات خلوية مختلفة ، تشمل هذه العمليات الخلوية التخليق الحيوي لجدار الخلية وغشاء الخلية ، والتخليق الحيوي للحمض النووي الريبي، إذ تتضمن كل عملية من عمليات التخليق الحيوي هذه سلسلة من الإنزيمات، ومن ثم فإن هذه المضادات إما أن تثبط نمو الخميرة المسببة للأمراض أو تقتلها. وتم تقسيم المضادات حسب الهدف والية عملها إلى الأنواع الآتية (Bhattacharya et al.,2020) :

1.5.2 : المضادات التي تستهدف الايركوستيرون وتكوينه الحيوي

الايركوستيرون هو المكون الرئيسي لأغشية الخلايا الفطرية ، بما في ذلك أغشية البلازما والميتوكوندريا ويتم تحفيز التخليق الحيوي للايركوستيرون بواسطة سلسلة من 25 إنزيمًا مختلفًا ، ويكون مسار التخليق الحيوي هذا هدفًا مثاليًا للأدوية التي تستهدف إما التخليق الحيوي لهذا الدهن أو الإريكوستيرون نفسه (Bhattacharya et al.,2020) ويشمل هذا الصنف من المضادات :

1.1.5.2 : الازولات Azoles

الازولات هي مركبات حلقة غير متجانسة مكونة من خمسة مكونات لها خصائص مضادة للفطريات. يتم تصنيفها على نطاق واسع إلى مجموعتين تشمل الإيميدازول (imidazole) والتريازول (triazole). يحتوي الإيميدازول على اثنين من النيتروجين في حلقة الأزول ومن اصنافها الكلوتريمازول (clotrimazole) ، الإيكونازول (econazole)، الكيتوكونازول (ketoconazole)، الميكونازول (miconazole) ، والتيوكونازول (tioconazole). أما التريازول (Triazoles) يحتوي على ثلاثة نيتروجين في حلقة الأزول وتشمل الفلوكونازول (fluconazole) والإيتراكونازول (itraconazole)، الفوريكونازول (voriconazole) وإيزافونازول (isavuconazole) والبوساكونازول (posaconazole). الفلوكونازول هو أكثر أنواع الأزول شيوعًا المستخدمة في أثناء العلاج. وتعد الازولات هي الأدوية المضادة للفطريات الأكثر شيوعًا المستخدمة في علاج عدوى المبيضات والوقاية منها، وتستهدف الإنزيم 14α -Demethylase ، وهو إنزيم مهم في التخليق الحيوي للايركوستيرون (Veen et al.,2003).

2.1.5.2 : البوليينات Polyenes

تستهدف هذه الفئة من الأدوية الإيركوسستيرول في الغشاء البلازمي للخلية الفطرية وتكون ذات تأثير قاتل للفطريات, اذ أنها ترتبط مع الايركوسستيرول وتؤلف ثقوبا ويتسبب تكوين الثقوب في حدوث تسرب سريع للأيونات أحادية التكافؤ (K + و Na + و H + و Cl-) وموت الخلايا الفطرية. تشمل البوليينات الأمفوتريسين B (amphotericin B) والنيستاتين (nystatin), ويعد الامفوتريسين B من افضل العلاجات المستخدمة للاصابات الفطرية واوسعها تأثيرا على مدى كبير بالرغم من تأثيراته السلبية والسمية, ومن اجل التقليل من التأثير السمي للمضاد تم تحضير تراكيب كيميائية جديدة من خلال ربطه بحوامل دهنية ومن اهم الاشكال الكيميائية الصيدلانية التي استخدمت لتقليل التأثير السمي له, Liposomal amphotericin B, Amphotericin B colloidal dispersion و Amphotericin B lipid complex □ (Bhattacharya *et al.*,2020).

2.5.2 : المضادات التي تثبط تكوين الجدار الخلوي

يمثل الجدار الخلوي الطبقة الخارجية الصلبة للخلية الفطرية وهو خط الدفاع الأول الذي يحمي الخلية من الاجهاد التناضحي, وهناك مجموعة من المضادات التي تستهدف هذا التركيب مثل Echinocandins التي تتضمن micafungin, canidufungin, و caspofungin حيث تعمل على تثبيط عمل الانزيم B-1,3 glucan synthase المسؤول عن تصنيع الكلوكان الذي يعد من المكونات المهمة لجدار الخلية الفطرية (Patrick *et al.*,2022).

3.5.2: المضادات التي تثبط تكوين الحوامض النووية

ومن المضادات الفطرية الهامة الأخرى هي المضادات التي تثبط تكوين الحوامض النووية وهذه المضادات تشمل 5-Fluocytocine (FC). تم تصميم هذه المضادات في الأصل في الخمسينيات من القرن الماضي وهي واحدة من أقدم فئات الأدوية المضادة للفطريات. وتعتمد آلية عملها على التداخل مع ايض البيريميدين وتصنيع الحوامض الى جانب تصنيع البروتينات, فعندما يدخل المضاد FC الخلية الفطرية بمساعدة الانزيم permase cytosine ويتحول داخل الخلية إلى 5-Fluorouridine triphosphate (5FUTP) بمساعدة الانزيم cytosine deaminase ثم تتحد 5FUTP في الحمض النووي الريبي الفطري بدلاً من اليوريدين ثلاثي الفوسفات (UTP), مما يؤثر على ترجمة البروتين. كما ان المضاد يعمل على تحويل 5-FU

الى أحادي الفوسفات (5FdUMP) Fuorodeoxyuridine الذي يثبط أنزيم thymidylate synthase ، وهو إنزيم مهم في التخليق الحيوي للحمض النووي DNA (Bhattacharya *et al.*,2020).

6.2 : آلية مقاومة المضادات الفطرية

تعتمد مقاومة الفطريات للمضادات على آليات مختلفة ، وهي (1) انخفاض تراكم الدواء داخل الخلايا ، (2) انخفاض انجذاب الدواء الى الهدف و (3) ابطال تأثير الدواء, وتكون آلية المقاومة مختلفة اعتماداً على طريقة عمل المركبات المضادة للفطريات, وتم توضيح عدد من الاليات الخلوية والجزيئية الرئيسية لمقاومة المبيضات للمضادات في الجدول (2- 3)

(Spampinato & Leonardi,2013) .

الجدول (2- 3): آليات مقاومة الفطريات للمضادات الحيوية (Spampinato & Leonardi,2013)

صنف المضاد	الآلية المقاومة	الأساس الوظيفي للمقاومة
Azoles	- زيادة تنظيم CDR1 / CDR2 و MDRI عن طريق الطفرات النقطية في عوامل النسخ TACI و MRR1. - تنظيم ERGII مضاعفة عامل التنظيم وأستنساخه . - طفرات نقطية في ERG3.	- زيادة تنظيم ناقلات الأدوية. - زيادة تركيز lanosterol 14- α -demethylase . - تعطيل C5 sterol desaturase مما يؤدي إلى حدوث تغييرات في المسار البنائي للإرغوستيرول
Echinocandins	طفرات نقطية في FKS1 , FKS2.	-انخفاض إنتاج glucan synthase للدواء.
Polyenes	- طفرات نقطية في ERG3 , ERG6.	-انخفاض محتوى الأيركستيرول في الخلايا.
Nucleoside analogues	- طفرات نقطية في FCY2. -طفرات نقطية في FUR1.	- تعطيل نفاذية cytosine permease التي تؤثر على امتصاص الدواء. - تعطيل uracil phosphoribosyl transferase مما يؤدي إلى تغييرات في استقلاب 5-fluorocytosine .

7.2: إستعمال النباتات الطبية في علاج امراض الفم

إن ظهور الآثار الجانبية لمضادات الفطريات كما في حالة استخدام البوليينات التي تسبب الحمى والغثيان والقيء والسمية الكلوية وتسمم الكبد والتفاعلات مع الأدوية المشتركة , كما أن المقاومة المتزايدة للأدوية من قبل الميكروبات التي تبطل العلاجات السريرية , دفعت الباحثين إلى إيجاد علاجات فعالة للسيطرة على الامراض الفطرية (Tocci et al.,2018). وفي السنوات الأخيرة ظهرت العوامل الطبيعية كمصادر للجزيئات الفعالة احيائيًا مع إمكانية تطبيقاتها العلاجية في المجالات الطبية المختلفة وفي طب الأسنان, وتعد المستخلصات النباتية من بين هذه العوامل , فهي تمثل مجموعة من المركبات الطبيعية المرغوبة بشدة في الوقاية من داء المبيضات الفموي وعلاجه (Megwati & Indah ,2021). وتعد طريقة بديلة لمعالجة أمراض الفم / الأسنان ، وخاصة في الوقت الحاضر وفي البلدان المتقدمة في العالم ، بسبب آثارها الجانبية المنخفضة مقارنة بالمركب الاصطناعي , حيث إستخدمت لعلاج تسوس الأسنان والتهاب اللثة التقرحي وقرح الفم والقلاع الفموي والتهاب اللوزتين (Al- et al.,2020 Somaiday).

أشار Groppo et al.(2008) الى أنه يتم إضافة بعض المنتجات النباتية الى معاجين الاسنان وغسول الفم لمنع تسوس الاسنان أو تكون الاغشية الحيوية للحياض المجهرية ومن هذه النباتات البابونك الألماني *Matricaria chamomilla* له خصائص مضادة للالتهابات ونبات القنفذية الأرجوانية *Echinacea purpurea* يحفز استجابة الجهاز المناعي والمريمية *Salvia officinalis* تمتلك خصائص مضادة للالتهابات والميكروبات ونبات العصرة *Commiphora myrrha* لها خصائص مطهرة طبيعية ونبات النعناع الفلفلي *Mentha piperita* له خصائص مضادة للالتهابات ومسكنة للالم .

أظهرت بعض الدراسات منها دراسة (Anibal et al.(2010) أن مستخلصات النباتات الارقطيون *Arctium lappa* وشجرة البوق الوردي *Tabebuia avellanedae* والنعناع الفلفلي *Mentha piperita* ونبات الباريري *Arrabidae chica* ونبات اكليل الجبل *Rosmarinus officinalis* قد أظهرت نشاطا مضادا ضد سلالات المبيضات البيضاء المعزولة من الأطفال والبالغين المصابين بأمراض اللثة من خلال تثبيط نموها و تثبيط قابليتها على إفراز الانزيمات الحالة للبروتينات. أشار (Anushri et al.(2015) الى أن نبات الزنجبيل *Zingiber officinalis* يمتلك زيوت أساسية و oleoresin , zingiberene, curcumin و sesquiterpenes, phellandrene bisabolene أستعملت لتسكين ألم الاسنان ولعلاج

حالات السلاق الفموي .أما (Al-Terehi et al.(2015) فقد توصل الى قابلية نبات الميرمية *Salvia officinalis* والمردقوش *Origanum vulgare* والرمان *Punica granatum* وعرق السوس *Glycyrrhiza glabra* على تثبيط نمو أربعة أنواع من المبيضات شملت *C. albicans*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, *paracitucus* المقاومة للمضادات . وأشار(2016) Chinsebu الى أن الرمان *Punica granatum* L. والبابونك *Matricaria recutita* L. والشاي الأخضر *Camellia sinensis* استخدمت في الكثير من دول العالم للحفاظ على صحة الفم كما أن نبات الخرمال المشملي *Diospyros mespiliformis* استخدم لصنع أعواد تنظيف الاسنان .أما (Al- Mamoori et al.(2021) أشار الى أن نبات القرنفل *Syzygium aromaticum* يتكون من زيت أساسي الايوجينول (eugenol) ويتم استخدامه لعلاج آلام الاسنان والتهاب دواعم الاسنان وكما مادة مخدرة ولعلاج نزيف اللثة .

1.7.2 : نبات الميرمية *Salvia officinalis* .

اكتشف Linnaeus نبات الميرمية *Salvia officinalis* في عام 1753 في منطقة شرق البحر الأبيض , و ينتمي إلى عائلة Lamiaceae (Lemle, 2018), وهو نبات عطري , ينمو بشكل شجيرات معمرة ذات سيقان خشبية , يصل طوله الى أكثر من 60 سم لكن الكثير من الأنواع المستزرعة تكون أقصر , الأوراق متقابلة شكلها متطاوول وتتغاير في لونها من الرصاصي الى الرصاصي المخضر وفي بعض الأحيان ذهبية الى وردية وذات كساء سطحي وبأطوال 5 سم .السيقان تكون خضراء في بداية النمو ثم تتحول الى خشبية في السنة الثانية من عمر النبات وتتبدل السيقان المعمرة الخشبية بسيقان خشبية كل بضعة سنوات ,الازهار تترتب بشكل سنابل بترتيب سوارى حول محور أو حامل النورة السنبلية تكون بألوان أزهار نبات اللافندر تتراوح من الأزرق الى الوردى أو البنفسجي وموسم الازهار يكون صيفا.كل زهيرة تتكون من شفتين وتدعى بالازهار ذات التويج ثنائي الشفة (شكل 2-1) وتتغذى عليها الكثير من الكائنات كالنحل والفرشات والطيور أما الجذور فتكون وتدية (Al-Rawi , 2014).

يعد نبات الميرمية من أقدم النباتات الطبية ويوحى أصل اسمها اللاتيني بخصائصها الطبية ، فكلمة *Salvia* تأتي من الفعل اللاتيني *salvarem* وتعني الشفاء (cure) أو الحفظ (save). وهناك عدة تسميات تطلق على نبات الميرمية ومن أكثرها شيوعا Sage (الطيب) أو CommonSage (الطيب الشائع) أو Garden

Sage (طبيب الحديقة) أو الطيب الذهبي (Golden Sage) (Behradmanesh *et al.*,2013)

يستعمل نبات الميريمية منذ العصور القديمة على نطاق واسع من أجل إضافة نكهة إلى المواد الغذائية ، كعشب جاف أو زيت أساسي , كما أنها تستخدم لعلاج التهابات اللثة وتجويف الفم ولعلاج السعال وكمدرر وعامل مساعد لالتئام الجروح ولتحسين الذاكرة (Garcia *et al.*,2016). ولاتزال تستخدم في جميع انحاء العالم وأصبحت هدفا للبحث عن المركبات الفعالة إذ أنه يظهر مجموعة واسعة من الفعاليات الطبية فهو يستخدم كمضاد لداء السكر ومضاد للاكسدة ومضاد للسمنة ومضاد للتشنج ومضاد للفطريات والبكتريا والفيروسات ومضاد للسرطان كما انه يستخدم لعلاج حالات الخرف والاكتئاب وأمراض القلب , إضافة الى استخدامه في حفظ الغذاء وكمكّهات في صناعة العطور ومستحضرات التجميل (Grdiša *et al.*,2015). أشار El-Feky&Wael(2016) الى أن فعالية نبات الميريمية كمضادات للاكسدة وكمضادات ميكروبية تعتمد على نوعية المادة النباتية وظروف الاستخلاص.



الشكل (1-2): A- شجيرة نبات الميريمية *Salvia officinalis*, B - أوراق نبات الميريمية *Salvia officinalis* (El-Feky & Wael, 2016)

2.7.2 : المركبات الفعالة في نبات الميريمية Bioactive compounds in

Salvia officinalis

1.2.7.2: الزيوت الأساسية Essential oil

يحتوي نبات *S. officinalis* L. على نسبة عالية من الزيوت العطرية و يشير ذلك إلى وجود تراكيب غدية خارجية تنتج زيتاً طياراً، كما تشير النكهة المميزة والرائحة العطرية لهذا النبات إلى وجود الزيت العطري الذي يتكون من خليط من المركبات المتطايرة من التربينات ذات الأوزان الجزيئية المنخفضة التي تشمل التربينات الأحادية وحامض الأوليانوليك (oleanoic acid) (El-Feky & Wael, 2016). حديثاً، وجد أن زيتته غني بالتربينات الأحادية المؤكسجة، حيث يتراوح مداها من 59.43 إلى 70.68% وهو معقد في تركيبته ويتكون بشكل رئيسي من α -thujone، α -humulene، 1,8-cineole، E-caryophyllene، β -thujone، β -Pinene، α -Pinene، 16-Camphor، bornylacetate، myrcene و seucalyptol. كما أكدت الدراسات السابقة أن الجودة الجيدة لزيت الميريمية تشير إلى وجود كمية عالية من مادة α -epimeric و β -thujones (50% أو أكثر) وكمية قليلة من زيت الكافور (Camphor oil) أقل من 20% (Raal et al., 2007). وأشار El-Feky & Wael (2016) إلى أن الاختلاف في تركيب الزيت العطري يحدث بسبب وقت زراعته والمنطقة التي يزرع فيها.

2.2.7.2 : المركبات الفينولية Phenolic compounds

تنتج النباتات مركبات فينولية مختلفة من خلال مسارات shikimate, mevalonate و phenyl propanoid ولهذه المركبات دور مهم في التصبغ والتلقيح والحماية ضد الأشعة فوق البنفسجية ومن مسببات الأمراض (El-Feky & Wael, 2016). وأظهرت الدراسات التي جمعها Abdelkader et al. (2014) أن *S. officinalis* L. غني بالمكونات النشطة بيولوجياً التي تتمثل بشكل رئيسي في مركبات البوليفينول، وأضافوا إلى أن هذه المركبات يمكن تصنيفها إلى أحماض فينولية وفلافونيدات. تتميز المركبات الفينولية بوجود حلقة عطرية واحدة أو أكثر مع مجموعة هيدروكسيل واحدة أو أكثر، ولهذا السبب تصنف هذه المركبات على أنها أحماض فينولية، الفلافونويدات، الستيلبين (Stilbins)، الكومارينات، والعفصيات. وأشار Roby et al. (2013) إلى أن الأحماض الفينولية تشمل carnosic acid،

carosol rosmarenic acid, methyl rosmarene, caffeic acid, cinnamic, salviolic acids و chlorogenic acid, quinic acid بينما الفلافونويدات تشمل , luteolin-7- إضافة الى apigenin , luteolin , quercetin ferulic acid , glucoside وغيرها من الكلايكوسيدات الفينولية. وكل هذه المركبات لها خصائص علاجية فعالة ومفيدة لصحة الإنسان .

8.2 : التقنية النانوية Nanotechnology

التقنية النانوية يقصد بها التصميمات والتوصيفات وسبل الانتاج وطرائق الاستخدام التي تعد وتهيء المواد والأدوات والاجهزة على مقياس النانومتر ويتراوح حجمها بين 1-100 نانومتر (Jagessar,2020) وتمتلك خصائص مميزة ومهمة كزيادة مساحة سطحها الى كتلتها مما يزيد من سطح تماسها مع الاجسام الأخرى كما أنها تعزز من كفاءتها الحفزية للتفاعلات إضافة الى قابليتها على أدمصاص وحمل المركبات الأخرى (علوش, 2020).

1.8.2: المواد النانوية Nanomaterials

تعرف المواد النانوية انها المواد التي يكون أحد أبعادها على الأقل ضمن البعد النانوي (1-100 نانومتر) وتصنف هذه المواد حسب أبعادها الى أنواع متعددة وهي المواد النانوية الصفرية الابعاد (0-D) Zero-dimensional nanomaterials ويقصد بها المواد التي تكون جميع أبعادها عند المقياس النانوي أي أصغر من 100 nm , والمواد النانوية احادية الابعاد One-dimensional (1-D) nanomaterials ويكون عدد الابعاد غير النانوية فيها بُعد واحدا, والمواد النانوية الثنائية الابعاد Two-dimensional (2-D) nanomaterials عدد أبعادها غير النانوية هو بُعدين , والمواد النانوية ثلاثية الابعاد Three – dimensional nanomaterials أن أحد اسباب تصنيف هذه المواد ضمن المواد النانوية يعزى الى إمتلاكها تركيب بلوري نانوي (الساعدي , 2022).

يمكن أن توجد أغلب المواد النانوية بشكل مساحيق Powders ، عوالق Suspensions أو مواد رغوية (رغوية) Colloids. وعلى وفق التركيب الكيماوي Chemical Composition ، فإن المواد النانوية يمكن أن توجد بشكل مكون واحد من المادة Single Constitute او مركبة Composite من مواد متعددة قد تكون (معادن Metals ، سبائك Alloys ، بوليمرات Polymers ، أو سيراميك Ceramic) (الساعدي, 2020). كما تتخذ الدقائق النانوية هياكل مختلفة منها ماتكون بشكل نقاط كمية Quantum dots , أو فلورين Fullerene , وكرات نانوية Nanoballs , أو بشكل انابيب الكربون النانوية Carbon

Nanotubes, أو الألياف نانوية Nanofibres, وأسلاك نانوية Nanowires, أو بشكل القشرة النانوية Nanoshells. وهذه الجسيمات النانوية قد تكون جسيمات طبيعية موجودة أصلاً في الطبيعة مثل جسيمات النانو الطينية nanoclay والألياف السليلوز النانوية cellulose nanofibers وكذلك جسيمات السليكون ومركباته, كما يمكن الحصول على جسيمات النانو صناعياً ومن أمثلتها جسيمات النانو من الذهب nanogold والفضة nanosilver وأنابيب الكربون النانوية carbon nanotube, والنقاط الكمية quantum dot وغيرها (الرفاعي, 2016).

بالرغم من وجود عدد من الأدوات والطرائق المستخدمة في إنتاج المواد النانوية وتصنيعها بمختلف أنواعها فإن كل هذه الطرائق يمكن إدراجها تحت اثنين من الأساليب التقنية هما (1) تصغير حبيبات المادة – أي النزول بمقاييس أبعادها من الأعلى إلى الأسفل Top - Down Approach, (2) تجميع ذرات وجزيئات المادة – أي الصعود بمقاييس الأبعاد من الأسفل إلى الأعلى Bottom - Up Approach (الاسكندراني, 2010). ويحدث هذا بالطرائق الكيميائية وتشمل طريقة السول – جل وطريقة الترسيب البخاري بالطرق الكيميائية وطريقة الاختزال الكيميائي باستخدام المذيبات, أو بالطرق الفيزيائية وتشمل طريقة الطحن والتذرية بالليزر والتشجيع والتبخير والتكثيف, أو بالطرق الاحيائية ويستعمل فيها المنتجات الايضية للبكتريا أو الفطريات أو الفايروسات أو الطحالب أو المستخلصات النباتية (Ahmed et al., 2021).

أشار علوش (2020) إلى أن الطرائق الفيزيائية والكيميائية المستخدمة في تصنيع الدقائق النانوية تستغرق وقتاً طويلاً وتستخدم مواد ومذيبات قد يصعب التخلص منها وتبقى آثارها في البيئة إضافة إلى حاجتها إلى طاقة كبيرة, بينما الطرائق الاحيائية تمتاز بكونها صديقة للبيئة ولا تحتاج طاقة ورخيصة.

حظيت الدقائق النانوية بأهتمام الكثير من الباحثين نظراً لاتساع تطبيقاتها فهي تستخدم في مجالات الرعاية الصحية, الطب الحيوي مثل الأنشطة المضادة للفطريات والبكتريا والفايروسات وكمضادات للالتهابات وفي البصريات والالكترونيات إضافة الى استخدامها في تقنية إيصال الدواء الى الهدف (Jagessar, 2020). في الوقت الحاضر, تم تصميم أنظمة توصيل الادوية (Drug-Delivery) الجديدة ضمن المقياس النانوي التي تتميز بخصائص شكلية وكيميائية مختلفة التي تم اعتمادها لزيادة قابلية ذوبان الدواء واستدامته والتوافر الاحيائي ونفاذية الجهاز الهضمي (Rahman et al., 2020).

2.8.2: المركبات النانوية Nanocomposites

يشير مصطلح المركبات النانوية إلى المواد التي تتكون من أكثر من مادة و يكون أحد هذه المواد ذا ابعاد نانوية (0-D, 1-D , 2-D) وغالبا ماتستخدم في هذه الحالة أرضية من مواد نانوية معدنية أو بوليميرية أو سيراميكية (الساعدي, 2021), ونظرا لما تتمتع به المركبات من خصائص فريدة فقد أستخدمت في عدد من التطبيقات منها أنظمة الكشف المغناطيسية والكهروكيميائية, وأجهزة الاستشعار البصرية وفي معالجة المياه والأجهزة الطبية و استخدامها كأنظمة توصيل للدواء حيث تقوم بنقل جزيئات المادة الكيميائية الفعالة للدواء إلى الخلية المقصودة دون غيرها نقلا مباشرا وفي أقل فترة زمنية, كما استخدمت هذه المواد لمكافحة السرطان, ولعلاج داء السكري وأمراض القلب والاعوية الدموية إضافة الى تطبيقات أخرى (الاسكندراني, 2010; 2020, Ravindra *et al.*). شهدت السنوات القليلة الماضية استخدام هذه المركبات النانوية لا يصال المواد المضادة للحياة المجهرية سواء أكانت مضادات حيائية كيميائية أو مركبات فعالة مستخلصة من نباتات في هيئة كبسولات أو غرسات (implants) أو جزيئات نانوية دقيقة أو على نحو أقرص مستدامة الاطلاق (Mishra *et al.*, 2020).

وأشار (Rahman *et al.*, 2020) الى أن المركبات الفعالة الموجودة في المنتجات الطبيعية مثل النباتات تمتاز بضعف قابليتها الذوبانية وضعف استقرارها بسبب حموضة المعدة والقولون وضعف امتصاصها عبر جدار الأمعاء إضافة الى ضعف آلية التدفق النشط (active efflux), مما دعت الحاجة الى تطوير أنظمة نقل وتوصيل من خلال تحميل المستخلصات النباتية على الدقائق النانوية إذ إنها تقدم عددا من الفوائد منها (Afrin *et al.*, 2018):

- 1- إيصال مستخلص النبات الى الموقع الهدف مباشرة .
- 2- تحسين الكفاءة العلاجية من خلال زيادة الفعالية وتخفيض الكمية اللازمة.
- 3- تعزيز الاستقرارية.
- 4- تحسين الامتصاصية, التوزيع, والاستقلاب و الإخراج .
- 5- زيادة نسبة التوافر الاحيائي .

وقد أجريت دراسات متعددة في هذا المجال ومنها دراسة (Suganya *et al.*, 2011) الذي تمكن من تحميل مستخلص نبات الفرفار *Tecomella undulata* على polycaprolactone nanofiber materials واستخدمه لتثبيط نمو البكتريا المسببة لالتهابات الجلد, والسعيدي (2015) الذي تمكن من تحضير مضادين فطريين نانويين هجينين من النستاتين والكلوتريمازول واستخدامها لتثبيط نمو بعض أنواع المبيضات (*Candida spp.*), في حين حضر الجبوري (2016) مضادين نانويين هجينين باستخدام الفانكوميسين والسيروفلوكساسين وتحميلهما على طبقات ثنائية الهيدروكسيد وعلى أوكسيد الزنك على التوالي وتوصل الى كفاءتهما في تثبيط نمو

بكتريا *Staphylococcus aureus*, أما الفتلاوي (2021) فقد تمكن من تحميل المضاد الازثرومايسين على أكسيد المغنسيوم وأنتج مركب نانوي هجين فعال في تثبيط البكتريا المسببة لالتهابات المسالك التنفسية, في حين استطاع حميد (2021) من تحضير مركبات نانوية من مستخلص فطر المشروم وذلك بتحميله على أكسيد الزنك واطهر هذا المركب النانوي الهجين فعالية تثبيطية تجاه الفطرين الجلديين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis*.

3.8.2 : الحوامل النانوية Nanocarries

تمتاز الحوامل النانوية بخصائص فيزيوكيميائية وحيائية مثلى يمكن أن تستقبلها الخلايا بسهولة أكبر مقارنة بالجزيئات الأكبر منها وتشمل التوافق الحيوي (أي لها القابلية على الاندماج مع النظام البيولوجي دون ظهور أي تأثيرات سلبية أو إستجابة مناعية) وتكون غير سامة إضافة الى فعاليتها الحفزية وخصائصها الضوئية وخصائصها الالكترونية لذا فقد تم استخدامها بنجاح كأدوات توصيل للمركبات الفعالة (Ali et al., 2011a), كما أن طريقة ارتباط الدواء بالحامل واستراتيجية وصوله الى الهدف تعد الية مهمة جدا لاستخدامه في العلاج, فالعلاج يجب أن يدمص أو يرتبط تساهميا بسطح الحوامل النانوية أو يمكن أن يتغلف بداخله ويعد الارتباط التساهمي أفضل طرائق الارتباط إذ يمكن من خلاله السيطرة على كمية المركب العلاجي المتحررة, وحالما يصل المركب النانوي الهجين الى الهدف فإن المركب العلاجي يتحرر. وتتم السيطرة على تحرر الادوية من الحوامل النانوية من خلال تغير البيئة من ناحية درجة الحرارة والرقم الهيدروجيني و الازموزية أو بوساطة الفعالية الانزيمية (Wilczewska et al. 2012).

ومن أهم الحوامل النانوية التي تم استخدامها هي Liposome , Solid lipid et nanoparticles , Polymers , Carbon , Magnetic nanoperticles (Rahman

al.,2020), كما أستخدمت العديد من الدقائق النانوية الفلزية كأنظمة إيصال الدواء وشملت الذهب والنيكل والفضة وأوكسيد الزنك و أوكسيد التيتانيوم واكتسبت أهتماما كبيرا بالنظر الى إمكانية تحويل صفاتها من حيث الحجم والتوزيع والشكل مما أدى الى تغيير صفاتها الحفزية والالكترونية والضوئية (Bahrami et al., 2016). وأشار Mishra et al.(2020) الى وجود أنظمة توصيل حديثة استخدمت مع المركبات النباتية الفعالة أو العلاجات المصنعة لعلاج أمراض فطرية مختلفة, وهذه الأنظمة تم الإشارة الى بعضها في الجدول (2-4). وبين علوش (2020) أن زيادة اهتمام الباحثين باستخدام أوكسيد الزنك في المجال النانوي يرجع الى خصائصه المميزة التي تشمل الموصلية الجيدة, والاستقرار الكيميائي, وخصائصه الحفزية

وكذلك فعاليته المضادة للفطريات والبكتريا والفايروسات , كما وجد أنه يمتلك انتقائية في استهداف الخلايا السرطانية والميكروبية إضافة الى كونه غير سام . وقد استخدم هذا المركب في عدد من التطبيقات أهمها مادة مضافة (additive) لبعض المواد والمنتجات مثل السيراميك والزجاج والأسمنت والمطاط ومواد التشحيم والمواد اللاصقة والبلاستيك والأصباغ والبطاريات (Sabir et al. , 2014) . ونظراً لكون أكسيد الزنك من المواد المعروفة عموماً بكونها آمنة وفق مقاييس منظمة الغذاء والدواء الأمريكية , لذا فقد تم استخدامه مادة مضافة للأغذية وكذلك استخدامه مادة تدمج مع المواد المغلفة للأغذية مما يقلل من الحاجة إلى استخدام تراكيز عالية من مضادات الأحياء المجهرية المضافة بشكل مباشر إلى المنتجات الغذائية . (Espitia et al . 2012) كما تم استخدام هذا الأوكسيد حاملاً للأدوية (Drug carrier) وكمادة مضادة للأحياء المجهرية وفي بعض المنتجات الصيدلانية (Ashe, 2011).

جدول (2-4): بعض أنظمة توصيل المركبات النباتية الفعالة أو العلاجات المصنعة ذات الفعالية المضادة للفطريات (Mishra et al.,2020)

الفطريات المستهدفة	الحامل	الدواء أو المركب النباتي
<i>Candida albicans</i>	Microemulsion gel	Essential oil (<i>Bidens tripartite</i>)
Yeast spp.	Phytosome	Curcumin
<i>Trichophyton</i> spp.	Micelles	Clotrimazole, Econazole nitrate, Fluconazole
<i>Trichophyton rubrum</i>	Microemulsion	Amphotericin B
<i>Trichophyton</i> spp.	Microemulsion gel	Griseofulvin
<i>Aspergillus niger</i>	Niosomes	Terbinafine Hcl
<i>Trichophyton rubrum</i>	Transfersomes	Griseofulvin, Amphotericin B
<i>Candida</i> sp.	Ethosomes	Clotrimazole, Econazole

4.8.2 : تشخيص المواد النانوية

تتميز المواد النانوية بخواص فيزيائية وكيميائية تختلف تماماً عن المواد ذات الحجم الكبير التي لها التركيب الكيميائي نفسه , فعند خفض حجم الدقائق الى المقياس النانوي ، فإنه في أغلب الاحيان تتغير خصائص المادة الأساسية ; مما يؤدي الى الحصول على خواص جديدة و مختلفة تماماً عن الخواص القديمة عند حجم الدقائق الكبير (الحجم الغير نانوي) , مما يستلزم

تشخيص المواد النانوية الجديدة وهناك عدة أدوات وتقنيات تستخدم في هذا المجال وهي حسب ماأشار إليها الساعدي (2021) و Salem *et al.*(2022) تتضمن :

1.4.8.2 : التقنيات المجهرية Microscopy Techniques

يمكن إستخدام التقنيات المجهرية لدراسة مدى واسع من المواد و التوزيع الواسع لحجومها و تتضمن هذه التقنيات على سبيل المثال ، إستخدام المجاهر الضوئية optical Light Microscopes ، مجاهر الالكترن الماسح Scanning Electron Microscopes (SEM) ، ومجاهر الالكترن النافذ Microscopes Electron Transmission (TEM) ، ويتم إختيار الجهاز أو التقنية بصورة رئيسية بالاعتماد على مدى الحجم للدقائق وقوة التكبير والدقة أو درجة الوضوح المطلوبة (الساعدي ، 2021 ، و Salem *et al.*,2022) .

2.4.8.2 : التقنيات الطيفية Spectroscopy Techniques

تستخدم هذه التقنيات للحصول على معلومات تخص التركيب الكيميائي والبلوري للمواد النانوية ، ويتم إجراؤها بإحدى الطرائق المعروفة وتشمل Raman Spectroscopy ، Energy Dispersive X-ray Analyzer (EDAX) ، X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) ، Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) ، Nuclear Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS) ، Fourier Transform Infrared Spectroscopy ، Magnetic Resonance (NMR) ، UV-Visible Spectroscopy ، (FTIR) X-ray Diffraction (XRD) ، (Salem *et al.*,2022) .

3.4.8.2 : قياسات جهد زيتا Zeta Potential Measurements

وتستخدم لتحديد شحنة السطح للدقائق النانوية ، ويتم قياسه إما بطريقة استشراد التشتت الضوئي Light scattering Electrophoresis أو بالطريقة الكهروصوتية Electroacousto Phoresis (الساعدي ، 2021) .

3. المواد وطرائق العمل

1.3: المواد Materials

1.1.3: الأجهزة والمعدات المستعملة Equipments and Instruments

جدول (1.3): الأجهزة والمعدات المستعملة

الشركة المصنعه (المنشأ)	اسم الجهاز	ت
Binder (Germany)	الحاضنة (Incubator)	1
Denever (Germany)	ميزان حساس (Sensitive Balance)	2
GFL (Germany)	جهاز تقطير (Distiller)	3
Human (Germany)	ماصات دقيقة (Micropipettes)	4
Hettich(Germany)	جهاز نذب مركزي (Centrifuge)	5
Jewany (Germany)	مصباح بنزن (Bunsen burner)	6
Jeio – Tech(Korea)	كابينة تليفح (Laminar flow cabinet)	7
Huma scope premium (Germany)	مجهر ضوئي مركب (Compound microscope)	8
LabTech (Korea)	المؤصدة (Autoclave)	9
Memmert (Germany)	حمام مائي (Water bath)	10
Hedoiph (Germany)	هزاز كهربائي (Vortex)	11
Boeco(Germany)	أدوات زجاجية مختلفة (Laboratory glassware)	12
LabTech (Korea)	جهاز مزج الصفيحة الساخنة (Magneti stirrer) (with hot plate)	13
LG (Korea)	ثلاجة (Refrigerator)	14
LabTech (Korea)	حاضنة هزازة (Shaker incubator)	15
Perkin Elmer 1725x (Japan)	مطياف الأشعة تحت الحمراء Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR)	16
Shemadzu XRD -6000 powder diffractometer(Japan)	مطياف حيود الأشعة السينية (XRy) diffraction	17
Biomeriux (France)	جهاز قياس الكثافة (Dens Chake Plus)	18
Biomeriux (France)	جهاز الفايترك (Vitek2 system)	19
Euro EA 3000	جهاز تحليل العناصر الدقيق (Elemental Analyzer)	20
Apelex (France)	حوض الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) (tank)	21

Binder (Germany)	فرن كهربائي (Electric oven)	22
Taiwan (Extrage)	انابيب ابندروف (Eppendorf tubes)	23
CYAN- Cypress(Belgium)	Micropipette ملاحق خاصة بالماصات الدقيقة (tips)	24
Techne Tc 300(UK)	جهاز الدورات الحراري (Thermocycler)	25
Oxford (USA)	مجهر القوة الذرية (Atomic Force Microscopy)	26
National (Japan)	محرك مغناطيسي (Magnetic stirrer)	27
Gilson (France)	مدقة بلاستيكية (Micro pestles)	28
Aplex(France)	جهاز الاشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet Analyzer)	29
Ahlstorm(USA)	أوراق ترشيح احجام مختلفة (Filter paper different size)	30
Nuva (Germany)	جهاز الطرد المركزي الدقيق (Eppendorf centrifuge)	31
Electrothermal (England)	سكسوليت (Soxhlet)	32
Moulix (France)	مطحنة كهربائية (Electric grinder)	33
	ثاقب فليني قطر 7 ملم (Cork borer)	34
China	اطباق بتري (Petri dish)	35
CE	مسحات قطنيه مع وسط زرع ناقلي (Transport media swabs)	36
LOT.	مسحات معقمة (Steril swab)	37
Fluka(Switzerland)	صفائح كروتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	38
Knauer (Germany)	جهاز كروموتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC)	39
Knauer(Germany)	جهاز كروموتوغرافيا السائل عالية الأداء التحليلي	40
(Japan)	مضخة تفريغ Vaccum pump	41
Angstrom Advanced Inc.(USA)	المجهر الاليكتروني الماسح (Scanning Electron Microscopy)	42
Citotest Labware .(China)	اطباق معايرة دقيقة (Microtiter plates)	43
Gallenkamp(England)	Sterile syringe filtetr	44

2.1.3: المواد الكيميائية والاحيائية Chemical & Biological materials

جدول (2.3):المواد الكيميائية والاحيائية المستعملة

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم المادة	ت
BDH(England)	صبغة اللاكتوفينول – القطن الأزرق (Lactophenol cotton blue)	1
Pharmachem Biotech (India)	المضاد الحيوي (Amoxicillin)	2
Bangalore pharmaceutical & research laboratory pvt.ltd	المضاد الحيوي الامفوتيريسين B (B)	3
مصرف الدم / كربلاء	مصل دم انسان	4
Fluka (Germany)	توين 80 (Tween 80)	5
BDH(England)	كليسيرول (Glycerol)	6
Alpha Chemika (India)	مسحوق السليكا (Silica gel 60-120 mesh)	7
Fluka (Germany)	أوكسيد الزنك النانوي (ZnO nanoparticles)	8
Loba Chemie(India)	ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO)	9
CDH Bioscience(India)	اكاروز (Agarose)	10
QIAGEN (Germany)	البادئات (Primers)	11
BDH(England)	بروميد البوتاسيوم (KBr)	12
Sigma (USA)	بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromid)	13
Bio world(USA)	TBE buffer 10x	14
Bio World (USA)	ايتانول (Ethanol)	15
BDH(England)	هكسان (Hexane)	16
Fluka(Switzerland)	كلوروفورم (Chlorophorm)	17
Fluka(Switzerland)	اثيل اسيتيت (Ethy acetate)	18
Fluka(Switzerland)	ميثانول (Methanol)	19
Difco(USA)	خلات الرصاص (Lead subacetate)	20
Difco(USA)	اليود (Iodine)	21
Griffin (England)	يوريد البوتاسيوم (Potassium Iodide)	22
BDH(England)	كلوريد الحديدك (Ferric chloride)	23
BDH(England)	حامض الكبريتك (Sulfuric acid)	24
Carlo(SPA)	بلورات الفينول (Phenol crystallin)	25
BDH(England)	سترات الصوديوم (Sodium citrate)	26
Fluka(Switzerland)	كربونات الصوديوم المائية (Sodium Hydroxide) (Carbonate)	27
BDH(England)	كبريتات النحاسك (Sulfate Copper II)	28
BDH(England)	حامض الهيدروكلوريك (Hydrochloric acid)	29

Chem Faces (China)	Standard Caffeic (الكافيك القياسي) (acid)	30
Chem Faces (China)	Standard Ferulic (الفيروليك القياسي) (acid)	31
Chem Faces (China)	Standard (الكمفيرول القياسي) (Kampherol acid)	32
Himedia (India)	McFarlands (مكفرلاند القياسي) 0.5 (Standard solution 0.5)	33
Sigma-Aldrich(Germany).	Trifluoroacetic acid	34
Sigma-Aldrich(Germany).	Acetonitrile	35
Sigma-Aldrich(Germany).	Acetic acid	36
BDH(England)	Vanillin	37

3.1.3: الأوساط الزرعية Culture media

استعملت الأوساط الزرعية الجاهزة المبينة في الجدول (3.3) لغرض عزل المبيضات وتشخيصها واختبار فعالية المركبات المحضرة تجاهها.

جدول (3.3): الأوساط الزرعية الجاهزة والشركة المصنعة لها

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم الوسط الزرع	ت
Himedia(India)	Sabouraud dextrose (اكاز السابرويد دكستروز) (agar)	1
Oxoid(England)	كارطحين الذرة (Corn meal agar)	2
Himedia(India)	HiCrome™ Candida Differential Agar	3
Oxoid(England)	مرق السابرويد دكستروز السائل (Sabouraud dextrose broth)	4

4.1.3: العدد المستعملة في تشخيص أنواع المبيضات

جدول (4.3): العدد المستعملة في تشخيص أنواع المبيضات

الشركة المصنعة (المنشأ)	اسم العدة	ت
Biomeriux (France)	Vitek 2 YST	1
Biomeriux (France)	Vitek 2AST-YS08	2
Qiagen(Germany)	DNeasy Plant Kit	3

5.1.3: المواد المستخدمة في تقنية تفاعل سلسلة البلمرة PCR

أولاً : عدة استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA (جدول 5.3).

جدول (5.3): المواد المتوفرة في عدة استخلاص DNA (DNeasy Plant Kit)

الشركة المصنعه (المنشأ)	المادة	ت
Qiagen (Germany)	Cell lysis solution (API)	1
	Proteins and Carbohydrate removal buffer(P3)	2
	Purification buffers (AW)	3
	Elution buffer (TE)	4

ثانياً : البوادىء المستخدمة في تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

جهزت البوادىء الخاصة بمنطقة Small Sub Unit rRNA (SSU) للجين 18S

rRNA بالاعتماد على ما ذكره White *et al.* (1990) وكما مبين في الجدول (6.3).

جدول (6.3): البوادىء المستخدمة في تفاعل البلمرة المتسلسل

المصدر	اسم البادىء	تتابع البادىء		نتاج تفاعل PCR(bp)
		5´	3´	
(White <i>et al.</i> , 1990)	NSI	F	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	-1624 1656
	NS8	R	TCC GCA GGT TCA CCT ACG GA	

ثالثاً : عدة فحص تفاعل البلمرة المتسلسل وهي Ready To Go PCR Beads

جدول (7.3): مكونات عدة Ready To Go PCR Beads

الشركة المصنعة (المنشأ)	المكونات
	2.5 units of PuRE Taq DNA polymerase
	10mM Tris HCl(PH9)

GE Healthcare Life Sciences UK	50 mM KCL
	1.5 mM MgCl ₂
	200µM of each dNTPs, stabilizers, and BSA

2.3: طرائق العمل

1.2.3: تحضير المحاليل والكواشف Solution and Reagents

1.1.2.3: المحلول الملحي الفسلجي 0.85%

حضر هذا المحلول حسب طريقة Macfadden (2000) بإذابة 8.5 غرام من كلوريد الصوديوم في 1000 مل ماء مقطر و عقم المحلول بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121 م وضغط جوي 15 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة وحفظ بعدها في الثلاجة لحين الاستخدام اذ استخدم لتحضير عالق الخميرة والتخافيف.

2.1.2.3: محلول مضاد الاموكسيسيلين Amoxicillin solution

حضر هذا المحلول بإذابة 250 ملغرام من مسحوق المضاد في 1000 مل ماء مقطر معقم وتم تعقيمه باستعمال مرشحات Sterile syringe filter ذات قطر 0.22 مايكروميتر واضيف الى الوسط لمنع نمو البكتريا (سرحان, 2012).

3.1.2.3 : كاشف واكنر Wagner reagent

تم تحضير هذا الكاشف بإذابة 1.3 غرام من اليود I₂ مع 2 غرام من ايوديد البوتاسيوم (KI) في 100 مل ماء مقطر واستعمل للكشف عن القلويدات (شوكت وأخرو ن, 2012).

4.1.2.3: كاشف كلوريد الحديدك Ferric Chloride reagent

حضر هذا الكاشف حسب ما ذكره Harborne (1984) للكشف عن وجود الفينولات في عينة النبات , وذلك بإذابة 1 غرام من كلوريد الحديدك FeCl₃ في 100 مل ماء مقطر ثم اضيفت 3 مل من الكاشف لكل 3 مل من المستخلص المائي او الكحولي كلا على انفراد , وظهور راسب اخضر مزرق دليل على وجود الفينولات .

5.1.2.3 : كاشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز Phenol and

Sulfuric acid reagent

استعمل هذا الكاشف لغرض التحري عن وجود الكربوهيدرات في عينة الدراسة وحضر بإذابة 25 غرام من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر (Jabir et al., 2017).

6.1.2.3 : كاشف بندكت Benedict reagent

اتبعت طريقة الشخلي وجماعته (1993) في تحضير هذا الكاشف وذلك بإذابة 137 غرام من سترات الصوديوم و100 غرام من كاربونات الصوديوم المائية في 800 مل من الماء المقطر، رشح المحلول واضيف اليه محلول كبريتات النحاسيك (17.3 غرام في 100 مل ماء مقطر) ثم اكمل الحجم الى 1000 مل باستعمال ماء مقطر واستعمل للكشف عن الكلايكوسيدات.

7.1.2.3 : كاشف الفانيلين Vanillin reagent

حضر هذا الكاشف بإذابة 0.5 غرام من الفانيلين في 85 مل كحول الميثانول وإضيف اليه 10 مل من حامض الخليك و5 مل حامض الكبريتيك واستعمل لرش صفيحة كروموتوكرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) للكشف عن المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص النباتي (Masoko & David, 2015).

2.2.3: تحضير الاوساط الزرعية Culture media**1.2.2.3: وسط اكار السابرويد دكستروز مع الاموكسيلين****Sabouraud Dextrose Agar with Amoxicillin**

حضر هذا الوسط بإذابة 65 غرام من مسحوق اكار السابرويد دكستروز وحسب تعليمات الشركة المجهزة في 1000 مل ماء مقطر ثم رج جيدا وسخن حتى الغليان ثم عقم بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121م° وضغط جوي 15 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة و ترك ليبرد الى درجة 45 م° بعدها اضيف اليه محلول المضاد البكتيري الاموكسيلين (المحضر في فقرة 2.1.2.3) بنسبة 1مل من محلول المضاد لكل 10 مل من الوسط الزرعى لمنع نمو البكتريا (سرحان , 2012).

2.2.2.3 : وسط السابرويد السائل Sabouraud Broth Medium

تم تحضير وسط السابرويد السائل حسب تعليمات الشركة المصنعة بأذابة 30 غرام من الوسط في 1000 مل ماء مقطر وعقم بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121م° وضغط جوي 15 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم اضيف اليه محلول الاموكسيلين (المحضر في فقرة 2.1.2.3) بنسبة 1مل من محلول المضاد لكل 10 مل من الوسط الزرعى لمنع نمو البكتريا

واستخدم الوسط لحفظ العزلات الدائمة وفي اختبار تحديد التركيز المثبط الأدنى (سرحان , 2012).

3.2.2.3 : وسط اكار طحين الذرة مع توين 80

Corn meal agar with Tween 80

حضر هذا الوسط بأذابة 17 غرام من مسحوق اكار طحين الذرة وحسب تعليمات الشركة المجهزة في 1000 مل ماء مقطر واضيف اليه 10 مل توين 80 وعقم بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121 م° وضغط جوي 15 باوند / انج² ولمدة 15 دقيقة وترك ليبرد ثم اضيف اليه محلول الاموكسيلين (المحضر في فقرة 2.1.2.3) بنسبة 1مل من محلول المضاد لكل 10 مل من الوسط الزراعي واستخدم لاختبار قابلية المبيضات على انتاج الخيوط الكاذبة والابواغ الكلاميدية والابواغ البرعمية (Forbes et al ., 1998).

4.2.2.3: وسط HiCrome™ Candida Differential Agar

تم تحضير الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة بأذابة 42.72 غرام من مسحوق الوسط الزراعي في 1000 مل ماء مقطر معقم ثم غلي الوسط على لهب مصباح بنزن حتى يذوب الوسط تماما و اضيف اليه محلول مضاد الاموكسيلين (المحضر في فقرة 2.1.2.3) لمنع نمو البكتريا (Zafar et al. ,2017).

3.2.3: جمع العينات المرضية Pathogenic specimens collection

جمعت 83 مسحة فموية من 83 مريضا مصابين بداء المبيضات الفموي بعد التشخيص السريري من قبل الطبيب المختص , وكانوا من المراجعين الى مستشفى الأطفال التعليمي والمركز التخصصي لطب الاسنان في محافظة كربلاء المقدسة ومن كلا الجنسين وباعمار تراوحت ما بين 6 أيام – 10 سنوات , لمدة أربعة اشهر امتدت من 2 / 1 / 2021 ولغاية 2 / 5 / 2021 واستعملت المسحات القطنية الحاوية على الوسط الناقل لجمع العينات .

1.3.2.3: الزراعة والعزل

زرعت عينات الدراسة مباشرة بطريقة التخطيط على وسط اكار السابرويد دكستروز المضاف اليه الاموكسيلين وبواقع مكررين لكل عينة ثم حضنت الاطباق بدرجة 37 م° لمدة 24-48 ساعة وبعدها تم الاطلاع على النموات الفطرية وتشخيصها (سرحان , 2012).

2.3.2.3: التشخيص Identification

1.2.3.2.3: الفحص المظهري للمستعمرات**Colony morphology examination**

بعد ظهور النمو الفطري على سطح وسط Sabouraud dextrose agar المضاف اليه الاموكسسلين ,فحص المظهر الخارجي للمستعمرات النامية والمتضمن شكل المستعمرات ولونها وقطرها وارتفاعها (Zafar *et al* ., 2017; الخفاجي والمعموري , 2019 ; Bhargava, 2019).

2.2.3.2.3 : الفحص المجهرى Microscopic examination

تم اخذ كمية من النمو الفطري ونقلت الى شريحة زجاجية تحتوي على قطرة من صبغة اللاكتوفينول الزرقاء وغطيت بغطاء الشريحة وفحصت تحت المجهر تحت القوة الكبرى X40 لملاحظة شكل الخلايا وحجمها والبراعم (Zafar *et al* ., 2017; الخفاجي والمعموري , 2019 ; Bhargava, 2019).

3.2.3.2.3 : التشخيص بوساطة الاختبارات الكيميائية والحياتية والفسلجية**Physiological and biochemical tests****أولاً- اختبار تكوين الانبوب الجرثومي Germ tube test**

اجري هذا الاختبار باستخدام مصلى دم الانسان وبمعدل مكررين لكل عزلة وذلك بوضع 1مليتر من المصل في انبوبة اختبار ولقحت بمستعمرة نقية من الخميرة وحضنت بدرجة 37 م لمدة 3-4 ساعات بعد ذلك اخذت قطرة من العالق ووضعت على شريحة زجاجية وفحصت مجهريا لمشاهدة الانبوب الجرثومي الذي يبرز من احد جوانب الخلية بشكل برعم ويكون أطول من الخلية الام بثلاث الى اربع مرات ويستخدم هذا الاختبار لتمييز *C.albicans* , *C.dubliniesis* (Phargava , 2019).

ثانياً-اختبار تكوين الابواغ الكلاميدية والخيوط الكاذبة**Chlamyospores and pseudohyphae formation test**

اتبعت طريقة دالمو (Dalmau) الواردة في (Forbes *et al*., 1998) لاجراء هذا الاختبار الذي استعمل للتمييز بين أنواع المبيضات المعزولة على أساس قدرتها على انتاج الابواغ

الكلاميدية و/أو الخيوط الكاذبة وذلك بنقل جزء من مستعمرة الخميرة وتنميتها على وسط اكارطحين الذرة المضاف اليه التوين 80 حيث زرعت الخميرة بعمل ثلاثة خطوط متوازية داخل الوسط الزراعي وغطيت بغطاء الشريحة ثم حضنت الاطباق بدرجة 28 م° لمدة 24-48 ساعة , بعد ذلك رفع غطاء الشريحة ووضع على شريحة نظيفة تحتوي على صبغة اللاكتوفينول وفحصت مجهرياً لمشاهدة الابواغ الكلاميدية والبرعمية والخيوط الفطرية الكاذبة.

ثالثاً- اختبار قابلية النمو بدرجة 45 م° .

استعمل هذا الاختبار لتمييز المبيضات البيضاء وباقي أنواع المبيضات وذلك بتنمية الخمائر على وسط اكار السابرويد دكستروز المضاف اليه الاموكسلين تحت درجة 45 م° ولمدة 24-48 ساعة اذ ان ظهور النمو بعد ذلك يشير الى وجود خميرة المبيضات البيضاء (Pinjon *et al.*, 1998).

رابعاً-التشخيص باستعمال وسط HiCrome Candida Differential Agar

إجري هذا الاختبار بتخطيط الخميرة على وسط HiCrome™ Candida Differential Agar وحضنت الاطباق بدرجة 37 م° ولمدة 48 ساعة . يستعمل هذا الاختبار للتمييز بين أنواع المبيضات على أساس لون المستعمرة الذي تنتجه على هذا الوسط واعتمادا على تعليمات الشركة المصنعة المجهزة للوسط (Zafar *et al.* , 2017).

خامساً- التشخيص باستعمال جهاز الفايترك

Identification by Vitek2 system

إجري هذا الاختبار باستعمال جهاز الفايترك المجهز من شركة biomerieux france في مختبر النقاء في محافظة كربلاء وهو نظام تشخيصي الي بالكامل يستعمل في تشخيص الخمائر المرضية باستخدام بطاقة Vitek 2 YST اذ يستند نظام التشخيص بشكل رئيسي على التفاعلات الكيميائية الحياتية . تحتوي هذه البطاقة على 46 اختباراً كيميائياً حيويّاً بعضها يقيس استهلاك الكربون وبعضها الاخر يقيس استهلاك النايتروجين إضافة الى الفعاليات الانزيمية وتكون موزعه على 64 حفرة وتكون ذات اوزان محددة وبتابع تعليمات الشركة المصنعة إجري التشخيص حسب الخطوات الاتية :

1- تم تنمية عزلات المبيضات على وسط السابرويد دكستروز اكار المضاف اليه الاموكسلين وحضنها بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .

2- حضر عالق من المزروع الجرثومي وذلك بنقل اربع الى خمس مستعمرات الى انابيب اختبار تحتوي 3 مل محلول ملحي فسلجي معقم وضبطت عكارة عالق النمو اذ يجب ان تتراوح ما بين 1.8 - 2.2, وذلك باستخدام جهاز Densi chek الخاص بجهاز الفايترك .

3- ثبتت الانابيب الحاوية على العالق بالحامل الخاص بالجهاز وتوضع بطاقات التشخيص (YST cards) المزودة بالانابيب الناقلة لغرض إدخالها يدويا في حجرة الجهاز.

4- حضنت الانابيب لمدة 12- 18 ساعة وتقرأ النتائج تلقائيا من قبل الجهاز وتعطى بشكل تقرير لكل عينه. وتم تحديد نوع الخميرة من خلال مقارنة خارطة اختباراته بالصفات التشخيصية المخزونه بالجهاز فيعطى لكل كائن نسبة احتمالية ومستوى ثقة فاذا ماكانت نسبة الاحتمالية 96-99% فان مستوى الثقة ممتاز, 93- 95 مستوى الثقة جيد جدا, 89-92 مستوى الثقة جيد, 85-88 مستوى الثقة مقبول واقل من هذه النسبة يكون مستوى الثقة ضعيف (Berkow *et al.*, 2020 ; Doligez , 2017; Melhim *et al.*, 2014).

4.2.3.2.3:التشخيص الجزيئي لعزلات المبيضات

Molecular identification

اجري فحص PCR لغرض تأكيد التشخيص المظهري والمجهري والكيميائي الحياتي والفسلجي لانواع المبيضات المعزولة من حالات داء المبيضات الفموي, اذ تم انتخاب عزلة واحدة من كل نوع لتشخيصها جزيئيا وحسب طريقة (Gherbawy and Voigt (2010) وكما يأتي :

1-تنمية عزلات المبيضات

تم تنشيط عزلات المبيضات وذلك بزراعتها على وسط اكار السابرويد المضاف اليه الاموكسسلين وحضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 م° ولمدة 24-48 ساعة .

2- استخلاص وتنقية الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA

أجريت عملية استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين وتنقيته من مستعمرات الفطر النامية باستخدام العدة DNeasy Plant Kit المجهزة من شركة QIAGEN الألمانية باتباع الخطوات الاتية :

أ-أخذت عينة مليء الناقل من مستعمرات الفطر النقية ونقلت الى انبوبة Eppendorf سعة 1.5 مل واضيف اليها 400 مايكروليتر من المحلول الدارىء AP1) cell lysis) وسحقت العينة باستخدام مدقة بلاستيكية صغيرة مع رج العينة مرات متكررة باستخدام جهاز المازج للتأكد من سحق العينة بصورة جيدة.

ب-حضنت الانبوبة في حمام مائي بدرجة حرارة 65م ° لمدة 10 دقائق مع رج الانبوبة يدويا ل2-3 مرات لغرض تحليل الخلايا الفطرية .

ج-اضيف 130 مايكوليتر من المحلول (P3) Proteins and Carbohydrate rempval buffer الى الانبوبة الحاوية على الخليط ثم مزجت المحتويات جيدا باستخدام الجهاز المازج وحضنت بعدها لمدة 5 دقائق على الثلج لغرض ترسيب المنظفات الخاصة بالمحاليل الدائرية والبروتينات والسكريات المتعددة للخلايا الفطرية .

د-أجريت عملية طرد مركزي للانبوبة بسرعة 14000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ونقل المحلول الطافي الى انبوبة من نوع QIAshredder Minispin column ذات اللون الارجواني وأجريت لها عملية طرد مركزي بالسرعة نفسها أعلاه ولمدة دقيقتين اذ يعمل مرشح هذه الانبوبة على إزالة معظم الراوسب وحطام الخلايا الفطرية .

ذ- نقل الراشح الى انبوبة اختبار سعة 2مل واضيف اليها 700 مايكروليتر من المحلول (AW1) Purification buffer ومزجت المحتويات بوساطة الماصة الصغيرة . بعدها نقل 650 مايكروليتر من الخليط بوساطة ماصة صغيرة الى انبوبة من نوع DNeasy Minispin column ذات اللون الأبيض التي تحتوي مرشح خاص لتنقية الDNA وأجريت لها عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة ,تم التخلص من الراشح .

ه- اضيف 500 مايكروليتر من المحلول AW2 الى الانبوبة وأجريت عملية طرد مركزي لها بسرعة 8000دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة وتم التخلص من الراشح ثم اضيف للانبوبة نفسها 500 مايكروليتر من المحلول AW2 وأجريت لها عملية طرد مركزي بسرعة 14000 دورة /دقيقة لمدة دقيقتين وتم التخلص من الراشح أيضا .وأجريت هذه الخطوة لغرض تنقية الحامض النووي العالق بالمرشح .

و- وضعت انبوبة DNeasy Minispin column بداخل انبوبة ابندروف سعة 2مل واضيف اليها مباشرة 100 مايكروليتر من محلول TE (Elution Buffer) وحضنت لمدة 5 دقائق

بدرجة حرارة الغرفة ثم أجريت عملية طرد مركزي بسرعة 8000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة للحصول على الراشح الذي يحتوي الـ DNA الكامل ثم حفظت الانبوبة تحت درجة حرارة -20م لحين الاستخدام.

3- تفاعل (PCR) Polymerase Chain Reaction

أ- تحضير محلول الباديء الخزين

استعملت البرايمرات التي جهزت من قبل شركة QIAGEN الألمانية والموضحة في جدول (6.3) وحضرت حسب تعليمات الشركة المجهزة للحصول على تركيز نهائي 100 Picomol/μl وحضر محلول العمل لكل باديء باخذ 10 مايكروليتر من المحلول الخزين كلا على انفراد واضيف اليه 90 مايكروليتر ماء لايوني للحصول على تركيز 100 Picomol/μl .

ب- تحضير عدة Ready To Go PCR Beads

اجري اختبار PCR باستخدام عدة Ready To Go PCR Beads المجهزة من شركة GE Healthcare البريطانية (جدول 7.3) وكان الحجم النهائي للتفاعل 25 مايكروليتر , اذاضيف لكل انبوبة 2 مايكروليتر DNA , 1 مايكروليتر من الباديء الامامي و1 مايكروليتر من الباديء الخلفي ويكمل الحجم الى 25 مايكروليتر بإضافة الماء المزال الايونات.

ج- ظروف تفاعل البلمرة

تمت مضاعفة الحامض النووي DNA للفطريات المعزولة باستخدام الخطوات المبينة في جدول (8-3).

جدول (8-3): ظروف تفاعل PCR

عدد الدورات	درجة الحرارة (°م)	الوقت	عدد الدورات
1	95	5 دقائق	مسخ اولي Initial Denaturation
35	95	40 ثانية	مسخ نهائي Final Denaturation
	55	40 ثانية	ارتباط البوادىء Annealing
	72	1 دقيقة	استطالة اولية Initial Extention

1	72	5 دقيقة	Final Extension استطالة نهائية
---	----	---------	--------------------------------

د- تحضير هلام الاكاروز

حضر هلام الاكاروز باذابة 1.5 غرام في 100 مل من المحلول الداري 10xTBE (المحضر بإضافة 90 مل من الماء المقطر المعقم لكل 10 مل من محلول TBE) ومزج الى حين تكون محلول رائق ثم اضيف 5 مايكروليتر من محلول صبغة بروميد الاثيديوم بعد انخفاض درجة حرارة المحلول ال 40-45 م . جهز القالب الخاص بصب هلام الاكاروز والحاوي على مشط لعمل حفر داخل طبقة الاكاروز ,بعدها صب الاكاروز المذاب والحاوي على الصبغة وترك بدرجة حرارة الغرفة ليتصلب ورفع المشط ووضع القالب في حوض الترحيل لاجراء عملية الترحيل الكهربائي (Sandbrook and Russell,2001) .

ه- الكشف عن نواتج التضاعف

تم الكشف عن نواتج التضاعف بتحميل 5 مايكروليتر من من الحامض النووي المضاعف الى كل حفرة من حفر طبقة هلام الاكاروز كما تم إضافة 5 مايكروليتر من الدليل الحجمي (2000 bp DNA ladder) الى الجانب الايسر من العينات المضاعفة بهدف تحديد احجام الحامض النووي المضاعف . وأجري الترحيل الكهربائي للعينات وفحصت نتائج التفاعل تحت الاشعه فوق البنفسجية .

و- تحليل نتائج القواعد النايتروجينية للحامض النووي المضاعف من الفطريات المعزولة

أرسلت نواتج تضاعف الحامض النووي المعزولة من تفاعل ال PCR الى شركة Macrogen الكورية الجنوبية لغرض تحديد تسلسل القواعد النايتروجينية وحللت التسلسلات النايتروجينية باستعمال برنامج (BLAST) Basic Local Alignment Search Tool لمعرفة التشابه بين الفطريات المدروسة والفطريات المسجلة عالميا وتم مقارنتها مع البيانات المسجلة في Gen Bank التابع للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (National Center For Biotechnology Information) (العابدي واخرون, 2018) .

3.3.2.3: فحص حساسية العزلات تجاه المضادات الحياتية

اجري هذا الاختبار باستخدام نظام الفايترك حسب تعليمات الشركة المجهزة بوساطة بطاقة
 Vitek 2AST-YS08 التي تحتوي على ستة أنواع من المضادات الحياتية وهي
 Fluconazole , Flucytosine, Caspufungin , Amphotericin B , Micafungin ,
 Voriconazole , كل مضاد مجهز بأربعة تراكيز عدا Fluconazole الذي يكون مجهز
 بستة تراكيز إضافة الى وجود حفر تحتوي على وسط زرعي فقط ويعد معاملة سيطرة , وتكون
 موزعة على 64 حفرة ويعمل الجهاز على تسجيل التغيرات الحاصلة في العكورة بعد النمو
 الخميري .اتبعت الخطوات نفسها التي ذكرت في فقرة (3.2.3.2.3 خامسا) وبعد انتهاء فترة
 الحضانة التي تستغرق في فحص المضادات ما بين 12-27 ساعة, تعطى النتيجة بشكل تقرير فيه
 أسماء المضادات وحساسية الفطر تجاه كل نوع منها هل هي حساسة ,مقاومة او متوسطة
 الحساسية كما تذكر فيه قيمة التركيز المثبط الأدنى لكل مضاد.

4.3.2.3: حفظ عزلات المبيضات Preservation Of Candida Isolates

1- حفظ قصير الأمد Short term storage

أجريت هذه الطريقة بتنمية عزلات المبيضات المعزولة (بعمر 24 ساعة) في انابيب
 اختبار تحتوي وسط اكار السابرويد المضاف اليه الاموكسولين المصبوب بشكل مائل وتم حضان
 الانابيب بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ثم حفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° ويتم تجديد
 المزارع كل شهر (Kwon Chung and Bennet, 1992).

2- حفظ طويل الأمد Long term storage

استعمل وسط السابرويد السائل المضاف اليه الاموكسولين والحاوي على 15% من
 الكليسيرونل, وزع الوسط بعد تعقيمه بالمؤصدة في انابيب اختبار وبعدها لقت كل انبوبة
 بمستعمرة واحدة من كل عذلة (بعمر 24 ساعة) وحضنت الانابيب بدرجة 37 م° لمدة 18
 ساعة ثم حفظت العينات في الثلاجة تحت درجة -20 م° ولمدة تصل الى 6 أشهر (Kwon
 Chung and Bennet, 1992).

4.2.3 : جمع عينات نبات الميريمية وتشخيصها وتحضيرها

Collection and Diagnosis Preparation of *S.officinalis*

1.4.2.3: جمع عينات النبات

جمعت أوراق نبات الميريمية المراد دراسة فعاليتها التثبيطية ضد أنواع المبيصات المعزولة , من الأسواق المحلية المنتشرة في محافظة كربلاء المقدسة وشخصت من قبل د.خنساء عبد العالي شهيد اختصاص تصنيف نبات التدريس في كلية العلوم /جامعة كربلاء , وتم التخلص من الاتربة والشوائب العالقة بها وجففت باستعمال الفرن بدرجة حرارة 45 م° للتأكد من جفافها تماما وثبات الوزن . ثم جمعت الأوراق الجافة وطحنت باستخدام مطحنة كهربائية وحولت الى مسحوق ناعم وحفظ المسحوق في علب زجاجية معقمة في الثلاجة بدرجة 4 م° لحين استعمالها(الغزالي, 2008).

2.4.2.3: تحضير مستخلص نبات الميريمية

تم تحضير المستخلص المائي باستعمال الماء المقطر والمستخلص الكحولي بأستعمال كحول الايثانول المطلق , لاوراق نبات الميريمية حسب طريقة تركي وأخرون (2019) باستخدام جهاز السكسوليت وذلك بأخذ 40 غرام من مسحوق النبات الجاف ووضع في كشتبان (Thimble) الجهاز واضيف 400 مل من الماء و كحول الايثانول كلا على أنفراد ولمدة 16-20 ساعة بدرجة حرارة 40-45 م° , بحيث أصبحت العينة عديمة اللون .رشح بعدها المستخلص بمرشحات غشائية وجففت باستعمال الفرن وحفظ المستخلص الجاف في الثلاجة بدرجة 4 م° لحين الاستعمال.

3.4.2.3:الكشف النوعي عن المركبات الكيميائية الفعالة في أوراق نبات الميريمية

1-الكشف عن الصابونين Saponin

اجري هذا الاختبار كما ورد في شوكت وأخرون (2012) بوضع كمية من المستخلص الكحولي او المائي للنبات في أنبوبة زجاجية وترج بشدة , وعند ظهور رغوة كثيفة فوق سطح المستخلص وبقائها وثباتها لبضع دقائق فان النتيجة تعد موجبة وهذا يشير الى وجود الصابونين .

2-الكشف عن التانينات Tannins

اتبعت طريقة (Ahmed et al. (1998) في الكشف عن التانينات وذلك بإضافة عدة قطرات من محلول خلات الرصاص 1% الى 0.5 مل من المستخلص الكحولي او المائي للنبات , اذ ان ظهور راسب ابيض هلامي القوام يعد دليلا على وجود التانينات .

3-الكشف عن القلويدات Alkaloids

اجري الاختبار باستخدام كاشف واكنر Wagner reagent المحضر في الفقرة 3.1.2.3 , بأضافة 1-2 مل من الكاشف إلى 5 مل من المستخلص المائي او الكحولي , ويشير ظهور راسب بني على وجود القلويدات (شوكت وأخرون , 2012) .

4-الكشف عن الفينولات

استعمل كاشف كلوريد الحديدك المحضر في الفقرة 4.1.2.3 للكشف عن وجود الفينولات في عينة النبات , اضيف 3 مليلتر من الكاشف لكل 3 مليلتر من المستخلص المائي او الكحولي كلا على انفراد , اذ أن ظهور راسب اخضر مزرق دليل على وجود الفينولات (Harborne , 1984) .

5-الكشف عن الكاربوهيدرات

لغرض التحري عن وجود الكاربوهيدرات في عينة الدراسة استعمل كاشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركز , اذ تم اضافة 0.5 مل من كاشف الفينول المحضر في الفقرة 5.1.2.3 الى 0.5 مل من المستخلص المائي او الكحولي كلا على انفراد , ثم رجت جيداً وأضيف اليها 2.5 مليلتر من حامض الكبريتيك المركز , حيث يدل ظهور اللون الأحمر البني على وجود الكربوهيدرات في مستخلص النبات (Jabir et al.,2017) .

6-الكشف عن الكلايكوسيدات

اتبعت طريقة الشبخلي وجماعته (1993) في الكشف عن وجود الكلايكوسيدات وذلك بوضع 1 مليلتر من المستخلص (مائي او كحولي) في انبوبة اختبار واطيف اليها 2 مليلتر من كاشف بندكت (المحضر في الفقرة 6.1.2.3) ثم أكمل الحجم الى 1000 مل باستخدام ماء مقطرونقلت الى حمام مائي مغلي لمدة 5 دقائق بعدها تركت لتبرد, إن ظهور الراسب الأحمر يدل على وجود الكلايكوسيدات .

7-الكشف عن الراتنجات

اجري هذا الاختبار بإضافة 5 غرام من المستخلص النباتي (مائي او كحولي) الى 50 مليلتر كحول ايثلي مطلق ثم تم غلي المحلول في حمام مائي بدرجة 100م ° ولمدة دقيقة واحدة ورشح بعدها المحلول واطيف اليه 100 مل حامض الهيدروكلوريك تركيزه 4% وبعد ذلك تلاحظ النتيجة ففي حالة ظهور عكارة فهذا يدل على وجود الراتنجات في المستخلص النباتي (Jabir et al.,2017) .

8-الكشف عن الفلافونيدات

تم تحضير محلولين المحلول (أ) بإذابة 10 غم من مستخلص نبات الميريديه (مائي أو كحولي) في 50 مل كحول ايثيلي 59% ثم رشح المحلول . المحلول (ب) حضر بأضافة 10 مل من الكحول الايثيلي 50% الى 10مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 50% , ثم مزجت كميات متساوية من كل من المحلولين , ظهور اللون الاصفر يدل على وجود الفلافونيدات (شوكت وآخرون, 2012).

4.4.2.3: اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لنبات الميريديه ضد أنواع المبيضات المعزولة

اجري هذا الاختبار باتباع طريقة الانتشار بالاكار بواسطة الحفر الواردة في *Ali et al.* (2011b) لاختبار فعالية المستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريديه ضد أنواع المبيضات المعزولة الحساسة والمقاومة للامفوتيرييسين , اذ تم اختيار عزلة واحدة من كل نوع .

1- تحضير عالق الخميرة

نقل عدد من مستعمرات الخميرة المنمأة على وسط اكار السابرويد دكستروز المضاف اليه الاموكسولين وبعمر 24 ساعة الى انبوبة اختبار تحتوي 5 مل من المحلول الملحي الفسلجي بتركيز 0.85% , ورج المحلول جيدا بواسطة المازج للحصول على عالق تركيزه $10^6 \times 5 \times 10^6$ خلية /مل من خلال مقارنة عكارتة مع عكارة محلول مكفر لاند (*Schwalbe et al.*, 2007).

2- اختبار الفعالية التثبيطية

أ- لقع 100 مايكروليتر من عالق اللقاح المحضر في أعلاه على سطح وسط اكار السابرويد دكستروز المضاف اليه الاموكسولين , ونشر بواسطة مسحة قطنية معقمة وبصورة متجانسة وتركت الاطباق لتجف في درجة حرارة الغرفة لمدة 10-15 دقيقة .

ب- عملت الحفر بواسطة ثاقب فليني بقطر 7 ملم بواقع 4-5 حفر لكل طبق موزعه بابعاد متساوية.

ت- حضر المحلول الخزين (Stock solution) لكل مستخلص كلا على انفراد بإذابة 0.5 غرام (500 ملغم) من المستخلص المائي في 5 مل ماء مقطر معقم و0.5 غرام (500 ملغم) من المستخلص الكحولي في 5 مل من ثنائي مثيل السلفوكسيد (DMSO) ومزجت جيدا باستعمال المازج وعقمت بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية قطرها 0.22 مايكرون . ثم حضرت تراكيز متدرجة من المحلول الخزين لكلا النوعين من المستخلصات كلا على انفراد

وهي 10, 25, 50, 75, 100 ملغم /مل وباستعمال المذيب المناسب لكل مستخلص وذلك باستخدام معادلة التخفيف وهي $C1 \times V1 = C2 \times V2$.

ث- تم إضافة 100 مايكروليتر من كل تركيز من التراكيز في أعلاه لكل حفرة وبالتسلسل وبواقع ثلاثة مكررات لكل معاملة وعملت حفرة للسيطرة السالبة رقم 1 بإضافة 100 مايكروليتر ماء مقطر معقم و سيطرة سالبة رقم 2 بإضافة 100 مايكروليتر من ثنائي مثيل السلفوكسيد وحفرة للسيطرة الموجبة بإضافة 100 مايكروليتر من مضاد الامفوتيريسين المحضر بإذابة 10 ملغم في 1 مل ثنائي مثيل السلفوكسيد.

ج- حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37°م ولمدة 24 ساعة وبعدها تم التعرف على فعالية المستخلص تجاه انواع المبيضات المعزولة من خلال قياس قطر منطقة التثبيط حول الحفرة بوحدة المليمتر (ملم) باستخدام مسطرة مدرجة.

5.4.2.3: تحديد التركيز المثبط الأدنى MIC والتركيز القاتل للفطريات الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي

استعملت طريقة التخفيف الدقيقة (Microdilution method) كطريقة كمية لتحديد التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي ضد الأنواع الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين , وذلك باستعمال اطباق المعايرة الدقيقة (Microtiter plates) التي تحتوي على 96 حفرة ذات قعر محدب وأجريت اعتمادا على طريقة كريم والسماك (2017) وبواقع ثلاثة مكررات لكل مستخلص وعلى النحو الآتي :

1-تحضر عالق الخميرة

حضر عالق الخميرة من كل نوع من الأنواع الستة التي تم تشخيصها باخذ نمو ملئ الناقل (Loop) من مستعمرات كل نوع بعمر 24 ساعة ونقلت الى انبوبة اختبار فيها 5مل محلول ملحي فسلجي تركيزه 0.85 % ومزجت جيدا بواسطة المازج وضبطت عكارتها مع محلول مكفر لاند 0.5 بحيث اصبح تركيز الخلايا $10^6 \times 5-1$ خلية /مل وتم تخفيف العالق بنسبة 1:100 ثم خفف الناتج مرة ثانية بنسبة 1:20 باستخدام المحلول الملحي الفسلجي للحصول على عالق تركيزه $10^3 \times 2.5-0.5$ خلية /مل (Phargava, 2019; Schwalbe et al., 2007).

2-تحضير محلول المستخلص

تم تحضير المحلول الخزين بتركيز 1600 مايكروغرام / مل باستخدام ثنائي مثيل السلفوكسيد لكل من المستخلص الكحولي والامفوتيريسين وعقم باستخدام مرشحات غشائية بقطر 0.22 مايكرون (Phargava, 2019).

3- تلقيح الوسط الزراعي وتحديد التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى

أ- حضر طبق النمو بإضافة 100 مايكروليتر من وسط السابروييد السائل المضاف إليه الاموكسلين الى كل حفرة من حفر العمود من 1-24 بواقع ثلاث مكررات لكل حفرة. ثم اضيف 100 مايكروليتر من المحلول الخزين للمستخلص الكحولي (تركيزه 1600 مايكروغرام /مل) باستعمال ماصة دقيقة (Micropipette) للحفرة رقم 1 من العمود 1 الصف A ومزج المحلول بوساطة الماصة الدقيقة لمرات متعددة وهذا يمثل التخفيف الأول للمحلول الخزين اذ اصبح تركيزه نصف تركيز المحلول الأصلي أي 800 مايكروغرام لكل مل .

ب- نقل 100 مايكروليتر من الحفرة 1 الى الحفرة 2 بالصف A ومزجت بوساطة الماصة الدقيقة وهكذا اصبح المحلول المخفف بتركيز 400 مايكروغرام /مل. كررت العملية وصولا الى الحفرة رقم 22 في الصف B وبعدها سحب منها 100 مايكروليتر واهمل وبذلك تم الحصول على تراكيز 800 , 400 , 200 , 100 , 50 , 25 , 12.5 , 6.25 , 3.125 , 1.562 , 0.781 , 0.3905 , 0.1953 , 0.0976 , 0.0488 , 0.0244 , 0.0122 , 0.0061 , 0.003 , 0.0015 , 0.0075 , 0.0037) مايكروغرام /مل .

ت- تم إضافة 5 مايكروليتر من عالق خميرة النوع الاول المحضر في الخطوة رقم 1 في أعلاه بدءا من الحفرة رقم 1 الى الحفرة رقم 23 وجعلت الحفرة رقم 23 معاملة سيطرة موجبة بينما حفرة رقم 24 معاملة سيطرة سالبة تحتوي فقط وسط زرع.

ث- تم تكرار الخطوات من أ- ت مع حفر الصف الجديد لخميرة النوع الاول مع استبدال المستخلص بالامفوتيريسين وهكذا كررت الخطوات من 1-6 مع الأنواع الأخرى المعزولة. غطيت الاطباق وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 24 ساعة. ثم فحص النمو بالاعتماد على العين المجردة من خلال ملاحظة عكارة وصفو الوسط .

6.4.2.3: تجزئة المركبات الفعالة وفصلها و تشخيصها في المستخلص الكحولي

لاوراق نبات الميريمية

أولا: تجزئة المركبات الفعالة في المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية حسب القطبية

استعملت تقنية الكروموتوكرافيا تحت الضغط المخلخل (Vaccum Liquid Chromatography) VLC الموضحة في الشكل (1-2) لتجزئة المركبات الفعالة الموجودة في المستخلص الكحولي الخام للنبات , واجريت هذه الطريقة حسب مذكره (Seelinger et al., 2012, Oluah et al., 2020)) باتباع الخطوات الآتية :

1- اذيب 30 غرام من المستخلص الكحولي الخام في كمية من كحول الايثانول المطلق و اضيف اليه 30 غرام من السليكا (Silica gel) (60-120 mesh) وتم مزج الخليط بالتحريك المستمر لحين جفاف العينة .

2- وضع 900 غرام من هلام السليكا في عمود زجاجي 15×40 سم وتم غسله باضافة كمية من الهكسان وتم تقليب هلام السليكا بواسطة عصا زجاجية للتخلص من الفقاعات وبعد ذلك اضيف على السطح طبقة من المزيج الذي تم تحضيره في الخطوة رقم 1 في أعلاه ووزع بالتساوي ثم وضعت ورقه ترشيح من نوع Whatman No.2 فوق المزيج لمنع تشوه السطح وتكون الفقاعات عند إضافة المذيبات .

3- تم انزال المركبات الفعالة للمستخلص النباتي بالتدرج وتحت الضغط المخفض بإضافة أنظمة فصل (Mobile phases) مختلفة وحسب قطبيتها بدءا بالهكسان كمذيب قليل القطبية وصولا الى الميثانول ذي القطبية العالية (Abdullahi & Manul , 2021). وتم توضيح هذه الاطوار في جدول (3-9).

4- تم جمع 7 أجزاء وتحليلها باستعمال صفائح السليكا TLC (Thin Layer Chromotography) ذات سمك 0.25 ملم , وتم تحميل الأجزاء بصورة منفصلة على هذه الصفيحة وذلك بعمل خط وهمي اسفل الصفيحة وعلى بعد 1.5 سم ولمعرفة المكونات الكيميائية للنبات , اذ نقلت كمية من كل جزء باستعمال انبوبة شعرية دقيقة ووضعت بشكل نقاط على الخط الوهمي وبمسافات متساوية , ثم تركت الصفائح لتجف

5- تم اختبار أنواع متعددة من أنظمة الفصل لغرض اختيار الاكفا منها واستخدامه في عملية الفصل وهذه الأنظمة وضحت في الجدول (3-10).

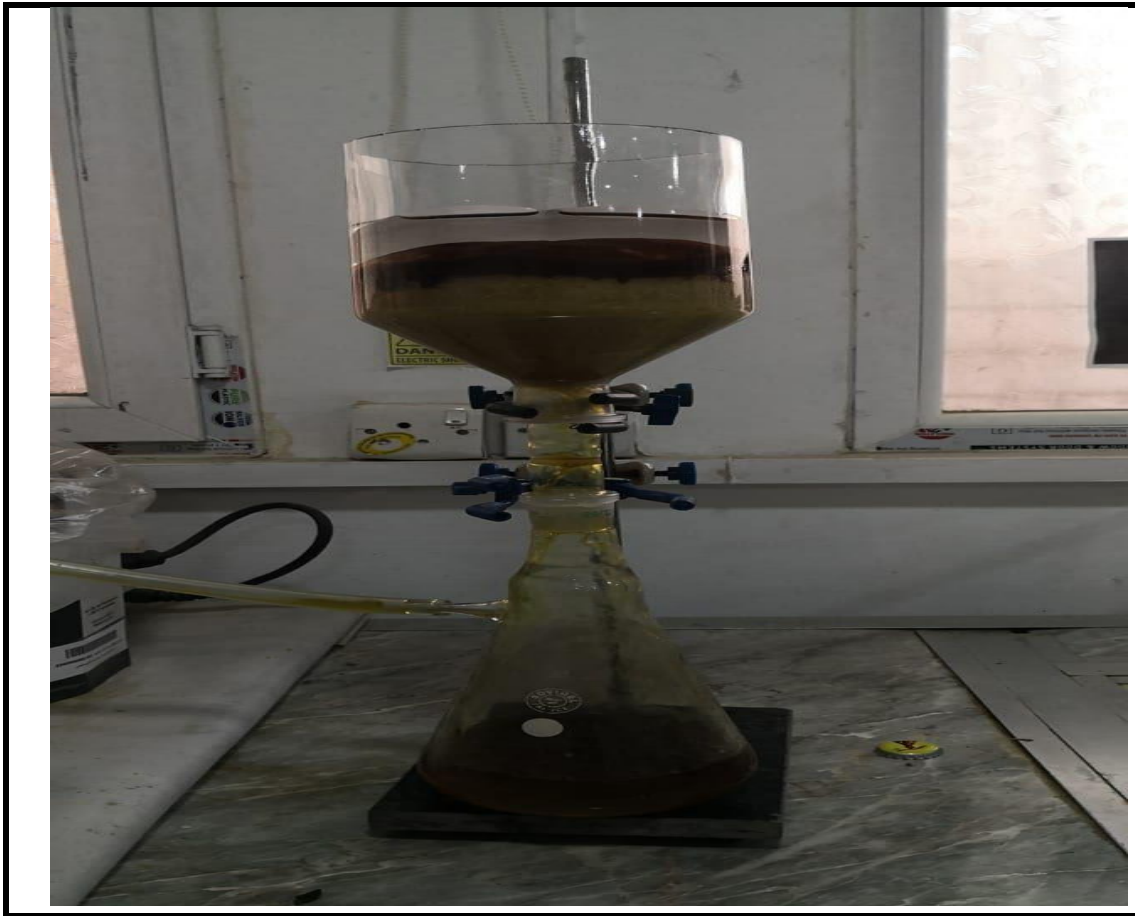
6- وضع نظام الفصل كلوروفورم : اثيل أسيتيت (80:20) في بيكر زجاجي اذ عد هو الاكفا مقارنة ببقية أنظمة الفصل , وتم وضع صفيحة الكروموتوغرافيا المحضرة في الخطوة 4 في البيكر ثم غطي البيكر وتركت الصفائح حتى وصول محلول الفصل الى مسافة تبعد 1.5 سم من الحافة العليا , ثم أخرجت الصفائح وتركت لتجف تحت درجة حرارة الغرفة ثم سجلت الوان المركبات المفصولة وتم حساب معامل التحرك (R_f) باستخدام المعادلة الآتية :

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعها العينة}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}} .$$

وبعدها فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي 254 نانوميتر ثم رشنت الصفيحة بكاشف الفانيلين للكشف عن المركبات الفعالة .

جدول (3-9) : أنظمة الفصل المستخدمة في تجزئة المستخلص الكحولي الخام للنبات

الحجم (التر)	النسبة	نظام الفصل
1.600		هكسان
1.600	50:50	هكسان : كلوروفورم
1.600		كلوروفورم
1.600	50:50	كلوروفورم : ايثيل اسيتيت
1.600		ايثيل اسيتيت
2:00		ايتانول
2.400		ميثانول



شكل (1-3): تقنية الكروماتوغرافيا تحت الضغط المخزل VLC

جدول (10-3): أنظمة الفصل المستخدمة في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

النسبة	نظام الفصل
80:20	هكسان : كلوروفورم
100:00	كلوروفورم
80 :20	كلوروفورم : ايثيل اسيتيت

ثانيا : اختبار الفعالية التثبيطية وتحديد التركيز المثبط الأدنى والتركيز القاتل الأدنى لأجزاء المستخلص الكحولي المحضرة ضد أنواع المبيضات المعزولة
اتبعت الطريقة والخطوات نفسها التي ورد ذكرها في الفقرة 4.4.2.3 و 5.4.2.3 لغرض اختيار الجزء الاكفأ والاكثر فعالية واستخدامها في تنقية وتشخيص المركبات الفعالة فيه.

7.4.2.3: تحليل المركبات الفعالة في مستخلص نبات الميريمية وتنقيتها تشخيصها باستخدام كروماتوغرافيا السائل عاليه الأداء التحضيرية والتحليلية

تم اختيار جزء مستخلص كلوروفورم : الاثيل اسيتيت الذي تم الحصول عليه في الفقرة 1.6.5.3.3 اعتمادا على كفاءته العالية في تثبيط أنواع المبيضات قيد الدراسة ولكون كمية المستخلص الذي تم الحصول عليها تكفي لاكمال باقي الاختبارات المطلوبة مقارنة بكمية باقي الأجزاء المفصولة .

أجريت عملية فصل العينة في مختبرات مؤسسة الفاضل العلمية /بابل باستعمال جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC) المجهز من شركة Knauer الألمانية والمجهز بمقياس الطيف. أجريت عملية الفصل والتنقية للحصول على كمية مفصولة من كل مركب فعال بحسب ظروف الفصل المبينة في الجدول (3-11) وبحسب برنامج الفصل المتدرج في الجدول (3-12), على وفق معايير جامع العينات التي تضمنت تحديد القمة عند مستوى 10 mAu (milli Absorbance Unite) وميلان (Slope) 0.2 /Au دقيقة وحجم الجزء المتحصل عليه هو 5 مل وتم تحديد كروماتوغرام الفصل باستخدام الكاشف عند الطول الموجي 273 نانوميتر من خلال حساب وقت الاحتفاظ به .

جدول (3-11): ظروف الفصل باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC) المستخدمة لتنقية المركبات الفعالة في النبات قيد الدراسة

عمود الفصل	من نوع C18 , ابعاد الجزيئات داخل العمود 10×250 ملم , الحجم 5 مايكروميتر , حجم الفراغات A80 (USA , Water Corporation)
الطور المتحرك	المذيب A : 0.05% من Trifluoroacetic acid ,المذيب B : الاستونيتريل (acetonitrile) .

درجة حرارة العمود	28 °م
معدل الجريان	3 مل / دقيقة
نوع الكاشف	الاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 273 نانوميتر
حجم العينة	100 مايكروليتر

جدول (12-3): برنامج الفصل المتدرج باستخدام جهاز Prep.HPLC

الوقت (دقيقة)	الطور المتحرك (%)A	الطور المتحرك (%)B	معدل الجريان مل/دقيقة
0	77	23	3
50	20	80	3
51	50	50	3
60	0	100	3

ولغرض الكشف عن نوع العينة المفصولة وتحديدتها استعمل جهاز HPLC التحليلي وأجريت عملية التحليل حسب الظروف المذكورة في الجدول (13-3) .

جدول (13-3) : ظروف التحليل باستخدام جهاز كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC)

عمود الفصل	من نوع C18 , ابعاد الجزيئات داخل العمود 4.6×250 ملم , الحجم 5 مايكروميتر , حجم الفراغات A80 ° (Germany , Knauer)
الطور المتحرك	المذيب A : 1% من حامض الاسيتيك (acetic acid) - ماء , المذيب B : الاستونيتريل (acetonitrile).
درجة حرارة العمود	28 °م
معدل الجريان	1 مل / دقيقة
نوع الكاشف	الاشعة فوق البنفسجية عند الاطوال الموجية 272 , 280 , 310 نانوميتر
حجم العينة	20 مايكروليتر

تم اجراء التحليل المتدرج عن طريق تغيير نسبة المذيب B الى المذيب A وذلك بتغيير الفصل من 10% الى 40% B بطريقة خطية لمدة 28 دقيقة ومن 40% الى 60% B في 39 دقيقة , ومن 60 الى 90% ب55 دقيقة (جدول 14-3) . بعدها تم الكشف عن كروماتوغرام

HPLC باستخدام كاشف الأشعة فوق البنفسجية عند الأطوال الموجية 272 , 280 , 310 نانومتر بمصفوفة الصمام الثنائي الضوئي بثلاثة أطوال موجية هي 272 , 280 , 310 نانومتر على وفق أقصى امتصاص للمركبات التي تم تحليلها.

تم الكشف عن كل مركب من خلال مطابقة وقت الاحتجاز وطيف الامتصاص للعينة مع المعايير القياسية وتم حساب التركيز لكل مركب باستخدام التراكيز المتسلسلة للمواد القياسية الخارجية لبناء منحنى المعايرة بين التركيز ومساحة القمة المقابلة له (Seal,2016).

جدول (3-14): برنامج الفصل المتدرج لعملية التحليل باستخدام HPLC

الوقت (دقيقة)	الطور المتحرك (%)A	الطور المتحرك (%)B	معدل الجريان مل/دقيقة
0	90	10	1
28	60	40	1
39	40	60	1
55	10	90	1

1.7.4.2.3: اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات النقية ضد أنواع المبيضات المعزولة

اتبعت الطريقة والخطوات نفسها التي ورد ذكرها في الفقرة 4.4.2.3 لاختبار الفعالية التثبيطية للمركبات التي تم تنقيتها بجهاز Prep. HPLC ضد أنواع المبيضات المعزولة عدا انه تم تحضير المحلول الخزين كلا حسب وزن المركب الذي تم الحصول عليه وأذيب كل مركب في 2مل من DMSO واجري الاختبار تجاه السلالات الحساسة فقط وبمعدل مكررين لكل مركب .

5.2.3 : تحضير المستخلص النباتي النانوي الهجين من المستخلص الكحولي

الخام لنبات الميريمية

تم تحضير المستخلص النانوي من مستخلص النبات الكحولي الخام الذي اثبت فعاليته في تثبيط كافة أنواع المبيضات المعزولة مقارنة بالمستخلص المائي , باستخدام أكسيد الزنك كحامل حسب ما ذكره (Bashi et al. (2013). مع بعض التحوير. إذ تم تحضير محلول أكسيد الزنك النانوي بإذابة 1 غرام من مسحوق الاوكسيد في كمية من كحول الايثانول بتركيز 50% ثم اكمل الحجم الى 25مل بإضافة ماء مزال الايونات, ثم تم تحضير محلول المستخلص النباتي

الكحولي بإذابة 1 غرام من مسحوق المستخلص الكحولي لنبات الميريبيمية في كمية من المذيب DMSO ثم أكمل الحجم الى 25 مل بأضافة الماء المزال الايونات. أضيف محلول المستخلص النباتي الى محلول أكسيد الزنك وحرك المزيج بوساطة المحرك المغناطيسي وبدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة بعدها وضع المزيج في الحاضنة الهزازة بدرجة حرارة 45 م ولمدة 18 ساعة ثم فصل المحلول الناتج باستخدام جهاز الطرد المركزي. اخذ الراسب وغسل باستخدام ماء مزال الايونات مرات متعددة , وبعدها جمع الراسب وجفف باستخدام الفرن الكهربائي تحت درجة حرارة 40 م° وبعدها جمع المسحوق الناتج وحفظ لحين الاستخدام واعطي للمستخلص النانوي الهجين المحضر بهذه الطريقة الرمز ZnOSNPs.

1.5.2.3:تشخيص المستخلص النباتي النانوي الهجين

1- التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء (FTIR)

اجري هذا الفحص في المختبر الخدمي التابع لقسم الكيمياء في كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء. اذ تم دراسة طيف الاشعة تحت الحمراء للمستخلص النباتي النانوي قيد الدراسة وكذلك أكسيد الزنك النانوي بشكله الحر, وذلك من خلال طحن كمية من كل مركب من هذه المركبات مع بروميد البوتاسيوم (KBr) ثم عمل قرص منهما وبعدها قيس طيف الاشعة تحت الحمراء ضمن مدى موجي يتراوح بين 4000-400 سم⁻¹ وتم تثبيت جميع الحزم الظاهرة وتشخيص بعض الحزم الرئيسية (Rajan *et al.*,2016).أجري هذا الفحص لمعرفة نوع المجاميع الكيميائية أذ أن كل مجموعة كيميائية تمتص نوعا من الاشعاع ذي تردد معين في مجال طيفي معين والذي يعبر عنه بالاطياف الموجية (Berthomieu and Hienerwadel,2009).

2- التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية(XRD)

تم تشخيص المستخلص النباتي النانوي باستخدام جهاز حيود الاشعة السينية في مختبرات كاك للفحوصات العلمية /بغداد لمعرفة التركيب البلوري للمواد, والذي يوضح أيضا الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda = 2d\sin\theta$ لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها. اذ ان n رتبة المستوى البلوري الذي يكون منه حيود للاشعة السينية .

λ : الطول الموجي للاشعة السينية المستخدمة (انبوبة نحاس).

⊙ : زاوية الحيود للاشعة السينية .

d : المسافة البلورية العمودية بين مستويين متوازيين (Rajan *et al.*,2016).

2-التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM)

اجري هذا الاختبار في مختبر كلية العلوم جامعة بغداد وذلك باستخدام مجهر القوة الذرية في فحص مركب أوكسيد الزنك النانوي والمستخلص النانوي النباتي ,لدراسة خصائص الاسطح وجغرافيتها من حيث قياس اقطار وحجوم وخشونة الدقائق النانوية (Nagarajan and Kuppusamy,2013).

3-التشخيص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM)

تم فحص المستخلص النباتي النانوي باستخدام المجهر الالكتروني الماسح لتحليل وتعيين خواص السطح ومعرفة شكلها وتحديد مقاييس ابعادها الخارجية , اجري هذا الفحص في مختبر شركة الخورة في بغداد (Palmqvist,2017).

4-التشخيص باستخدام مطياف التشتت (EDS)

اجري هذا الاختبار في مختبر شركة الخورة / بغداد , لاجل تحديد العناصر المكونة للمستخلص النباتي النانوي الهجين (Caroling et al.,2013) .

2.5.2.3: اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي الهجين المحضر ضد أنواع

المبيضات المعزولة

تم إختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي المحضر باتباع الخطوات نفسها التي ذكرت في الفقرة 4.4.2.3 لكن اعتمد تركيز 10 ملغرام فقط لاجراء الاختبار ومقارنته مع فعالية المستخلص الكحولي الخام والمضاد الحيوي .

3.5.2.3: تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل للفطريات الأدنى

(MFC) للمستخلص النانوي المحضر من اوراق نبات الميريمية

استعملت طريقة التخفيف الدقيقة (Microdilution method) كطريقة كمية لتحديد التركيز المثبط والقاتل الأدنى للمستخلص النانوي الهجين المحضر ضد الأنواع الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين , وذلك باستعمال طريقة اطباق المعايرة الدقيقة (Microtiter plates) التي ذكرت في الفقرة 5.4.2.3.

3.3 : التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات التي تم الحصول عليها بطريقة التحليل الاحصائي للاختلافات Analysis of varine ANOVA وعند مستوى احتمالية 0.05 وبطريقة الفرق المعنوي الأصغر (LSD), وحسب برنامج التحليل الاحصائي SPSS.

4. النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.4: عزل وتشخيص أنواع المبيضات

جمعت 83 مسحة فموية من 83 شخصا شخصت سريريا اصابتهم بداء المبيضات الفموي واطهرت نتائج الزرع المختبري وجود نمو في 63 عينة (76%) بينما لم يظهر أي نمو في 20 عينة (24%) (جدول 4-1) وهذا يشير الى ان التشخيص السريري لايعطي دقة كبيرة في معرفة وجود المسبب المرضي لانه يعتمد على خبرة الأطباء في التشخيص كما ان هناك امراضا تتشابه في مظهرها السريري مع داء المبيضات الفموي كما هو الحال في التهاب الفم البكتيري والفيروسى لذلك فان نتائج الزرع المختبري هي الادق (الشيخلي وجماعته, 2022) هذه النتيجة تقارب ماتوصل اليه حبيب وجماعته (2015) اذ بلغت النسبة التي سجلها 86.1% والخزعلي (2017) ومحمد وجماعته (2021) والشيخلي وجماعته (2022) اذ بلغت النسب المسجلة في دراستهم 85% و 69.6% و 74% على التوالي ومن ناحية أخرى كانت النسبة المسجلة في هذه الدراسة اقل مما سجله (Nejad *et al.* (2011) والخفاجي (2017) اذ كانت النسبة الإيجابية في دراستهم 93% و 94% على التوالي , في حين كانت نسبة العزل الإيجابية في هذه الدراسة اعلى مما سجله (Martins *et al.* (2011) وكانت نسبته 33.7% و Hadi *et al.* (2012) بنسبة 14.8% و Asmath & Manikandan (2013) 43% وعبد الواحد وجماعته (2016) 10.64%. هذا التباين في النتائج يعود الى ان المبيضات من الفطريات الانتهازية التي تصيب الانسان بالمرض عند وجود ظروف فسلجية وحيوية منها امراض نقص المناعة والسرطانات الخبيثة والمعالجة بالادوية الستيرويدية وبعض المضادات ذات الطيف الواسع وفي حالات مرضى السكر وغرس الأعضاء واثناء فترة الحمل (الخفاجي والمعموري , 2019).

جدول (4-1): نتائج الفحص الزرعى للحالات المشمولة بالدراسة

نتائج الفحص الزرعى	العدد	النسبة المئوية (%)
موجب	63	76
سالب	20	24
المجموع	83	100

كما اشارت نتائج الفحص المختبري الى وجود الخمائر في 58 عينة (92%) والبكتريا في 5 عينات (8%) (جدول 4-2) هذه النتيجة تخالف ماتوصل اليه حبيب وجماعته (2007) و

Hadi *et al.* (2012) و عبد الواحد وجماعته (2016) اذ سجلت البكتريا اعلى نسبة من حالات التهاب الفم مقارنة بالخمائر .

جدول (4-2): توزيع الاحياء المجهرية المعزولة من حالات داء المبيضات الفموي حسب نوع المسبب

نوع المسبب المرضي	العدد	النسبة المئوية (%)
خمائر	58	92
بكتريا	5	8
المجموع	63	100

1.1.4: التشخيص المظهري والمجهري والفسلجي لانواع المبيضات المعزولة

كشفت نتائج الفحص المظهري لمستعمرات المبيضات النامية على وسط SDA ظهور مستعمرات قرصية الشكل بيضاء اللون وذات سطح املس مرتفعة ومن جهة القاعدة كانت كريمة اللون ,وتحت المجهر اظهرت جميع العزلات خلايا كروية او بيضوية مفردة او متبرعمة وهذه الصفات تطابق ما ذكره (Zafar *et al.* (2017) والخفاجي والمعموري (2019) و Bhargava (2019). أما نتائج الاختبارات الفسلجية والكيميائية الحياتية فقد لخصت نتائجها في الجدول (3-4) وتبين أن *C.albicans* و *C.dubliniesis* تميزتا بقابليتهما على انتاج انبوب جرثومي وابواغ كلاميديية على وسط Cornmeal agar مقارنة بباقي الأنواع وتعزى هذه القابلية الى ان وسط اكار طحين الذرة مع توين 80 يعد وسطا غير غني بالمواد المغذية ومن ثم فأن هذه الظروف تعد حافزا للفطر على انتاج الابواغ الكلاميديية (علي, 2021) كما أشار Nadeem *et al.*(2013) الى أن الفطر يجعل المصل مصدرا للاحماض الامينية التي يحتاجها لتكوين الانبوب الجرثومي الذي يؤدي دورا مهما في امراضية هذا الفطر. هذه النتيجة تخالف ماتوصل اليه (Staib & Morschhauser (2005) وسماكه (2012) الذين توصلوا الى ان معظم عزلات *C.albicans* لاتنتج ابواغا كلاميديية , وهذا قد يعزى سببه الى نفاذ المغذيات من وسط النمو,درجة حرارة الحضان وظروف التلقيح (سماكة,2012). بينما أظهرت جميع الأنواع القدرة على انتاج الخيوط الفطرية الكاذبة على هذا الوسط . أشار الخفاجي والمعموري (2019) الى ان انتاج الخيوط الفطرية والابواغ يعتمد على وجود عدد من الظروف منها قلة الاوكسجين ووجود الوسط السائل ووجود الاحماض الامينية الخالية من الكبريت ووجود مصدر للسكريات متعددة الكربون ووجود مصل الدم و درجة حرارة 35 م° وحموضه الوسط التي تتراوح بين 5-

كما تبين في الدراسة الحالية ان عزلات *C.albicans* هي الوحيدة التي لها القابلية على النمو تحت درجة حرارة 45 م° مقارنة ببقية الأنواع . أوضح محمد و زينة (2021) ان سمة التحمل الحراري ترتبط ارتباطا وثيقا ببنية غشاء الخلية وتحديد محتوى الدهون فيها كما أن هذه القابلية تخضع تحت سيطرة عدد من الجينات. هذه النتائج جاءت مطابقة لما ذكره (Kidd *et al.* (2016) و (Zafar *et al.* (2017) والخفاجي والمعموري (2019) و (Bhargava (2019) وعلي (2021) وعائشة وجماعتها (2021).

جدول(3-4):نتائج الاختبارات الفسلجية لتشخيص أنواع المبيضات المعزولة

الاختبار الانواع	انتاج الانبوب الجرثومي	تكوين الابواغ الكلاميدية	تكوين الخيوط الكاذبة	النمو بدرجة حرارة 45
<i>C.albicans</i>	+	+	+	+
<i>C.dubliniesis</i>	+	+	+	-
<i>C.lusitaniae</i>	-	-	+	-
<i>C.tropicalis</i>	-	-	+	-
<i>C.parapsilosis</i>	-	-	+	-
<i>C.kefyr</i>	-	-	+	-

+ :نتيجة موجبة للاختبار , - :نتيجة سالبة للاختبار

كشفت نتائج الاختبارات التشخيصية المختلفة ان غالبية الخمائر المعزولة تنتمي الى جنس المبيضات وبلغت نسبتها 93.1% (54 عينة) في حين سجلت خمائر من غير المبيضات نسبة بلغت 6.9% (4عينات) (جدول 4-4) , وكانت السيادة للمبيضات البيضاء *C.albicans* من بين أنواع المبيضات المعزولة اذ عزلت بنسبه 53.7% وهذه النتيجة تتفق مع نتائج الكثير من الباحثين منهم (Martins *et al.* (2011) و (Nejad *et al.* (2011) و (Manikandan (2013) & Asmath والخز علي (2017) ومحمد وجماعته (2021) والشيخلي وجماعته (2022) . ان احد أسباب عزل المبيضات البيضاء من غالبية إصابات الفم يرجع الى كونها من اغلب أنواع المبيضات المتواجدة بالفم كما انها تمتلك القدرة على تكوين الانبوب الجرثومي والالتصاق وافراز الانزيمات الحالة (Williams & Lewis, 2011).

سجلت *C.dubliniesis* في هذه الدراسة المرتبة الثانية في نسبة العزل اذ بلغت 18.5% (10 عزلة) وهذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه الخفاجي (2017) وتخالف ماتوصل اليه (2011). Nejad *et al.* سجلت *C.dubliniesis* كرابع مسبب مرضي عزل من داء المبيضات الفموي و (Raju and Shashanka (2011) اذ سجلت بوصفها ثالث مسبب مرضي

واشار (2014). Bhai *et al.* الى ان *C.dubliniensis* سجلت كمسبب لحالات التهابات سطحية وجهازية عند البالغين والأطفال ووضح (2011). Vidal *et al.* والخفاجي والمعموري (2019) ان الإصابة بهذا النوع من المبيضات يرتبط بشكل رئيسي بوجود إصابة بفايروس نقص المناعة البشرية كما أن هذا النوع يشترك مع *C.albicans* بخصائص متعددة منها انتاج الانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية الى جانب ظهور عزلات مقاومة للفلوكونازول والعوامل المضادة الأخرى في ظل الاستخدام المتكرر .

اما بالنسبة لبقية الأنواع التي عزلت في الدراسة الحالية وهي *C.lusitaniae* في المرتبة الثالثة بنسبة 12.9% (7 عزلات) وتلاه النوع *C.tropicalis* بنسبة 7.4% (4 عزلات) و *C.parapsilosis* بنسبة 5.6% و *C.kefyr* بنسبة 1.9% (1 عزلة) . ان حدوث الإصابة بهذه الأنواع يعود الى حالة كبت المناعة واستخدام العلاجات ذات المدى الواسع مما أدى الى حدوث طفرات وظهور سلالات مقاومة للامفوتيريسين (Meurman *et al.* 2014).

جدول (4-4): اجناس الخمائر وانواعها المعزولة من عينات الدراسة

الاجناس	العدد	%	انواعها	العدد	%
<i>Candida</i>	54	93.1	<i>C.albicans</i>	29	53.7
			<i>C.dubliniensis</i>	10	18.5
			<i>C.lusitaniae</i>	7	12.9
			<i>C.tropicalis</i>	4	7.4
			<i>C.parapsilosis</i>	3	5.6
			<i>C.kefyr</i>	1	1.9
خمائر اخرى	4	6.9			
العدد الكلي	58	100			

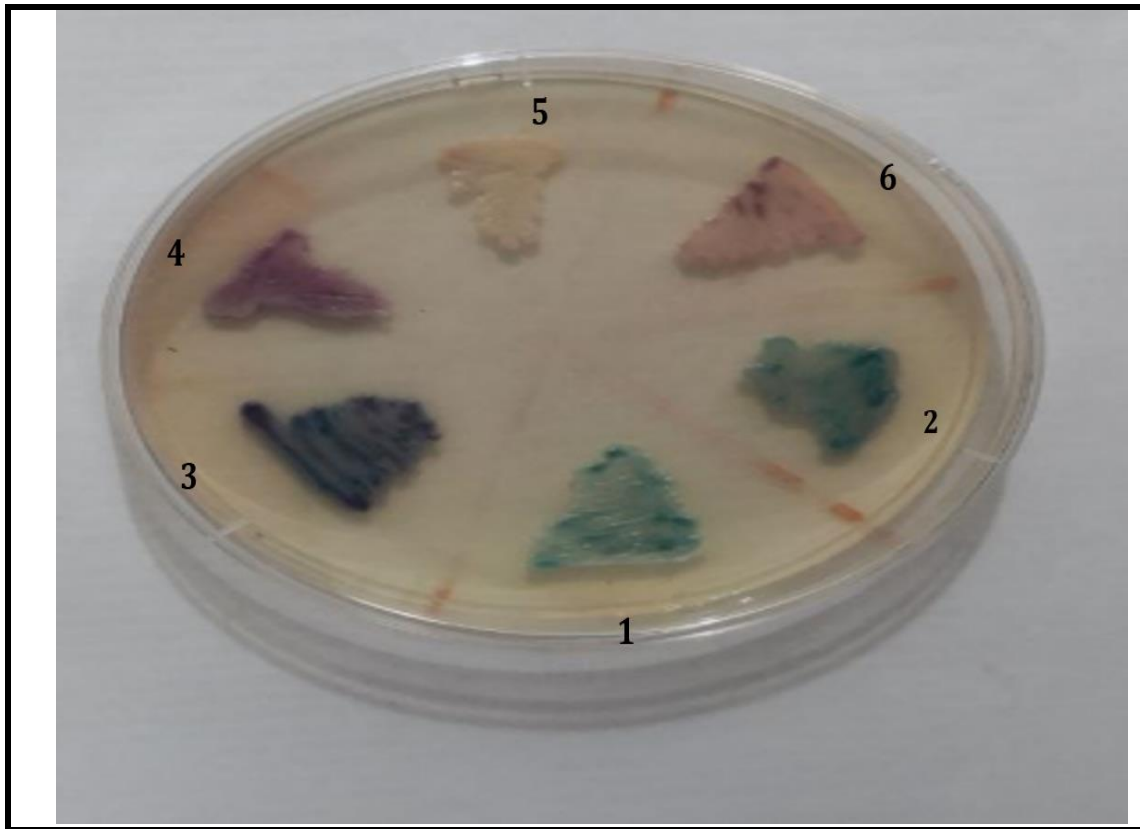
اما نتائج تشخيص المبيضات على وسط HiCrome™ *Candida* Differential Agar (M1297A) والموضحة في جدول (4-5) تبين ان جميع العزلات نمت بصورة جيدة على هذا الوسط التفريقي وظهرت المستعمرات النامية بألوان مختلفة وتم الاعتماد على تعليمات الشركة المجهزة لتفسير النتائج اذ أظهرت جميع عزلات *C.albicans* بلون اخضر فاتح و *C.dubliniensis* بلون أخضر داكن بينما *C.lusitaniae* ظهرت عزلاتها بلون بنفسجي و *C.tropicalis* ظهرت بلون ازرق معدني و *C.parapsilosis* بلون ابيض الى وردي شاحب و *C.kefyr* بلون وردي الى بنفسجي (شكل 4-1) وتوافقت هذه النتائج مع ماتوصل اليه

Altaee & Alzubaidy (2020) و Aldossary *et al.* (2016) و Nejad *et al.* (2011) و محمد وزينة (2021) , وهذا الاختلاف في ألوان المستعمرات يعزى الى الاختلاف في مستوى

افراز الانزيم الخاص الذي له القابلية على تحليل المادة الكروموجينية B-glucosaminidase الموجودة في وسط HiCrome TM *Candida* Differential Agar بين العزلات (Aldossary *et al.*, 2016). اذ ان استخدام هذا الوسط يعد وسيلة مهمة تسمح للتعرف على الأنواع بسرعة وبذلك يتمكن الأطباء من تحديد المضادات الفطرية المناسبة كعلاج بسرعة اكبر مما يقلل من معدلات الاعتلال والوفيات بين المرضى (Nejad *et al.*, 2011) .

جدول (4-5) : نتائج تشخيص عزلات أنواع المبيضات المعزولة باستخدام وسط HiCrome TM *Candida* Differential Agar (M1297A)

الأنواع	العدد	%	النتيجة
<i>C.albicans</i>	29	100	اخضر فاتح
<i>C.dubliniensis</i>	10	100	اخضر داكن
<i>C.lusitaniae</i>	7	100	بنفسجي
<i>C.tropicalis</i>	4	100	ازرق
<i>C.parapsilosis</i>	3	100	ابيض الى ودي شاحب
<i>C.kefyr</i>	1	100	وردي الى بنفسجي



شكل (4-1) : مظهر مستعمرات المبيضات النامية على وسط HiCrome™ *Candida* Differential Agar :1-*C. albicans* , 2-*C. dubliniensis* , 3-*C. tropicalis* , 4 -
C. kefyr-6 , *C. parapsilosis*- 5, *C.lusitaniae*

2.1.4 : تشخيص عزلات المبيضات باستعمال جهاز الفايترك

تم تأكيد تشخيص الأنواع المعزولة باستعمال جهاز الفايترك وبطاقة Vitek 2 YST وذلك من خلال المقارنة ما بين نتائج التفاعلات الكيميائية الحياتية والمعلومات المتوفرة في قاعدة بيانات النظام وقد تم توضيح هذه النتائج في الملحق رقم 1 و 2 , ويمتاز هذا الجهاز بالدقة العالية والسرعة في تشخيص العزلات الى مستوى النوع (Altaee & Alzubaidy, 2020) وبالنظر لدقة الجهاز انحصرت احتمالية التشخيص بين 92-99% كما مبين في الجدول (4-6) , وجاءت نتائج التشخيص بالفايترك مطابقة لما ذكره (Ellis et al. و Kidd et al. (2007). (2016) والمبينة في الملحق رقم 2.

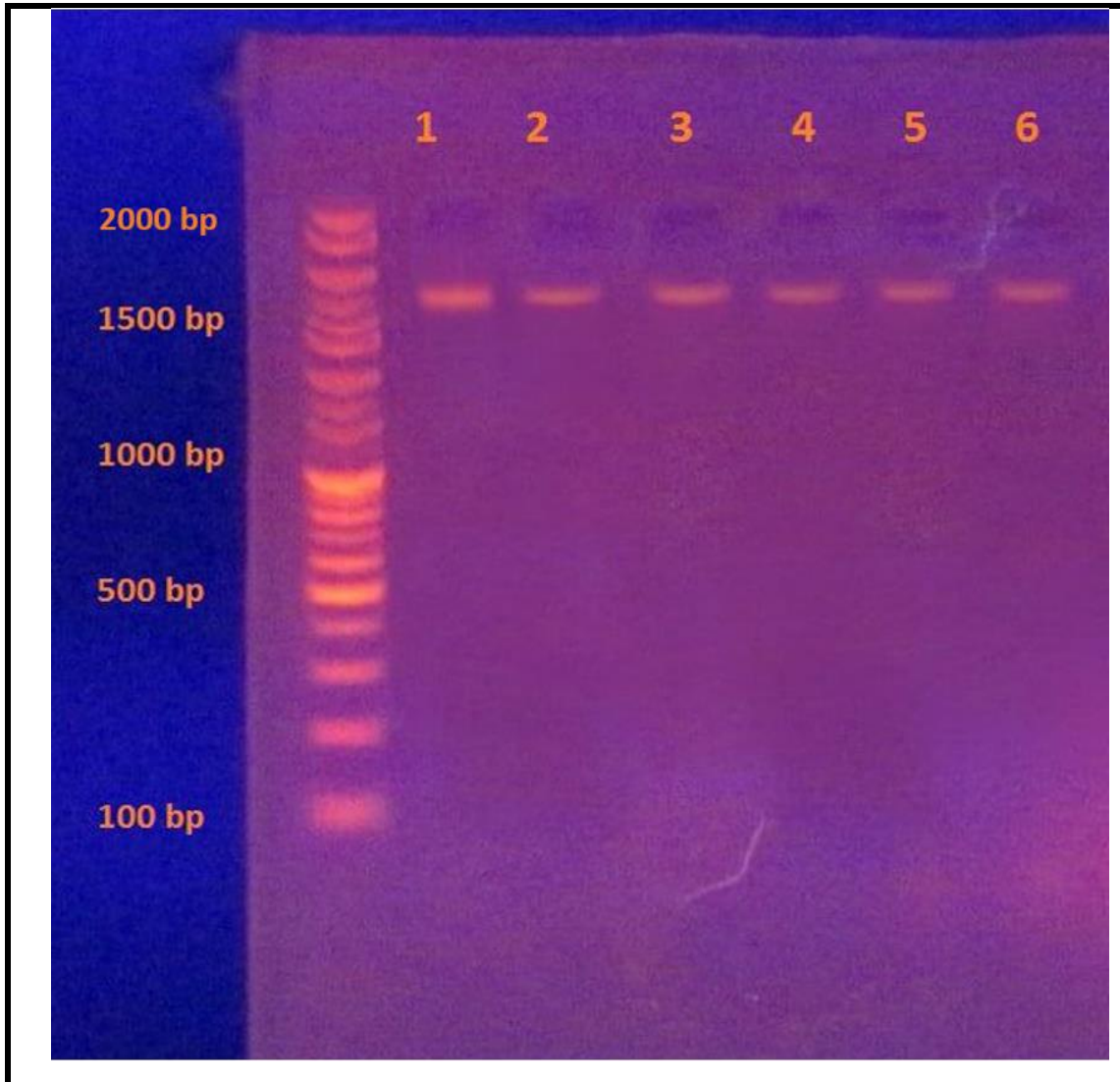
جدول (4-6):احتمالية التشخيص لانواع المبيضات المعزولة باستخدام جهاز الفايترك

أنواع المبيضات	احتمالية التشخيص (%)
<i>C. albicans</i>	99-92
<i>C. dubliniensis</i>	98-93
<i>C.lusitaniae</i>	94-93
<i>C.tropicalis</i>	98-96
<i>C. parapsilosis</i>	97-94
<i>C. kefyr</i>	94

3.1.4:التشخيص الجزيئي لانواع المبيضات المعزولة

أظهرت نتائج التشخيص باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل إمكانية المضاعفة الكاملة لمنطقة 18 SrRNA المهمة في تشخيص الفطريات وهذه النتيجة اتفقت مع ما ذكره Hasse et al. (1995) و Chan et al. (2013), Irman & Youser (2015), ومحمد وجماعته (2016) . ان اختيار 18 SrRNA في تشخيص الفطريات الى مستوى الجنس و النوع يعزى الى أسباب عديدة منها وجود عدد من البادئات العالمية الخاصة بالفطريات القائمة على مضاعفة المناطق المحفوظة لجين 18 SrRNA الذي يجعل من الممكن الحصول على نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل , كما ان إيداع عدد كبير من تسلسلات 18SrRNA في قاعدة بيانات البنك الجيني تجعل عملية البحث عن التشابه سهلة إضافة الى الطبيعة المتكررة لهذا الجين التي تزيد عن 100 نسخة لكل جينوم فطري يجعل التضخيم المعتمد على rRNA اسهل ومن ثم فان هذا الجين

مناسب لاجاد مناطق متنوعة ومحفوظة داخل مجموعة من الفطريات لتأسيس علاقات النشوء والتطور بين الفطريات وثيقة الصلة (Chan *et al.*, 2013). تم الحصول في هذه الدراسة على ناتج تضاعف وباحجام تراوحت بين 1624bp- 1656 للأنواع المعزولة , وذلك بعد استخلاص الحامض النووي من الفطريات بوجود البادئات الامامية والخلفية NS1 و NS8 (White *et al.*, 1990 (شكل 4-2)). وتم ايداعها في قاعدة البيانات Genbank التابعة للمركز الوطني لمعلومات التقنية الحيوية (NCBI National Center For Biotechnology Information) وحدد لكل عزلة رمز تسلسلي خاص وكما مبين في الجدول (4-7) وتقارير البنك الجيني المرفقة في الملحق (3 و4 و5 و6 و7 و8) .



شكل (4-2): ناتج تفاعل البلمرة المتسلسل لأنواع المبيضات المعزولة.

DNA ladder=2000 bp ,1-*Clavispora lusitaniae* . 2- *C.albicans*,3-*C. parapsilosis*, 4-*Kluyveromyces marxianus*, 5-*C. tropicalis*, 6=
C.dublinsiensis

جدول (4-7): الرموز التسلسلية المحددة في البنك الجيني لأنواع المبيضات المعزولة

النوع	الرمز التسلسلي	التقرير
<i>Candida albicans</i>	MZ574137.1	ملحق 3
<i>Candida dubliniensis</i>	MZ574410.1	ملحق 4
<i>Clavispora lusitaniae</i>	MZ376949.1	ملحق 5
<i>Candida tropicalis</i>	MZ376951.1	ملحق 6
<i>Candida parapsilosis</i>	MZ572966.1	ملحق 7
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	MZ574180.1	ملحق 8

اثبتت نتائج تحليل القواعد النايتروجينية لنواتج الحامض النووي المضاعفة باستعمال برنامج BLAST بان العزلات المدروسة تعود الى الأنواع *C.dublinsiensis* , *C.albicans* , *C. tropicalis* , *Clavispora lusitaniae*(*C.lusitaniae*) و *C. parapsilosis* , *Kluyveromyces marxianus*(*C.kefyr*) .

اتضح من خلال مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لعزلات الدراسة ان هنالك تطابق بنسب مختلفة بين عزلات دراستنا والعزلات العالمية وأكد ذلك نتائج تحليل النشوء والتطور الوراثي التي أظهرت تجمع العزلة الفطرية ضمن تجمعات تتالف من العزلات التي تعود للنوع نفسه وذلك من خلال رسم الشجرة الوراثية بالاعتماد على تنابعات القواعد النايتروجينية لمنطقة NS1-NS8 الخاصة بكل سلالة إضافة الى تنابعات السلالات العالمية المعروفة للنوع نفسه وحسبت المسافة الوراثية باستخدام طريقة neighbor-joining . وتم استعمال برنامج التحليل الوراثي التطوري MEGA V.11 وهو احدى البرامج المصممة لتحليل ومقارنة تسلسل الجينات المتماثلة والعلاقات التطورية ونمط تطور الحامض النووي والبروتين كما قدم البرنامج تسهيلات كثيرة من خلال بيانات تسلسلية , ويمكن عرض هذه البيانات على شكل شجرة تطويرية (Kumar et al. ,2016) .

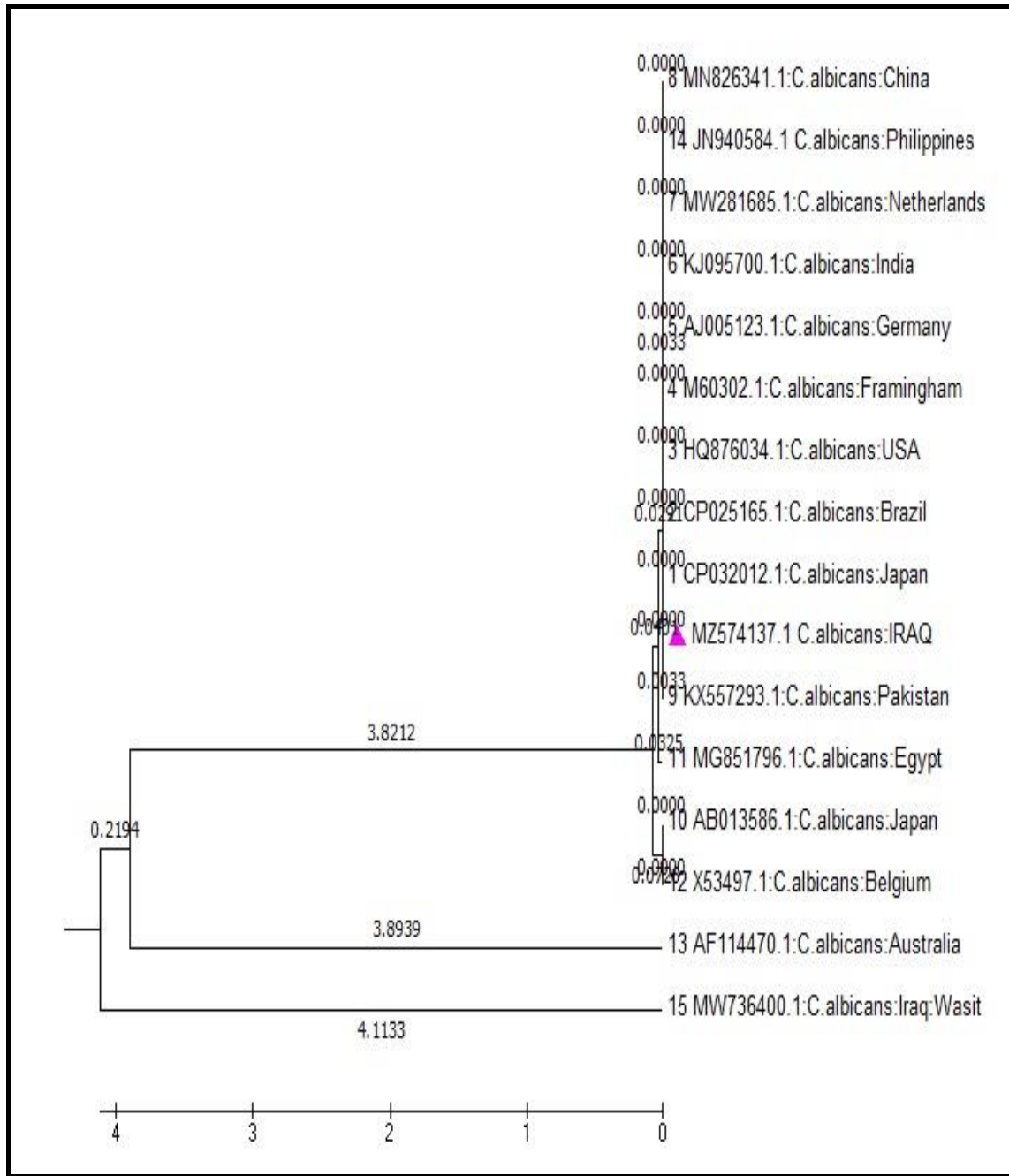
من خلال ذلك تبين ان عزلة الدراسة *C.albicans* أظهرت نسبة تشابه وراثي بلغت 100% مع العزلات العالمية للفطر *C.albicans* المعزولة من الفلبين ونسبة 97% مع العزلات

الهولندية والهندية واليابانية والبرازيل والولايات المتحدة والاسترالية بينما بلغت نسبة التشابه 96% مع السلالات الألمانية والباكستانية والمصرية والبلجيكية, كما أظهرت نتائج التحليل ان عزلة الدراسة أظهرت نسبة تشابه وراثي بلغت 94 % مع العزلات المعزولة من العراق (واسط (جدول(4-8) (شكل 4-3).

جدول (8-4):مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *C.albicans* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

الرمز التسلسلي	اسم السلالة	المنشأ	نسبة التطابق
MZ574137.1*	<i>Candida albicans</i>	Iraq	
JN940584.1	<i>Candida albicans</i>	philippines	%100
MW281685.1	<i>Candida albicans</i>	Netherlands	%97
KJ095700.1	<i>Candida albicans</i>	India	%97
AJ005123.1	<i>Candida albicans</i>	germany	%97
M60302.1	<i>Candida albicans</i>	Framingham	%97
CP025165.1	<i>Candida albicans</i>	Brazil	%97
CP032012.1	<i>Candida albicans</i>	Japan	%97
HQ876034.1	<i>Candida albicans</i>	USA	%97
AF114470.1	<i>Candida albicans</i>	Australia	%97
MN826341.1	<i>Candida albicans</i>	China	%96
KX557293.1	<i>Candida albicans</i>	Pakistan	%96
AB013586.1	<i>Candida albicans</i>	Japan	%96
MG851796.1	<i>Candida albicans</i>	Egypt	%96
X53497.1	<i>Candida albicans</i>	Belgium	%96
MW736400.1	<i>Candida albicans</i>	Iraq: Wasit	%94

**Candida albicans* المعزولة في هذه الدراسة.



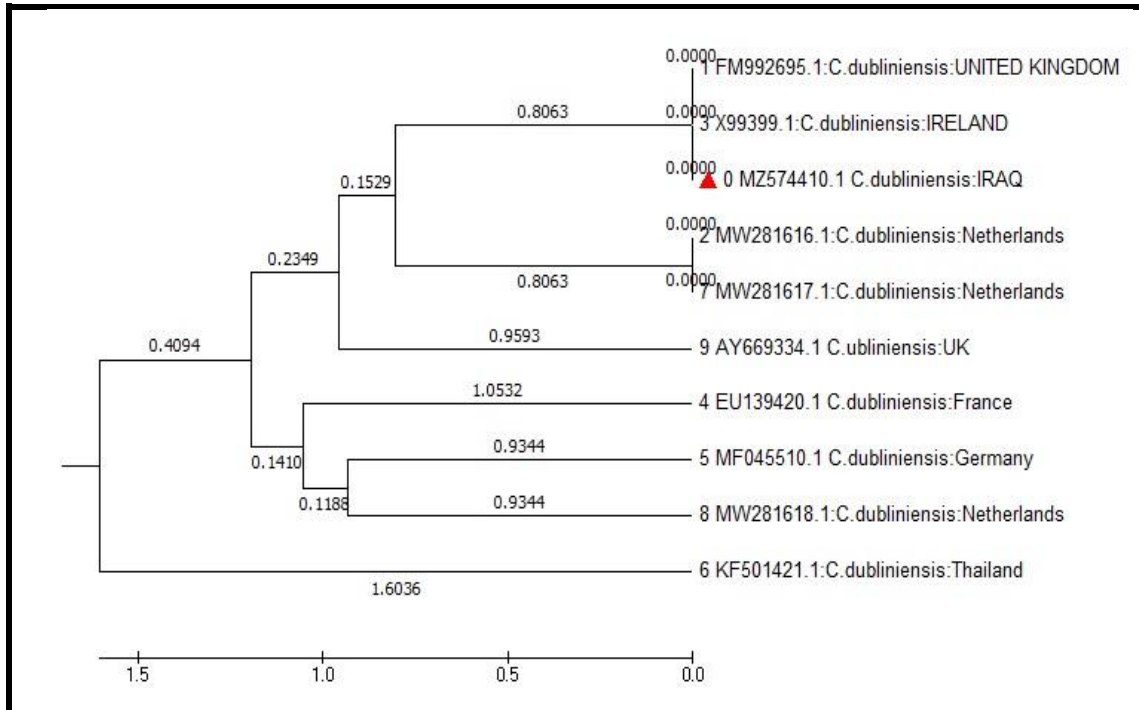
شكل (4-3): الشجرة الوراثية للفطر *Candida albicans* (محددة بمثلث بنفسجي) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية

تبين أيضا من خلال مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة NS8 , NSI المضاعفة من الفطر *C.dubliniensis* المعزولة في هذه الدراسة وجود نسبة تشابه وراثي بلغت 100% مع عزلة الفطر *C.dubliniensis* المعزولة من الولايات المتحدة والمانيا ونسبة 99 مع السلالة الفرنسية و98% مع عزلات الفطر المعزولة من ايرلندا وهولندا والولايات المتحدة بينما كانت نسبة التشابه مع العزلة التايلندية 95% (جدول 4-9)(شكل 4-4).

جدول (4-9): مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *C.dubliniensis* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

الرمز التسلسلي	اسم السلالة	المنشأ	نسبة التطابق
MZ574410.1*	<i>Candida dubliniensis</i>	Iraq	
MF045510.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Germany	100%
AY669334.1	<i>Candida dubliniensis</i>	UK	100%
EU139420.1	<i>Candida dubliniensis</i>	France	99%
FM992695.1	<i>Candida dubliniensis</i>	United Kingdom	98%
MW281617.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Netherlands	98%
MW281616.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Netherlands	98%
X99399.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Ireland	98%
MW281618.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Netherlands	98%
KF501421.1	<i>Candida dubliniensis</i>	Thailand	95%

*سلالة *Candida dubliniensis* المعزولة في هذه الدراسة .



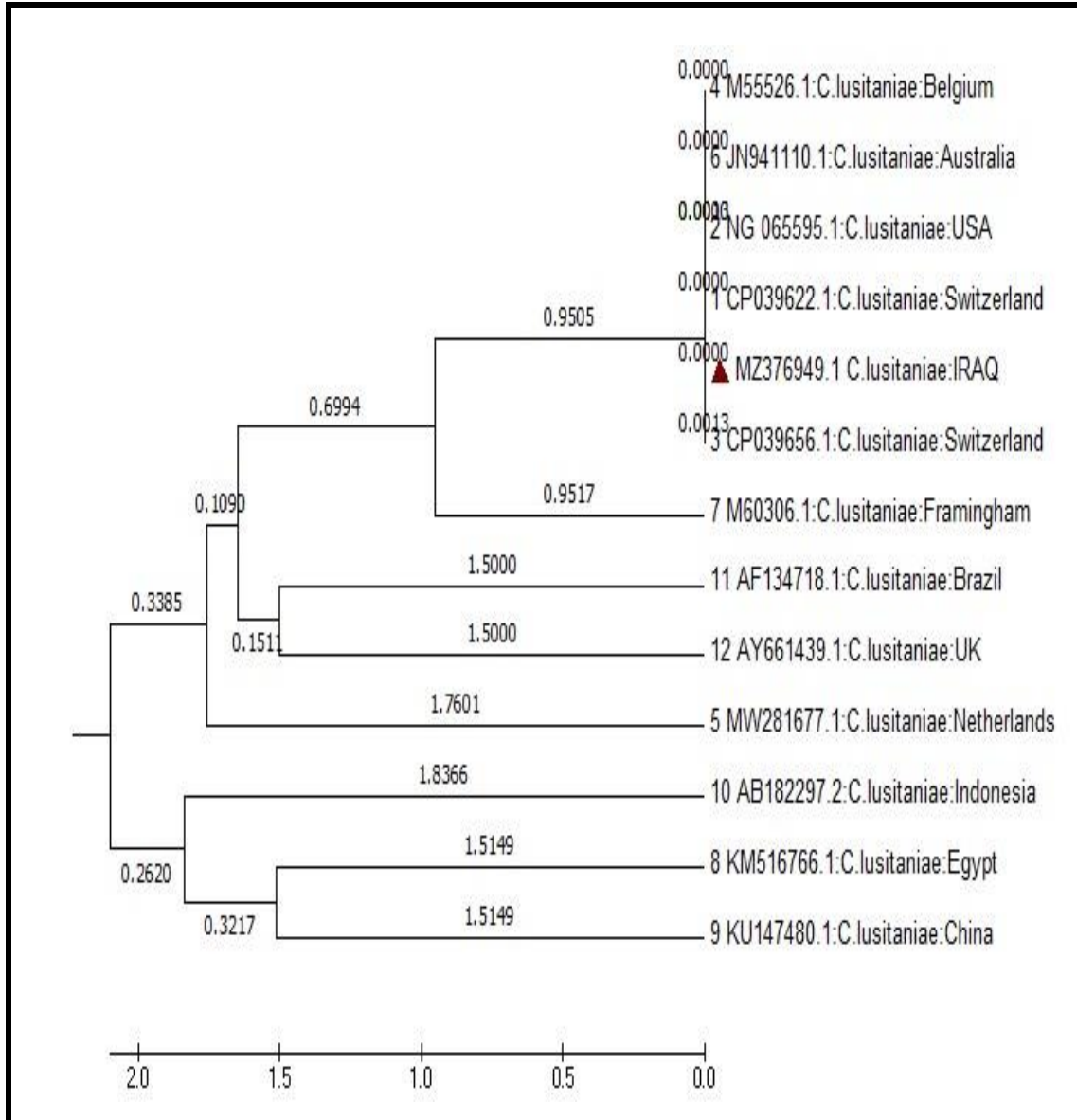
شكل (4-4): الشجرة الوراثية للفطر *Candida dubliniensis* (محددة بمثلث احمر) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية .

كما أظهرت السلالة *Clavispora lusitaniae* (C.lusitaniae) المعزولة في هذه الدراسة أعلى نسبة تطابق وراثي 100% مع سلالة الفطر المعزولة من الولايات المتحدة الأمريكية بينما كانت نسبة التطابق مع السلالة الأسترالية 99% في حين أظهرت سلالات اندونيسيا وفرانغهام نسبة تشابه بلغت 98% مع عزلة الدراسة وأما سلالات الولايات المتحدة وبلجيكا وهولندا فأظهرت نسبة تشابه بلغت 97% في حين كانت نسب التشابه مع عزلات البرازيل والصين ومصر 96% مقارنة مع باقي العزلات (جدول 4-10) (شكل 4-5).

جدول (4-10): مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *Clavispora lusitaniae* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

نسبة التطابق	المنشأ	اسم السلالة	الرمز التسلسلي
	Iraq	<i>Clavispora lusitaniae</i>	MZ376949.1*
100%	UK	<i>Clavispora lusitaniae</i>	AY661439.1
99%	Australia	<i>Clavispora lusitaniae</i>	JN941110.1
98%	Framingham	<i>Clavispora lusitaniae</i>	M60306.1
98%	Indonesia	<i>Clavispora lusitaniae</i>	AB182297.2
97%	Belgium	<i>Clavispora lusitaniae</i>	M55526.1
97%	USA	<i>Clavispora lusitaniae</i>	NG_065595.1
97%	Switzerland	<i>Clavispora lusitaniae</i>	CP039622.1
97%	Switzerland	<i>Clavispora lusitaniae</i>	CP039656.1
97%	Netherlands	<i>Clavispora lusitaniae</i>	MW281677.1
96%	Egypt	<i>Clavispora lusitaniae</i>	KM516766.1
96%	China	<i>Clavispora lusitaniae</i>	KU147480.1
96%	Brazil	<i>Clavispora lusitaniae</i>	AF134718.1

* سلالة *Clavispora lusitaniae* (C.lusitaniae) المعزولة في هذه الدراسة .



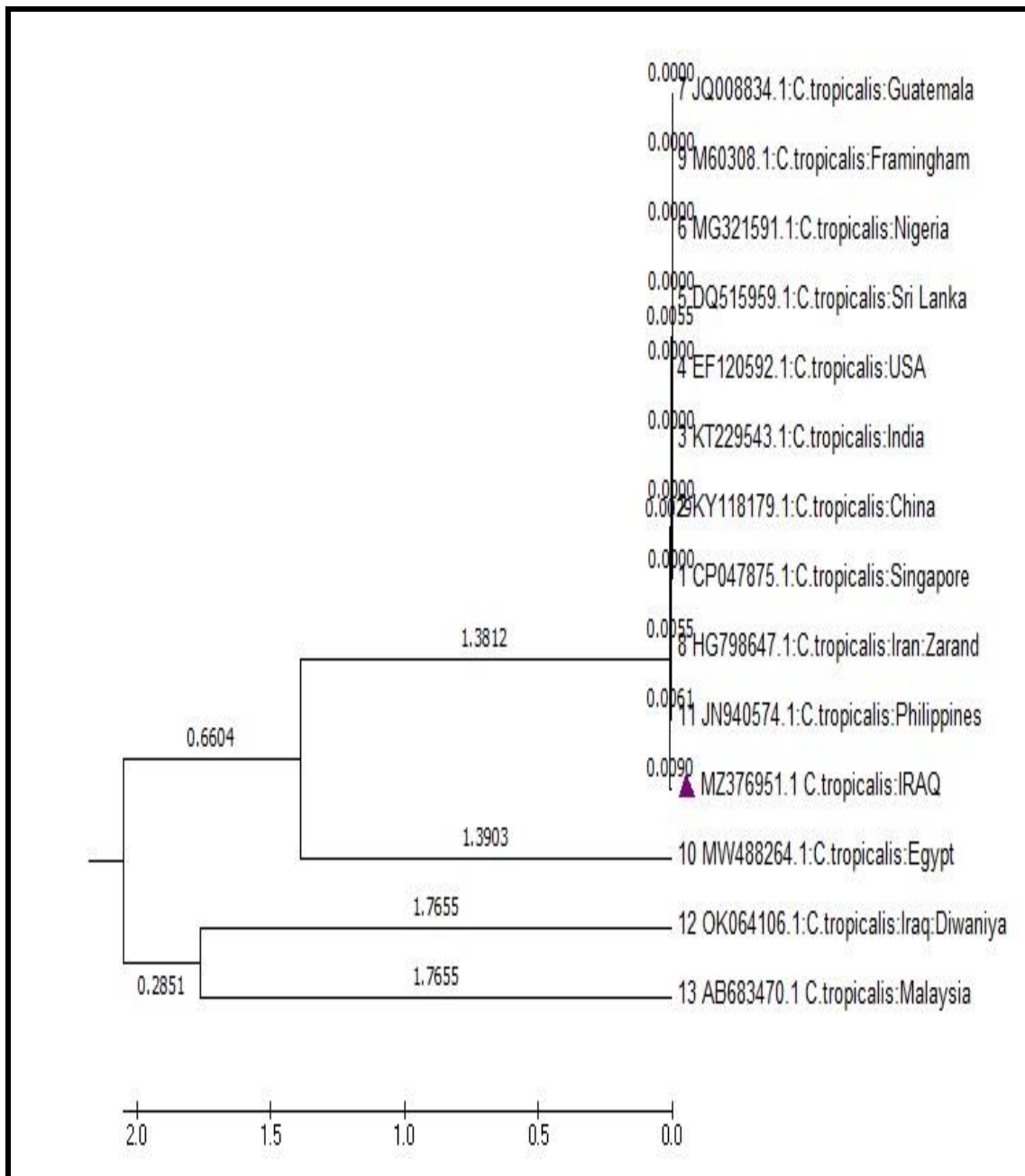
شكل (4-5): الشجرة الوراثية للفطر *Clavispora lusitaniae* (محددة بمثلث احمر) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية .

أثبتت نتائج تحليل تسلسل القواعد النايتروجينية ان الفطر *Candida tropicalis* المعزول في هذه الدراسة كان اقرب وراثيا بنسبة 97% مع عزلة الفطر المعزولة من الفلبين , بينما سجلت نسبة تشابه بلغت 96% مع عزلة فرامنغهام و95% مع عزلات مصر ونايجيريا وكواتيمولا في حين كانت نسبة التشابه 94% مع عزلات الصين والهند والولايات المتحدة الامريكية وسيريلانكا وسينغافورا والعراق -محافظة الديوانية وماليزيا وايران (جدول 4-11) (شكل 4-6).

جدول (4-11): مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *Candida tropicalis* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

نسبة التطابق	المنشأ	اسم السلالة	الرمز التسلسلي
	Iraq	<i>Candida tropicalis</i>	*MZ376951.1
%97	Philippines	<i>Candida tropicalis</i>	JN940574.1
%96	Framingham	<i>Candida tropicalis</i>	M60308.1
%95	Egypt	<i>Candida tropicalis</i>	MW488264.1
%95	Nigeria	<i>Candida tropicalis</i>	MG321591.1
%95	Guatemala	<i>Candida tropicalis</i>	MG321591.1
%94	Singapore	<i>Candida tropicalis</i>	CP047875.1
%94	China	<i>Candida tropicalis</i>	KY118179.1
%94	India	<i>Candida tropicalis</i>	KT229543.1
%94	USA	<i>Candida tropicalis</i>	EF120592.1
%94	SriLanka	<i>Candida tropicalis</i>	DQ515959.1
%94	Iran:Zarand	<i>Candida tropicalis</i>	HG798647.1
%94	Iraq:Diwaniya	<i>Candida tropicalis</i>	OK064106.1
%94	Malaysia	<i>Candida tropicalis</i>	AB683470.1

*:سلالة *Candida tropicalis* المعزولة في هذه الدراسة .



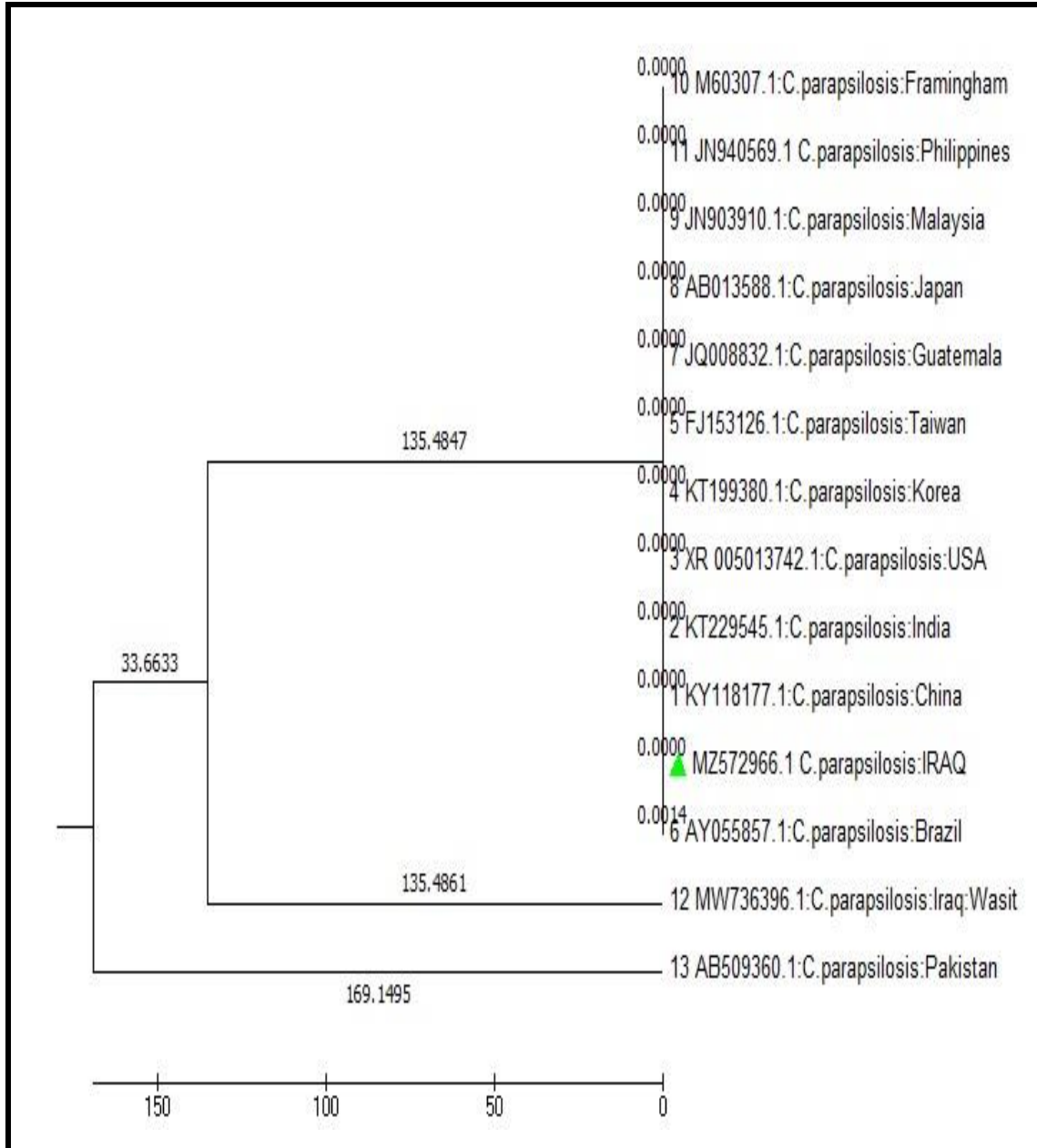
الشكل (4-6): الشجرة الوراثية للفطر *Candida tropicalis* (محددة بمثلث بنفسجي) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية

عند مقارنة نتائج تسلسل القواعد النيتروجينية للسلالة *Candida parapsilosis* المعزولة في الدراسة الحالية مع السلالات العالمية تبين ان هناك تشابها بنسبة 99% بين سلالة الدراسة والسلالة الفلبينية , وبنسبة 99% مع سلالات كوريا وكواتيمولا والولايات المتحدة وتايوان وبنسبة 97% مع السلالات المعزولة من الهند واليابان والبرازيل بينما كانت نسبة التشابه مع سلالة العراق - محافظة واسط وباكستان 95% (جدول 4- 12)(شكل 4-7).

جدول (4-12): مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *Candida parapsilosis* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

نسبة التطابق	المنشأ	اسم السلالة	الرمز التسلسلي
	Iraq	<i>C. parapsilosis</i>	MZ572966.1*
%99	Philippines	<i>C. parapsilosis</i>	JN940569.1
%98	Framingham	<i>C. parapsilosis</i>	M60307.1
%98	USA	<i>C. parapsilosis</i>	XR_005013742.1
%98	Malaysia	<i>C. parapsilosis</i>	JN903910.1
%98	Guatemala	<i>C. parapsilosis</i>	JQ008832.1
%98	Taiwan	<i>C. parapsilosis</i>	FJ153126.1
%98	China	<i>C. parapsilosis</i>	Ky118177.1
%98	Korea	<i>C. parapsilosis</i>	KT199380.1
%97	India	<i>C. parapsilosis</i>	KT229545.1
%97	Japan	<i>C. parapsilosis</i>	AB013588.1
%97	Brazil	<i>C. parapsilosis</i>	AY055857.1
%95	Iraq: Wasit	<i>C. parapsilosis</i>	MW736396.1
%95	Pakistan	<i>C. parapsilosis</i>	AB509360.1

* سلالة *Candida parapsilosis* المعزولة في هذه الدراسة .



شكل (4-7) : الشجرة الوراثية للفطر *C.parapsilosis* (محددة بمثلث اخضر) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية

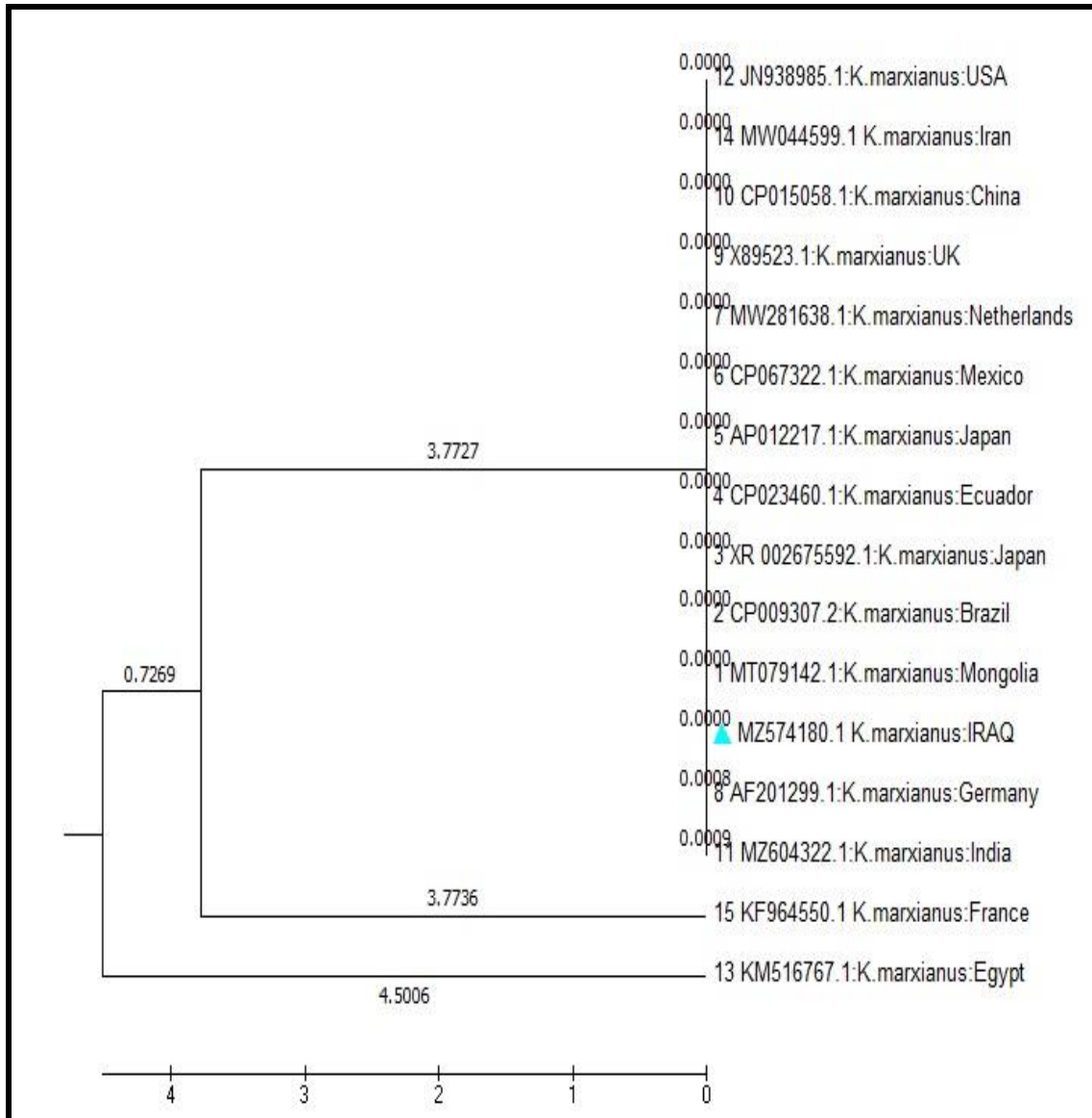
اما السلالة *Kluyveromyces marxianus*(*C.kefyr*) فقد أظهرت نسبة تشابه بلغت 100% مع السلالة المعزولة من ايران , وسجلت نسبة تطابق مع السلالات الهندية والفرنسية بلغت 99% و98% مع السلالة المعزولة من الولايات المتحدة وكما مبين في الجدول (4-13) , بينما كانت نسبة التشابه 97% مع السلالات المعزولة من المملكة المتحدة وهولندا والمكسيك ,

واليابان ومنغوليا والبرازيل وأكوادور وألمانيا في حين سجلت مع عزلات الصين ومصر نسبة تشابه بلغت 96% (شكل 4-8) .

جدول (4-13): مقارنة تسلسل القواعد النايتروجينية لمنطقة SrRNA للفطر *Kluyveromyces marxianus* المعزول في هذه الدراسة مع العزلات الأخرى التابعة للفطر نفسه والمسجله عالميا في NCBI

نسبة التطابق	المنشأ	اسم السلالة	الرمز التسلسلي
	Iraq	<i>K.marxianus</i>	MZ574180*
%100	Iran	<i>K.marxianus</i>	MW044599.1
%99	India	<i>K.marxianus</i>	MZ604322.1
%99	France	<i>K.marxianus</i>	KF964550.1
%98	USA	<i>K.marxianus</i>	JN938985.1
%97	UK	<i>K.marxianus</i>	X89523.1
%97	Netherland	<i>K.marxianus</i>	MW281638.1
%97	Mexico	<i>K.marxianus</i>	CP067322.1
%97	Japan	<i>K.marxianus</i>	AP012217.1
%97	Mongolia	<i>K.marxianus</i>	MT079142.1
%97	Brazil	<i>K.marxianus</i>	CP009307.2
%97	Ecuador	<i>K.marxianus</i>	CP023460.1
%97	Germany	<i>K.marxianus</i>	AF201299.1
%96	China	<i>K.marxianus</i>	CP015058.1
%96	Egypt	<i>K.marxianus</i>	KM516767.1

*: سلالة *Kluyveromyces marxianus* المعزولة في الدراسة الحالية .



شكل (4-8) : الشجرة الوراثية للفطر *K. marxianus* (محددة بمثلث سمائي) تبين العلاقة مع السلالات الفطرية العالمية

الى جانب أهمية التشخيص المظهري في حصر الفطريات قيد الدراسة في مجاميع اصغر فان هناك الكثير من المشاكل التي ترافق هذا التشخيص منها حاجة الباحث الى الخبرة العالية بعملية التشخيص خاصة في تشخيص الأنواع القريبة الشبه وحاجتها الى وقت وجهد كبيرين الا ان تشخيص الفطريات باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل يمتاز بالدقة العالية مما يساعد الباحث في التخلص من مشكلات التشخيص التي تواجهه باتباع الطرق التقليدية (Aslam, 2017). أشار (Khot 2009) الى ان عدوى الفطريات ومن بينها المبيضات تتغير مع زيادة استخدام الادوية المضادة للفطريات لذلك يجب استخدام طرائق تشخيصية قادرة على تشخيص

المسببات المرضية بصورة دقيقة وسريعة ومنها الطرائق الجزيئية مما يزيد من فرصة النجاح في اختيار العلاج المناسب المضاد للفطريات .

4.1.4: فحص حساسية عزلات المبيضات المعزولة تجاه المضادات الحياتية

باستعمال جهاز الفايتهك

في هذه الدراسة اجري اختبار فحص حساسية الأنواع المعزولة تجاه ستة أنواع من المضادات الفطرية بواسطة جهاز الفايتهك باستعمال بطاقة Vitek 2AST-YS08 (ملحق 9 و 10) وكما موضح في الجدول (4-14) ان جميع عزلات *C.albicans* اظهرت حساسيتها تجاه Fluconazole و Voriconazole , Micafungin و Caspufungin , بينما أظهرت 26 عزلة (89.7 %) حساسيتها تجاه الامفوتيريسين وعزلتين (6.9%) أظهرت مقاومة للامفوتيريسين وعزلة واحدة (3.4%) كانت معتدلة الحساسية اما بخصوص المضاد الفلوسايتوسين فقد أظهرت 3 عزلات منها مقاومتها لهذا المضاد (10.3%) وبقية العزلات (26 عزلة) كانت حساسة لهذا المضاد. وبمقارنة هذه النتائج مع دراسات أخرى جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ماتوصل اليه Adane & Yeshiwork (2018) و Faraj et al. (2020) وتخالف ماسجله (2011). Jeddy et al. و Sara et al. (2012) اذ كانت جميع عزلات المبيضات البيضاء المعزولة في دراستهم حساسة تجاه الامفوتيريسين والفلوكونازول , بينما في دراسة (2012). Badiee et al. اظهرت غالبية عزلات *C.albicans* مقاومتها للمضادات الاثراكونازول والفلوكونازول والامفوتيريسين والفوريكونازول , بينما توصل المقداد والكفري (2019) الى وجود مقاومة عالية للفلوسايتوسين بلغت نسبتها 96.4% .

كما اشارت النتائج الى ان جميع عزلات *C.dublinensis* أظهرت حساسية Voriconazole و Amphotericin B عدا المضاد Flucytosine اذ كانت 90% (9 عزلات) من العزلات حساسة وعزلة واحدة (10%) مقاومة. هذه النتيجة جاءت مطابقة لما توصل اليه (2012). Badiee et al. وتخالف ماسجله (2017). Mohamed et al. اذ كانت 27% من عزلات هذا الفطر مقاومة للفلوسايتوسين و 73% كانت حساسة .

اما الفطر *C.lusitaniae* فكانت جميع عزلاته حساسة تجاه Voriconazole و Flucytosine عدا عزلة واحدة منها مقاومة تجاه Amphotericin B بنسبة 14% وهذه النتيجة تتفق مع ماتوصل اليه (2016). Sundaram & Navaneethakrish من ناحية حساسية العزلة تجاه Voriconazole و Flucytosine و تخالف ماتوصل اليه بخصوص الامفوتيريسين اذ أكانت جميع عزلات هذا النوع في دراستهم حساسة للامفوتيريسين .

كما يتبين من الجدول (4-14) ان جميع عزلات *C.tropicalis* كانت حساسة تجاه Fluconazole و Voriconazole و Amphotericin B و Flucytosine بنسبة بلغت 100% في حين كانت عزلة واحدة متوسطة الحساسية Caspufungin وعزلة واحدة متوسطة الحساسية تجاه Micafungin وهذه النتيجة تتفق مع ماسجله Sundaram *et al.* (2016). وتخالف ماتوصل اليه Badiee *et al.* (2012) اذ سجلت 33.3% من عزلات هذا النوع مقاومة تجاه Fluconazole و Amphotericin B .

اما بخصوص الفطر *C.parapsilosis* كانت جميع عزلاته في هذه الدراسة حساسة تجاه جميع المضادات المدروسة عدا عزلة واحدة منها أظهرت حساسية متوسطة تجاه Caspufungin وهذه النتيجة تتفق بنسبة عالية مع ماتوصل اليه Sundaram *et al.* (2016). وتخالف ماتوصل اليه Badiee *et al.* (2012) اذ كانت اغلب العزلات مقاومة للفلوكونازول والامفوتيرييسين و Calgin & Yeliz (2018) سجلت جميع عزلات هذا الفطر في دراسته مقاومتها تجاه الـ Caspufungin. ومن ناحية أخرى فإن عزلة *C.kefyr* أظهرت حساسية تجاه Amphotericin B , Voriconazole وهذه النتيجة تخالف ماسجله Badiee *et al.* (2012) اذ سجل 10% من عزلات هذا النوع مقاومة للامفوتيرييسين و 5% مقاومة للفلوكونازول.

ان هذا الاختلاف في التحسس للمضادات الفطرية يعزى الى اختلاف موضع الإصابة والحالة الصحية للمرضى (المقداد والكفري, 2019) والى تطور المقاومة لدى هذه العزلات بسبب كثرة استخدام المضادات الحيوية (حبيب وجماعته, 2015).

جدول (4-14): فحص حساسية أنواع المبيضات المعزولة تجاه بعض المضادات الفطرية باستعمال جهاز الفايترك

الأنواع المضادات	<i>C.albicans</i>						<i>C.dubliniensis</i>						<i>C.lusitaniae</i>					
	الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة		الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة		الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة	
	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC
Fluconazole	29 (100)	1-≤0.5	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Voriconazole	29 (100)	≤0.12	-	-	-	-	10 (100)	≤0.12	-	-	-	-	7 (100)	≤0.12	-	-	-	-
Micafungin	29 (100)	≤0.06	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Amphotericin B	26 (89.7)	1-0.5	1 (3.4)	2	2 (6.9)	4	10 (100)	0.5- 0.25	-	-	-	-	6 (85.7)	0.5	-	-	1 (14.3)	>4
Capsufungin	29 (100)	≤0.25-0.12	-	-	-	-	10 (100)	≤0.25-0.12	-	-	-	-	*	*	*	*	*	*
Flucytosine	26 (89.7)	≤ 1	-	-	3 (0.4)	>32	9 (90)	≤ 1	-	-	1 (10)	>32	7 (100)	-	-	-	-	-
الأنواع المضادات	<i>C.kefyr</i>						<i>C. parapsilosis</i>						<i>C.tropicalis</i>					
	الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة		الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة		الحساسية		متوسطة الحساسية		المقاومة	
	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC	العدد (%)	قيمة MIC
Fluconazole	*	*	*	*	*	*	3 (100)	1	-	-	-	-	4 (100)	≤0.5	-	-	-	-
Voriconazole	1 (100)	≤0.12	-	-	-	-	3 (100)	≤0.12	-	-	-	-	4 (100)	≤0.12	-	-	-	-
Micafungin	*	*	*	*	*	*	3(100)	≤0.06	-	-	-	-	3(75)	≤0.06	-	-	-	-
Amphotericin B	1 (100)	0.5	-	-	-	-	3 (100)	1	-	-	-	-	4 (100)	≤0.25	-	-	-	-
Capsufungin	*	*	*	*	*	*	2 (66.7)	≤0.12	1 (33.3)	0.5	-	-	3 (75)	≤0.12	1 (25)	0.5	-	-
Flucytosine	*	*	*	*	*	*	3 (100)	≤ 1	-	-	-	-	4 (100)	≤ 1	-	-	-	-

*: تعني ان المضاد لم يعمل على الخميرة .

2.4: المستخلص النباتي لأوراق نبات الميريمية

1.2.4: الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة لمستخلص أوراق نبات الميريمية الخام

أظهرت نتائج الكشف عن بعض المركبات الفعالة في المستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الميريمية والموضحة في الجدول (4-15) عن وجود الصابونينات والتانينات والقلويدات والفينولات والكاربوهيدرات والكلايكوسيدات والراتنجات في المستخلص الكحولي وهذه النتيجة تتفق مع (Aziz *et al.*(2012) وMohammed *et al.*(2013) وجماعته (2019) وتخالف ماتوصل اليه خضير (2021) اذ سجل نتيجة سالبة للصابونينات و Rajagopalan *et al.*(2020) الذي توصل الى نتيجة سالبة لوجود القلويدات والكلايكوسيدات في المستخلص الكحولي .اما المستخلص المائي فقد بينت النتائج ان جميع المركبات المذكورة في الجدول (4-15) أعطت نتيجة موجبة عدا الكشف عن القلويدات والفينولات التي أعطت نتيجة سالبة . هذه النتائج جاءت متفقة تماما مع ماتوصل اليه خضير(2021) وتخالف (Aziz *et al.*(2012) و Kahdim *et al.*(2016) اذ سجل في دراسته للمستخلص المائي نتائج إيجابية للقلويدات والفينولات هذا الاختلاف قد يعزى الى مكان زراعة النبات ووقت جمعه إضافة التي طريقة الاستخلاص ونوع المذيب المستخدم .

أشار (Jakovljevic *et al.*(2019) الى أن أوراق نبات الميريمية تحتوي على عدد من المركبات الفعالة التي يمكن تصنيفها الى تربينات والتي تصنف بدورها الى تربينات أحادية وتشمل carnolic acid , α - and B - thujone , 1,8 - cineole , camphor , rosmadial , manool carnosol وتربينات ثلاثية تشمل oleanolic acid و ursolic acid , والمكونات الفينولية التي يمكن تصنيفها الى مجموعتين هما: الحوامض الفينولية وتشمل caffeic , vanillic , ferulic , rosmarinic acids و الفلافونيدات ومن اغلبها شيوعا هي luteolin , apigenin , quercetin . وغالبية هذه المركبات الفعالة ذات أهمية احيائية فهي تستخدم كمضادات للأكسدة ومضادات للجراثيم والفطريات والفيروسات ومضادات للالتهابات وتعد مركبات الفلافونويد ومركبات البوليفينول هي المسؤولة عن الخصائص المضادة للميكروبات (El-feky & Aboulthana, 2016).

الجدول (4-15):الكشف الكيميائي التمهيدي عن المركبات الفعالة في المستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريمية

المستخلص المختبر		دليل الكشف	الكاشف	المركبات الفعالة
المائي	الكحولي			
+	++	ظهور رغوة	الرغوة	الصابونينات
+	++	راسب أبيض هلامي	خلات الرصاص	التانينات
-	++	راسب بني	كاشف واكنر	القلويدات
-	++	راسب اخضر مزرق	كلوريد الحديدك	الفينولات
+	+++	اللون الأحمر البني	الفينول مع حامض الكبريتيك	الكاربوهيدرات
+	+++	راسب أحمر	كاشف بندكت	الكلايكوسيدات
+	++	ظهور عكارة	كحول أثيلي مع حامض الهيدروكلوريك	الراتنجات
+	+++	اللون الأصفر الدكن	كحول أثيلي وهيدروكسيد البوتاسيوم.	الفلافونيدات

+ :موجود بكميات قليلة , ++ : موجود , +++ : موجود بكميات كبيرة , -: غير موجود.

2.2.4: اختبار فعالية المستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المعزولة

أجريت دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريمية على أنواع المبيضات المعزولة من حالات داء المبيضات الفموي باستخدام طريقة الانتشار في الاكاربوساطة الحفر وتم انتخاب عزلة واحدة من السلالات الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين ,من كل نوع من أنواع المبيضات المعزولة كما مبين في الجدول (4-16). ويتضح من النتائج ان هنالك فروقات معنوية واضحة في تأثير المستخلصات على أنواع المبيضات الحساسة لمضاد الامفوتيريسين , وبين المستخلصات وكذلك بين التراكيز المستخدمة, اذ أظهر المستخلص الكحولي كفاءة عالية في تثبيط نمو كافة الأنواع المختبرة مقارنة بفعالية المستخلص المائي ومعاملة السيطرة , إذ سجلت جميع التراكيز المختبرة تأثيرا واضحا في تثبيط أنواع المبيضات وهذا التأثير يزداد بزيادة التركيز اذ سجل اقل معدل للفعالية التثبيطية عند التركيز 10 ملغم/مل لكل من *C.albicans* و *C.dubliniesis* و *C.lusitaniae* و *C.tropicalis* و *C.parapsilosos* و *C.kefyr* بلغ (14 , 16,16 , 15,16,18) ملم على التوالي , بينما بلغت أعلى فعالية تثبيطية للمستخلص الكحولي عند التركيز 100 ملغم /مل لكل من *C.albicans* و *C.dubliniesis* و *C.lusitaniae*

و *C.tropicalis* و *C.parapsilosos* و *C.kefyr* , بمعدل أقطار تثبيط بلغت (18, 19, 18, 20, 21) ملم على التوالي (شكل 4-9) .

أما المستخلص المائي البارد كان تأثيره أقل مقارنة بالمستخلص الكحولي فقد تبين ان التركيز 10 ملغم / مل لم يؤثر في جميع الأنواع المختبرة , التركيز 25 ملغم / مل أظهر فعالية تثبيطية بمعدل أقطار بلغت 10, 10, 11, 10 ملم تجاه ثلاثة فقط من الأنواع الفطرية وهي *C.lusitaniae* و *C.parapsilosos* و *C.kefyr* على التوالي , بينما التركيز 50 ملغم / مل أظهر معدل تثبيط بلغ 10, 11, 10, 12 ملم على التوالي تجاه كل من *C.lusitaniae* و *C.tropicalis* و *C.parapsilosos* و *C.kefyr* في حين لم يؤثر هذا التركيز على نمو النوعين *C.albicans* و *C.dubliniesis* , أما التركيز 75 فقد أظهر فعالية تثبيطية تجاه الأنواع *C.dubliniesis* و *C.lusitaniae* و *C.tropicalis* و *C.parapsilosos* و *C.kefyr* وبمعدل أقطار تثبيطية بلغت 10, 11, 11, 14, 10 ملم على التوالي بينما لم يؤثر هذا التركيز على الفطر *C.albicans* , وبخصوص التركيز 100 ملغم / مل فقد أظهر فعالية تجاه جميع الأنواع المختبرة بلغت معدل أقطارها 10, 11, 15, 11, 12, 12 ملم على التوالي كما مبين في الشكل (4-9 , 4-10) .

أما بالنسبة لأنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين فقد أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4-17) وجود فروقات معنوية بين الأنواع وتراكيز المستخلصات إذ أظهر المستخلص الكحولي أيضا فعالية في تثبيط الأنواع المقاومة مقارنة بفعالية المستخلص المائي حيث سجلت سلالات النوعين *C.albicans* و *C.lusitaniae* المقاومة للامفوتيريسين اقل معدل تثبيط بلغ 12 و 15 ملم على التوالي عند التركيز 10 ملغم / مل وأعلى معدل تثبيط بلغ 16 و 17 ملم عند التركيز 100 ملغم / مل في حين تحسس *C.albicans* للمستخلص المائي عند التركيز 100 ملغم / مل اذ سجل معدل تثبيط بلغ 10 ملم ولم يظهر أي تحسس للتراكيز الأدنى , بينما سلالة النوع *C.lusitaniae* تحسست للتركيز 75 ملغم / مل بمعدل تثبيط بلغ 9 ملم ولم تظهر أي فعالية تجاه التراكيز الأدنى (الشكل 4-9 , 4-11) .

هذه النتائج توافقت مع ماتوصل اليه عدد من الباحثين منهم علي وعبود (2010) و Aziz et al.(2012) و Mohammad et al.(2013) و شهاب وصالح (2013) و Haziri et al.(2018) و جمعة وجماعته (2019) و Verkhovodovoda et al.(2019) , وخالفت ماتوصل اليه (2008) Unver et al. و Jasim & Abd-alkhaliq(2011) و شوكت وجماعته (2012) الذين أشاروا الى كفاءة المستخلص المائي لاوراق نبات الميريمية في تثبيط نمو الفطريات . أشار أحمد وآخرون (2008) الى أن تفوق تأثير المستخلص الكحولي على المائي يعزى سببه الى تمكن كحول الايثانول من إذابة عدد من المواد الفعالة مثل التربينات وتجمعها في المستخلص الخام

وبكميات كافية لحدوث الفعل التثبيطي . مع الاخذ بالحسبان أن نسبة المكونات الفعالة في المستخلص النباتي تعتمد على الموقع وطريقة الاستخلاص وعوامل الاستخلاص منها درجة الحرارة وزمن الاستخلاص , وتركيب المذيب وحجم جزيئات مسحوق النبات ونسبة مستخلص النبات الى المذيب (Jakovljevic et al.,2019) . وأشار شهاب وصالح (2013) الى أن عدم تحسس الأنواع للمستخلص المائي عند غالبية التراكيز يعود الى الانتشار القليل في الاكار أو أن الأوراق الطرية الطازجة تحتوي مركبات فعالة ربما تتأثر أو تختفي في أثناء خطوات الاستخلاص.

جدول (4-16): الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيرييسين

LSD	التركيز (ملغم /مل)							الفطر		
	C2	C1	100	75	50	25	10			
	معدل أقطار التثبيط (ملم)									
بين الفطريات وتراكيز المستخلص المائي=3.477*		0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00	مائي	<i>C.albicans</i>	
		0.00		18.00	17.00	15.00	15.00	14.00	كحولي	
		0.00		11.00	10.00	0.00	0.00	0.00	مائي	<i>C.dubliniensis</i>
		0.00		19.00	18.00	17.00	17.00	16.00	كحولي	
		0.00		15.00	14.00	12.00	11.00	0.00	مائي	<i>C.lusitaniae</i>
		0.00		18.00	18.00	17.00	16.00	16.00	كحولي	
بين الفطريات وتراكيز المستخلص الكحولي= n.s		0.00		11.00	11.00	10.00	0.00	0.00	مائي	<i>C.tropicalis</i>
		0.00		21.00	20.00	18.00	17.00	18.00	كحولي	
		0.00		12.00	11.00	11.00	10.00	0.00	مائي	<i>C.parapsilosis</i>
		0.00		20.00	18.00	18.00	17.00	16.00	كحولي	
التداخل بين المستخلص والتركيز=0.89*		0.00		12.00	11.00	10.00	10.00	0.00	مائي	<i>C.kefyr</i>
		0.00		21.00	20.00	20.00	18.00	15.00	كحولي	
LSD	للتداخل بين الفطريات والمستخلص=0.51*			P.V.*بين المستخلصات=0.00			للتراكيز=0.32*		للفطريات=0.31*	

C1: معاملة سيطرة الماء المقطر المعقم , C2: معاملة سيطرة DMSO

n.s: عدم وجود فروقات معنوية . *: وجود فروقات معنوية.

جدول (4-17): الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي لاوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين

الفطر	المستخلص	التركيز ملغم /مل					
		C2	C1	100	75	50	25
LSD بين الفطريات والمستخلص *0.7212=	معدل أقطار التثبيط (ملم)						
	مائي	0.00	10.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	كحولي	0.00	16.00	16.00	15.00	15.00	12.00
	مائي	0.00	11.00	9.00	0.00	0.00	0.00
<i>C.albicans</i>	كحولي	0.00	17.00	16.00	16.00	15.00	15.00
<i>C.lusitaniae</i>	كحولي	0.00	17.00	16.00	16.00	15.00	15.00
LSD بين المستخلص والتركيز=0.72 *		p.v. بين الفطريات = **n.s (0.05)					
		بين المستخلصات * 0.00=p.v. (0.05)					

C1 : معاملة سيطرة الماء المقطر المعقم , C2:معاملة سيطرة DMSO

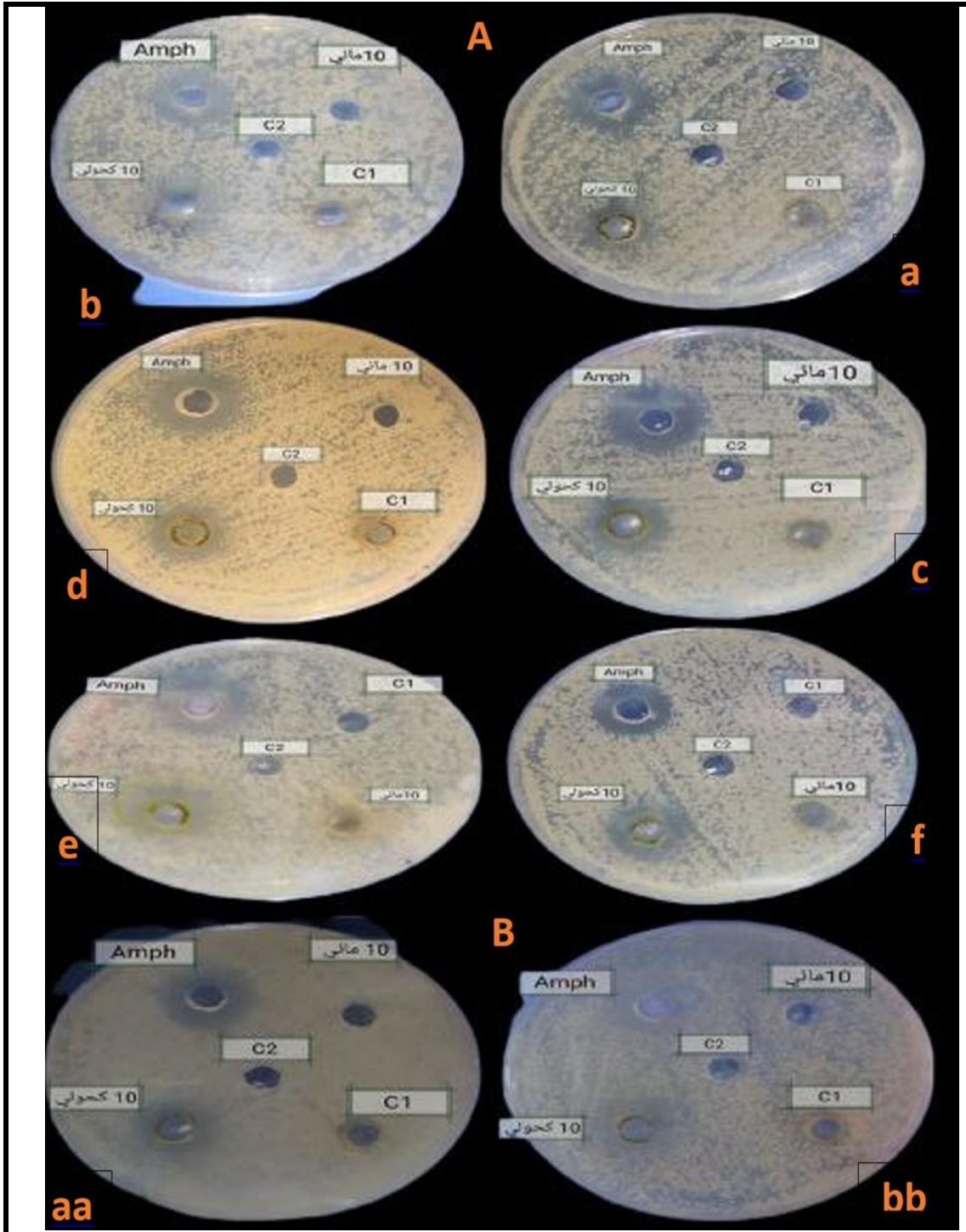
*: وجود فروقات معنوية , **: عدم وجود فروقات معنوية .

تم اختيار المستخلص الكحولي لكفاءته في التثبيط , والتركيز 10 ملغم /مل لكونه أقل تركيز أعطى فعالية تثبيطية ضد جميع الأنواع المختبرة بطريقة الحفر للمقارنة مع تأثير المضاد الفطري الامفوتيريسين وبالتركيز نفسه. وتبين أن فعالية المستخلص الخام التي بلغ معدل أقطارها 14, 16, 16, 18, 15 ملم تجاه *C.albicans* و *C.dublinensis* و *C.lusitaniae* و *C.tropicalis* و *C.parapsilosis* و *C.kefyr* الحساسة للامفوتيريسين و 12 و 15 ملم تجاه *C.albicans* و *C.lusitaniae* المقاومة للامفوتيريسين وكانت أقل من فعالية مضاد الامفوتيريسين التي بلغت 19.5, 21, 22, 20.5, 20, 18 ملم للأنواع الحساسة و 17 و 19 ملم للأنواع المقاومة على التوالي كما موضح في الجدول (4- 18) والشكل (4-9a, b). هذه النتيجة تخالف ماتوصل اليه جمعة وجماعته (2019) اذ كانت فعالية المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميريمية بتركيز 10% و 20% مقاربه للفعالية التثبيطية للمضاد الحيوي و (2019). Oliveira et al. اذ سجل في دراسته نسبة تثبيط بلغت 100% تجاه النوعين *C.albicans* و *C.tropicalis* عند التركيز 50 ملغم /مل في حين لم يسجل أي فعالية تثبيطية عند التركيز الأقل من 12.5 ملغم /مل .

جدول (4-18): الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية والمضاد الفطري الامفوتيريسين B ضد أنواع المبيضات المعزولة

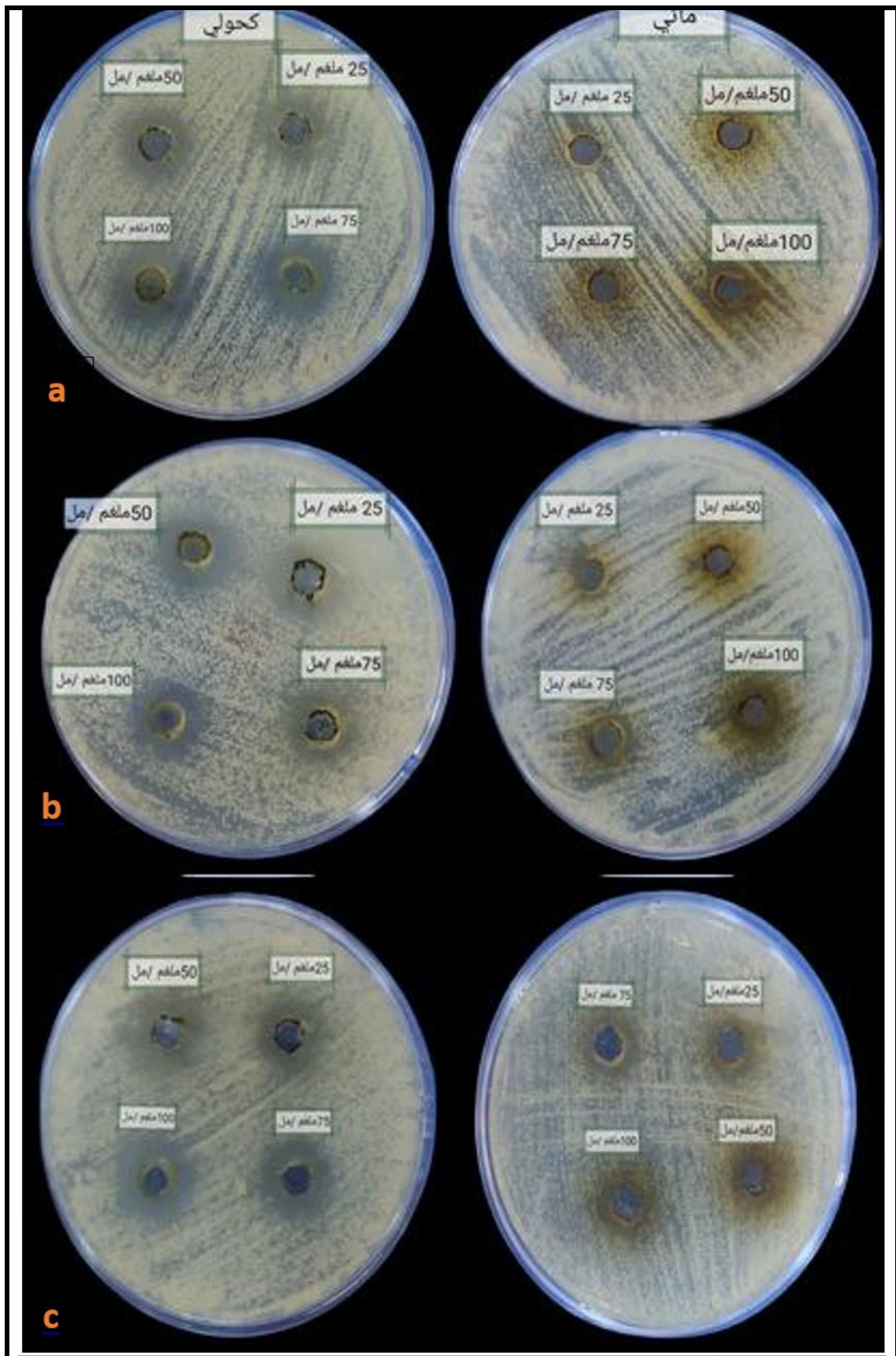
السلالات الحساسة	المستخلص الكحولي (10 ملغم /مل)	الامفوتيريسين B (10ملغم /مل)	معاملة السيطرة (DMSO)	قيمة LSD بين كل سلالة والمعاملات
				معدل أقطار التثبيط (ملم)
<i>C.albicans</i>	14.00	19.5	0.00	*1.41
<i>C.dubliniesis</i>	16.00	21.00	0.00	*1.07
<i>C.lusitaniae</i>	16.00	22.00	0.00	*1.73
<i>C.tropicalis</i>	18.00	20.5	0.00	*0.68
<i>C.parapsilosis</i>	16.00	20.00	0.00	*4.53
<i>C.kefyr</i>	15.00	18.00	0.00	*2.06
السلالات المقاومة				
<i>C.albicans</i>	12.00	17.00	0.00	*0.92
<i>C.lucitaniae</i>	15.00	19.00	0.00	*1.32

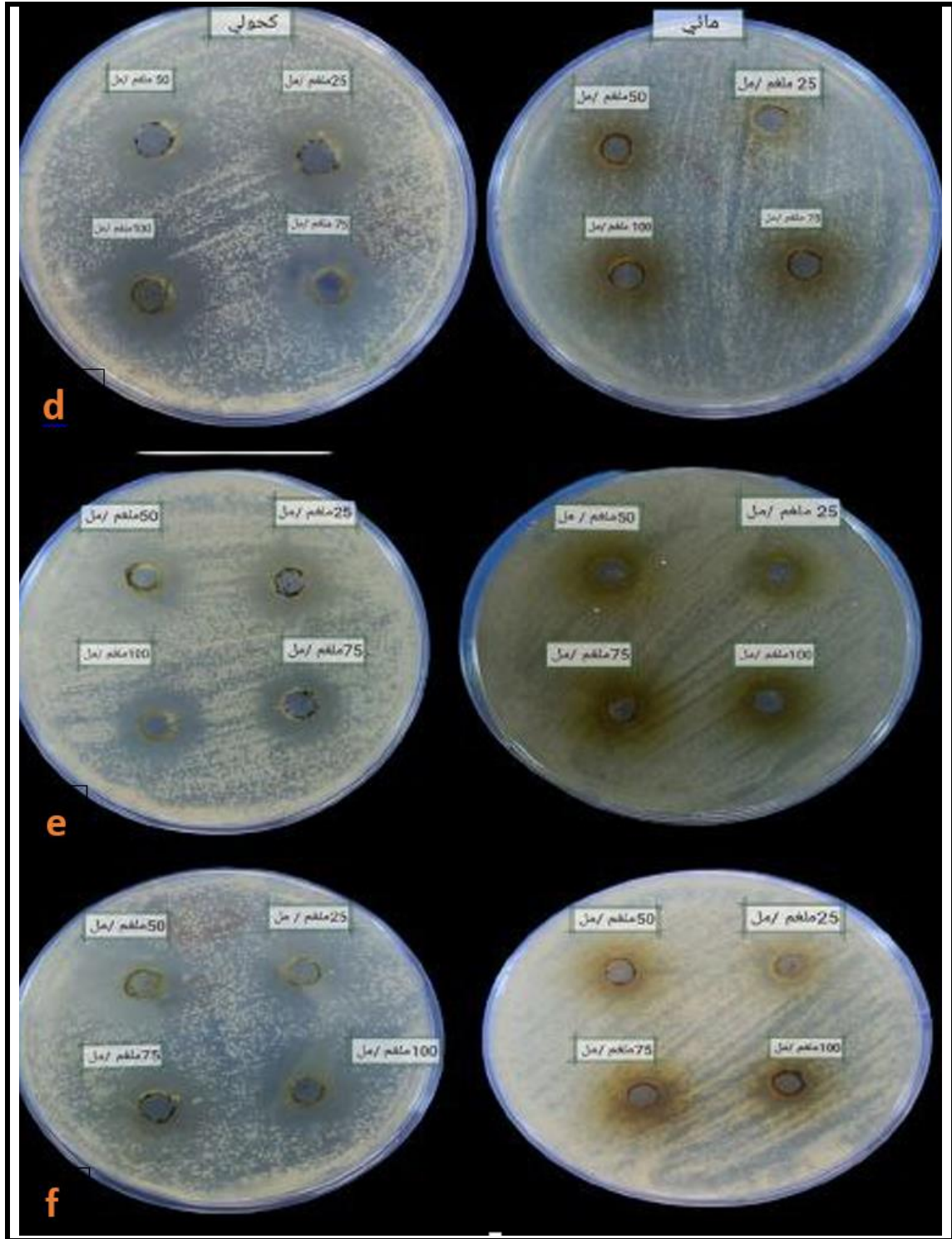
* : وجود فروقات معنوية.



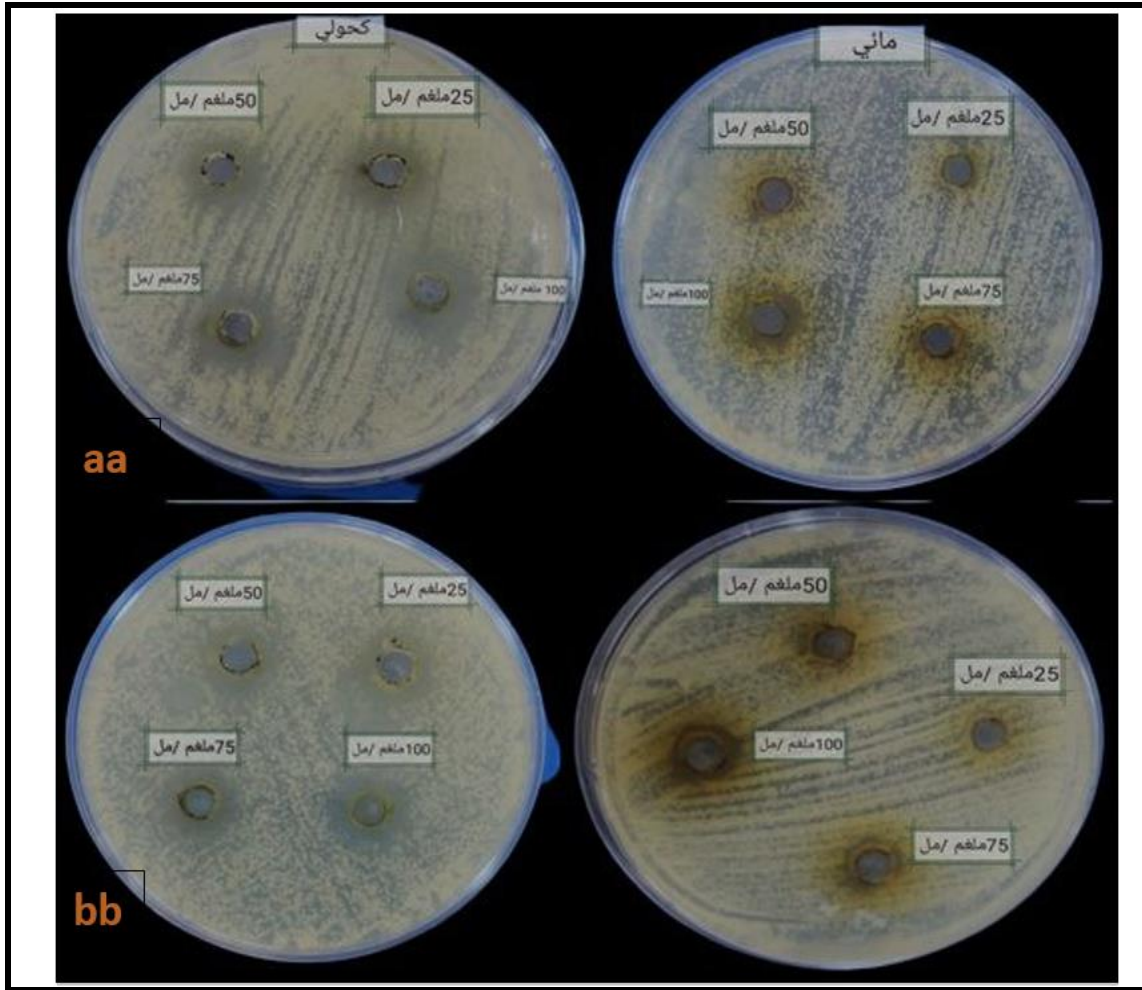
شكل (4-9) A: -الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق نبات الميرمية بتركيز 10 ملغم /مل ضد أنواع المبيضات A- الحساسة للامفوتيريسين =a *C.albicans* , =b, *C.dubliniensis*, =c *C.lusitanae*, =d *C.tropicalis*, =e, *C.parapsilosos*, =f, *C.kefy*.

B – المقاومة للامفوتيريسين ومقارنتها مع فعالية الامفوتيريسين *C.albicans* = aa, bb= *C.lusitanae*





الشكل (4-10): تأثير تراكيز المستخلص المائي والكحولي الخام ضد أنواع المبيضات الحساسة لمضاد الامفوتيرييسين. $C. dubliniensis = a$, $C. albicans = b$, $C. tropicalis = d$, $C. lusitaniae = c$, $C. kefyr = f$, $C. parapsilosos = e$.



الشكل (4-11): تأثير تراكيز المستخلص المائي والكحولي الخام على أنواع المبيضات المقاومة لمضاد الامفوتيري سين . $C.lusitaniae=bb$, $C.albicans=aa$

3.2.4 : تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المعزولة

من خلال النتائج الموضحة في الجدول (4-19) تبين أن هنالك تباينا في القيم المسجلة للتركيز المثبط والقاتل الأدنى ضد الأنواع المرضية المعزولة. إذ سجلت قيم ال MIC للمستخلص الكحولي الخام تجاه السلالات $C.lusitaniae$, $C.dubliniensis$, $C.albicans$, $C.kefyr$, $C.parapsilosis$, $C.tropicalis$ ، بلغت 25, 25 ، 12.5 ، 12.5 ، 12.5 ، 12.5 مايكروغرام /مل على التوالي ويتضح بذلك أن الأنواع $C.lusitaniae$ ، $C.tropicalis$ ، $C.parapsilosis$ ، $C.kefyr$ هي الأكثر تحسنا مقارنة بباقي الأنواع ، في حين بلغت قيمة MFC للأنواع المذكورة أعلاه والتي بلغت 50 ، 50 ، 25 ،

25 , 25 , 25 مايكروغرام/مل على التوالي , وفيما يخص الأنواع المقاومة للامفوتيريسين (جدول 4-20) بلغت قيمة التركيز المثبط الأدنى 200 و 50 مايكروغرام /مل لكل من *C.albicans* و *C.lusitaniae* على التوالي , فيما بلغت قيم التركيز القاتل 400 مايكروغرام /مل , 100 مايكروغرام /مل وعلى التوالي للأنواع أنفة الذكر. وبذلك نجد أن السلالات الحساسة لمضاد الامفوتيريسين أكثر استجابة لفعالية المستخلص النباتي مقارنة بالسلالات المقاومة .

عند مقارنة نتيجة الدراسة الحالية مع دراسة باحثين اخرين تبين وجود اختلاف في قيم التركيز المثبط والقاتل الأدنى كما في دراسة (Velickovic et al.(2003) اذ بلغت قيمة التركيز المثبط الأدنى للفطر *C. albicans* 40 مايكروغرام /مل والتركيز القاتل الأدنى بلغ 80 مايكروغرام /مل والباحث (jasim & Abdul- Alkaliq (2011) سجل قيمة لل MIC و MFC تجاه الفطر *C.albicans* بلغت 15 , 25 ملغم /مل على التوالي و Badiee et al. (2012) الذين سجلوا قيم للتركيز المثبط الأدنى بلغت 31.3 , 1.9 , 3.9 , 31.3 مايكروغرام /مل تجاه الأنواع *C. krusei* , *C. albicans* , *C. glabrata* , *C. parapsilosis* وعلى التوالي , أما (Martins et al.(2015) فقد سجل قيم لل MIC تجاه الأنواع *C.tropicalis* , *C.parapsilosis* , بلغت 2.5 , 1.25 ملغم /مل , و (Randhawa et al.(2018) بلغت قيمة التركيز المثبط الأدنى المسجلة في دراسته 20 ملغم /مل تجاه الفطر *C. albicans* بينما (Almeida et al. (2019) بلغت قيم التركيز المثبط الأدنى المسجلة في دراسته 1 ملغم /مل لكل الأنواع *Candida albicans* , *Candida glabrata* , *Candida guilliermond* , *Candida krusei* , *Candida tropicalis* في حين سجلت قيم للتركيز القاتل الأدنى بلغت 2 ملغم /مل تجاه الأنواع المذكورة أعلاه. أما (Elkelany et al.(2020) سجلت في دراسته قيمة للتركيز المثبط الأدنى بلغت 0.625 ملغم /مل تجاه الفطر *C.albicans* .

أن هذا الاختلاف في النتائج يمكن أن يعزى الى عوامل مختلفة منها متعلقة بالنبات ومنها مايتعلق بالميكروب او الطريقة المستخدمة ومنها متعلقة بالظروف البيئية التي تتمثل بالموسم والمناخ ونوع التربة ودرجة الحرارة والهواء, إذ أن أنتاج المنتجات الايضية الثانوية من قبل النبات يكون نتيجة تفاعل النبات مع البيئة أو استجابة لعوامل كيميائية وبيولوجية (Almeida et al. 2019).

وعند مقارنة تأثير المستخلص الخام مع فعالية مضاد الامفوتيريسين تبين أن قيم التركيز المثبط الأدنى للمستخلصات تعادل 2-4 أضعاف قيم ال MIC للامفوتيريسين وكما موضح في

الجدول (4-19) اذ تبين أن التركيز المثبط الأدنى لمضاد الامفوتيريسين للأنواع الحساسة , *C.parapsilosis* , *C.tropicalis* , *C.lusitaniae* , *C.dubliniensis*, *C. albicans* كانت *C.kefyr* 0.781 , 0.3905 , 0.781 , 0.781 , 0.1953 , 0.1953 مايكروغرام /مل لكلا منها وعلى التوالي , أما قيم التركيز القاتل الأدنى فبلغت 1.562 , 0.3905 , 0.3905 , 1.562 , 0.781 , 1.562 , أما فيما يخص السلالات المقاومة للامفوتيريسين (جدول 4-20) فقد سجلت قيم للتركيز المثبط الأدنى للأنواع *C. albicans* و *C.lusitaniae* بلغت 6.25 , 3.125 مايكروغرام /مل على التوالي في حين كانت قيم التركيز القاتل الأدنى 12.5 و 6.25 مايكروغرام /مل لكلا النوعين .

جدول (4-19): قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل للفطريات الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام والمضاد الفطري الامفوتيريسين من أوراق نبات الميرمية ضد أنواع المبيضات الحساسة

أنواع المبيضات						نوع التركيز	نوع المعاملة
<i>C.albicans</i>	<i>C.dubliniensis</i>	<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.kefyr</i>		
التركيز مايكروغرام /مل							
12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	MIC	مستخلص كحولي خام
25	25	25	25	50	50	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
0.781	0.3905	0.781	0.781	0.1953	0.1953	MIC	المضاد الحيوي الامفوتيريسين
1.562	0.781	1.562	1.562	0.3905	0.3905	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) , C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي).

+ : ظهور النمو , - : عدم ظهور النمو.

(MIC) : التركيز المثبط الأدنى , (MFC) : التركيز القاتل للفطريات الأدنى .

جدول (4-20): قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل للفطريات الأدنى (MFC) للمستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية والمضاد الفطري ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيرييسين

أنواع المبيضات		نوع التركيز	نوع المعاملة
<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.albicans</i>		
التركيز مايكروغرام /مل			
50	200	MIC	مستخلص
100	400	MFC	كحولي خام
+	+	C1	
-	-	C2	
3.125	6.25	MIC	المضاد
6.25	12.5	MFC	الحيوي
+	+	C1	الامفوتيرييسين
-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) ، C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي).

+ : ظهور النمو ، - : عدم ظهور النمو.

(MIC) : التركيز المثبط الأدنى ، (MFC) : التركيز القاتل للفطريات الأدنى .

4.2.4 : تجزئة المستخلص الكحولي النباتي الخام

1.4.2.4: تجزئة المستخلص الكحولي النباتي الخام باستخدام تقنية VLC

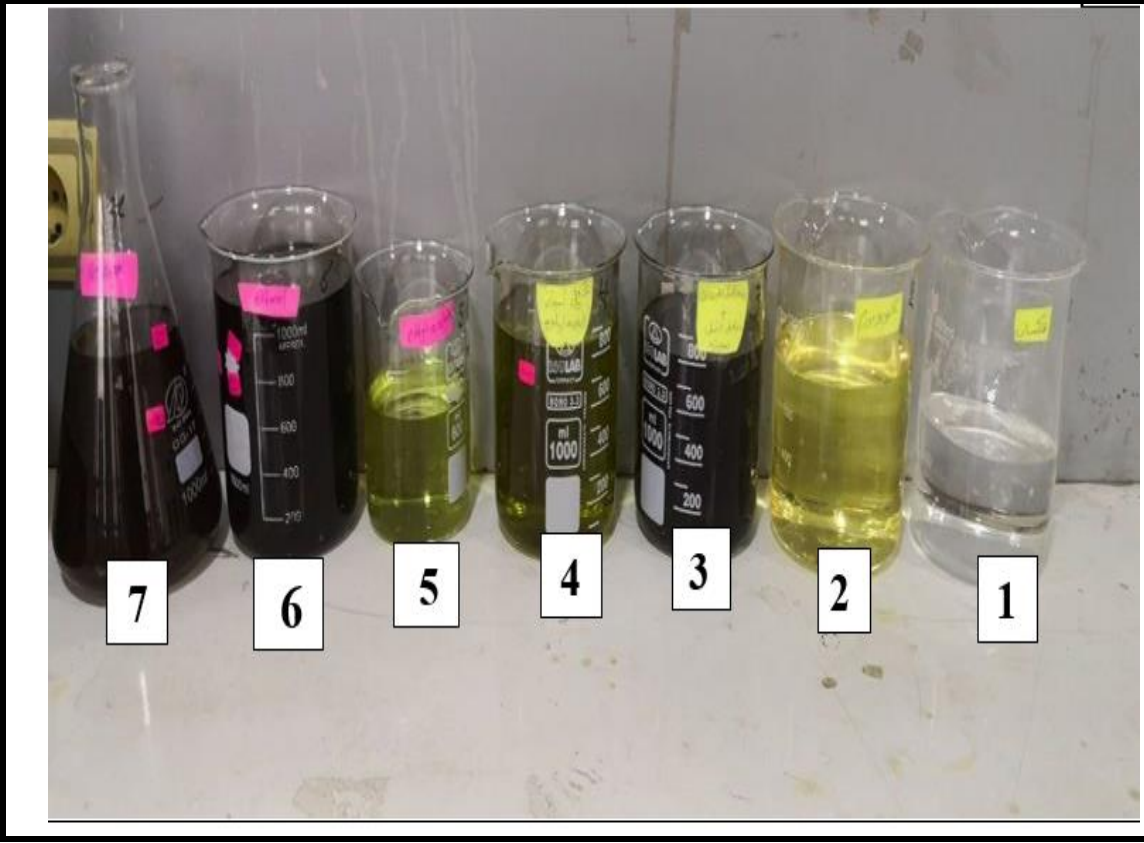
تحتوي المنتجات الطبيعية النباتية على مزيج معقد من المركبات الفعالة وهذه المركبات ينبغي فصلها وتنقيتها لغرض التعرف على أهميتها العلاجية وقد استخدمت تقنيات مختلفة لفصل المركبات وتنقيتها ومن هذه التقنيات تقنية الكروماتوغرافيا السائل تحت الضغط المتخلخل (VLC) التي تتميز ببساطتها وسرعتها وسعة استخدامها في الفصل وإمكانية استخدامها لفصل التربينات والقلويدات والفلافونيدات والكلايكوسيدات والليمونينات (Maurya et al., 2018) ، (Mroczek et al., 2020 ; Ghareeb et al. 2018).

يحتوي نبات الميريمية على مركبات فعالة متعددة ولغرض فصل هذه المركبات وتنقيتها أجريت الخطوة الأولى والتي تضمنت تجزئة المستخلص الكحولي الخام الذي أظهر كفاءة في تثبيط أنواع المبيضات المعزولة في هذه الدراسة ، الى أجزاء متعددة اعتمادا على القطبية

وباستعمال تقنية VLC وبتمرير سبعة أنظمة فصل ذات قطبية مختلفة وبالتدرج بدءاً من الأقل قطبية وهو الهكسان ثم الهكسان : كلوروفورم , والكلوروفورم , والكلوروفورم : أثيل أسيتيت , والأثيل أسيتيت , والإيثانول , وأخيراً الميثانول الأعلى قطبية (, Abubaker & Haque , 2020). وتم تجفيف كل جزء وتثبيت الوزن واللون والقوام لكل جزء تم الحصول عليه في الجدول (4-21) والشكل (4-12). ويتبين من الجدول أن أكبر كمية تم جمعها من عملية التجزئة تعود لجزء الأثيل أسيتيت وبلغت 5.7 غرام وتلاه جزء الإيثانول بمقدار 5 غرام ثم جزء الكلوروفورم : أثيل أسيتيت بمقدار 4.8 غرام و جزء الميثانول بمقدار 4 غرام في حين كانت أقل كمية تم جمعها تعود للجزءين الهكسان و الهكسان : كلوروفورم وتكون شمعية القوام وهذا يعزى الى وجود الزيوت والليبيدات .

جدول (4-21) : أجزاء المستخلصات الناتجة من عملية التجزئة بتقنية الكروماتوغرافيا (VLC)

أجزاء المستخلص	الوزن (غرام)	اللون والقوام بعد التجفيف
الهكسان	0.3	أبيض- شمعي
الهكسان : كلوروفورم	0.3	أصفر مخضر-لزج
كلوروفورم	0.6	أخضر داكن - لزج
كلوروفورم : أثيل أسيتيت	4.8	أخضر مصفر غامق-مسحوق
أثيل أسيتيت	5.7	أخضر مصفر فاتح- مسحوق
إيثانول	5.0	أخضر داكن - لزج
ميثانول	4.0	أخضر داكن - لزج



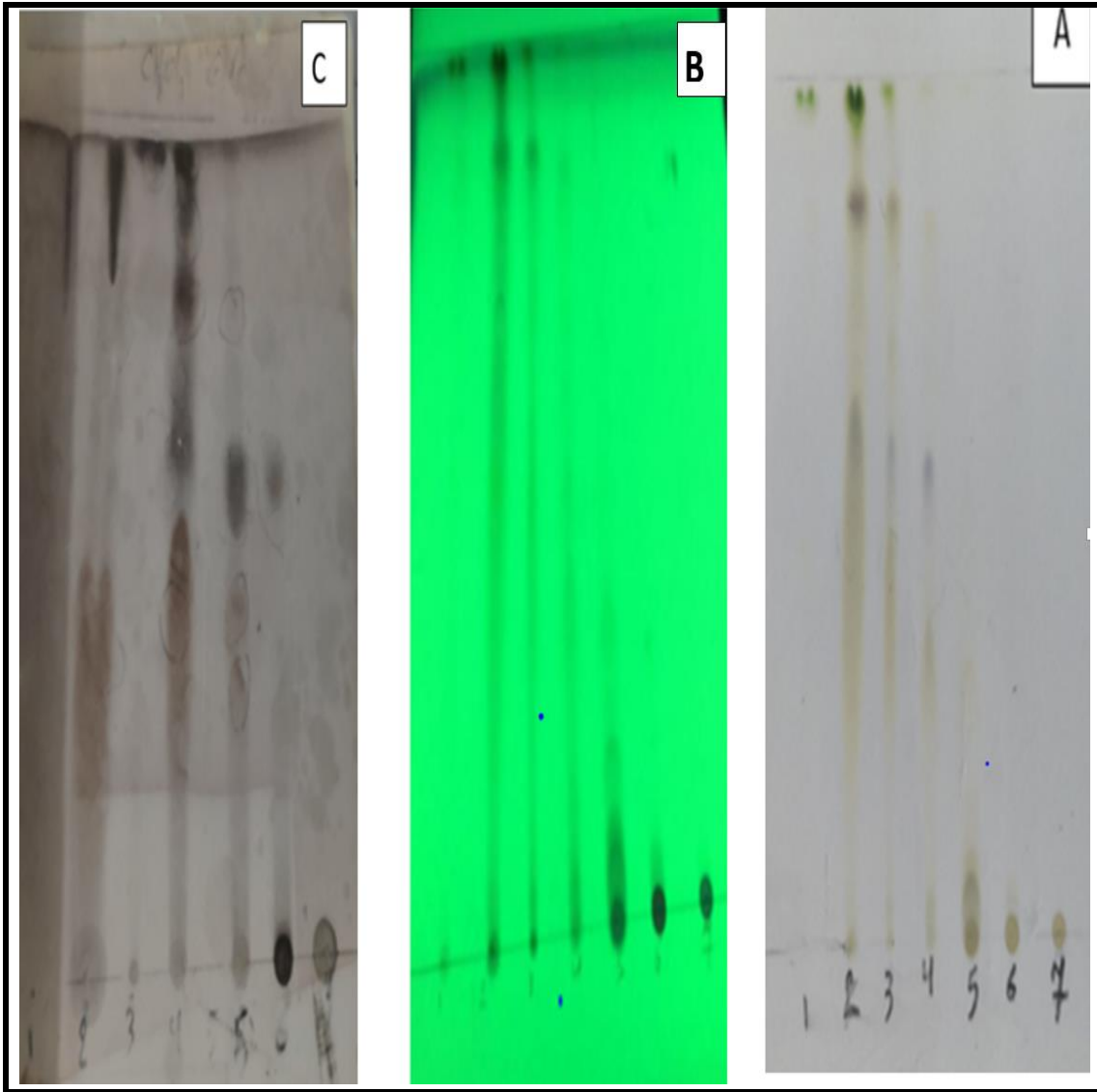
الشكل (4-12): أجزاء المستخلص الكحولي الخام الناتجة من تقنية (VLC) . 1-هكسان ,
 2- الهكسان :كلوروفورم , 3- كلوروفورم , 4- كلوروفورم : أثيل أسيتيت , 5- أثيل أسيتيت ,
 6 - ايثانول , 7- ميثانول

تم الكشف عن المركبات الفعالة الموجودة في أجزاء المستخلص الكحولي الناتجة من تقنية الكروماتوغرافيا (VLC) باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) باستخدام الطور المتحرك المؤلف من كلوروفورم : أثيل أسيتيت (80:20) اذ كان الاكفا من بين أنظمة فصل متعددة تم اختبارها . وتم الحصول على مركبات متعددة بهيئة بقع مدمجة أو منفصلة وبألوان مختلفة وتم قياس عامل التحرك للبقع المنفصلة (R_f) في الأجزاء كما في الشكل (4-13) والجدول (4-22) , وتم تمييز مركب ذي لون أخضر بالعين المجردة ومعامل التحرك له 0.95 , وتميز جزء الهكسان- كلوروفورم بوجود ثلاثة مركبات مفصولة واحد منها ذا لون أخضر ومعامل تحركه 0.95 ومركبين ذوي لون أزرق بالعين المجردة وبمعامل تحرك بلغ 0.8 و0.57 لكل منها على التوالي , جزء الكلوروفورم تميز بوجود أربعة مركبات احدها ذلون بني فاتح بمعامل تحرك بلغ 0.07 ومركبين ظهرا بلون أزرق بالعين المجردة وبمعامل تحرك بلغ 0.8 , 0.54 , والمركب الرابع ذلون أخضر بمعامل تحرك 0.95 بينما جزء

الكلوروفورم: أثيل أسيتيت ظهرت فيه خمسة مركبات مفصولة واحد منها بلون أزرق وبمعامل تحرك 0.53 وثلاثة مركبات بلون بني فاتح بمعامل تحرك 0.07, 0.42, 0.5 على التوالي والمركب الخامس بلون أخضر فاتح بمعامل تحرك بلغ 0.95, في حين ظهرت ثلاثة مركبات مفصولة في جزء الاثيل أسيتيت ذات ألوان بني فاتح بالعين المجردة وذو معامل تحرك 0.42 ومركبان عديما اللون وبمعامل تحرك 0.3 و 0.54 و أما جزء الايثانول فتم فصل مركبين أحدهما بني اللون ومعامل تحركه 0.07 و الآخر عديم اللون بالعين المجردة وأزرق اللون بتاثير كاشف الفانيلين وذا معامل تحرك 0.54 , في حين تم تمييز مركب واحد في جزء الميثانول بلون بني وبمعامل تحرك بلغ 0.01 .

بين (Muttalib & Naqishbandi (2012) ان تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة تعد طريقة بسيطة وحساسة ونوعية يمكن من خلالها تحليل كل معايير العينات في وقت واحد دون الحاجة الى معدات متطورة . واستخدمت هذه الطريقة من قبل باحثين آخرين منهم Bagdat(2011), Gird et al.(2014) , Jesionek et al. (2017). و أشار Rickel (1996) الى أن ظهور اللون الأصفر والبرتقالي عند استخدام تقنية الطبقة الرقيقة قد يعزى الى وجود الفلافونول (Flavonols) (اللون الأصفر يشير الى kaempferol , jsorhamnetin وكلايكوسيداتهما واللون البرتقالي يشير الى myricetin , quercetin وكلايكوسيداتهما) و ظهور اللون الأزرق قد يشير الى وجود الفلافونيدات (Flavonoids) التي غالبا ماتحتوي على حوامض كاربوكسيلية فينولية (مثل caffeic acid , chlorogenic acid) والكومارينات (مثل scopoletin) واللون الأخضر المصفر يشير الى وجود الفلافونات (Flavons) مثل apigenin واللون البرتقالي يشير الى luteolin وكلايكوسيداتهما وهذا يؤيد ماتوصلنا اليه في دراستنا الحالية .

أشار شوكت وآخرون (2012) الى أحتواء أوراق نبات الميرمية على القلويدات و الكلايكوسيدات والفينولات مثل caffeic acid و الفلافونات مثل quercetin , luteolin , apiginin الى جانب أحتوائها على التربينات مثل oleanolic , urasolic , apianine , acid , botulin , betulinic acid , uvoal وأنواع متعددة من الزيوت الأساسية مثل linalool , borneol , viridiflorol , camphor .



الشكل (4-13): كروماتوغرافيا تقنية الطبقة الرقيقة لاجزاء المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميريمية بأستعمال نظام الفصل كلوروفورم : اثيل أسيتيت (20:80) . (1) الهكسان , (2) هكسان : كلوروفورم , (3) كلوروفورم , (4) كلوروفورم : اثيل أسيتيت , (5) اثيل أسيتيت , (6) أيثانول , (7) ميثانول

A: بالعين المجردة , B: باستخدام الـ UV بقوة 253 نانوميتر , C: بعد رش الصفيحة بكاشف الفانيلين .

الجدول (4-22): قيم عامل التحرك وألوان المكونات الكيميائية المفصولة في أجزاء المستخلص النباتي الكحولي الخام

أجزاء المستخلص	لون المركب بالعين المجردة	لون المركب تحت الـ UV	لون المركب بعد رشه بكاشف الفانيلين	قيمة الـ Rf
هكسان	أخضر	أزرق	أزرق	0.95
هكسان:كلوروفورم	أخضر	أزرق	أزرق	0.95
	أزرق	أزرق	أزرق	0.8
	أزرق	أزرق	بني غامق	0.57
كلوروفورم	أزرق	أزرق	أزرق	0.95
	أزرق	أزرق	أزرق	0.8
	أزرق	شفاف	بني غامق	0.57
	أزرق	أزرق	شفاف	0.07
كلوروفورم : أثيل أسيتيت	أخضر	أزرق	أزرق	0.95
	أزرق	أزرق	أزرق	0.53
	بني فاتح	عديم اللون	برتقالي	0.5
	بني فاتح	عديم اللون	برتقالي	0.42
	بني فاتح	بني غامق	أزرق	0.07
أثيل أسيتيت	عديم اللون	عديم اللون	أزرق	0.54
	بني فاتح	عديم اللون	برتقالي	0.42
	عديم اللون	عديم اللون	برتقالي	0.3
أيثانول	عديم اللون	عديم اللون	أزرق	0.54
	بني فاتح	بني غامق	أزرق	0.07
ميثانول	بني فاتح	عديم اللون	أزرق	0.01

2.4.2.4: تحديد الفعالية التثبيطية لأجزاء المستخلص الكحولي الخام تجاه أنواع المبيضات المعزولة

تم اختبار فعالية الأجزاء التي تم فصلها بتقنية الكروماتوغرافيا الفراغية وبتركيز 10 ملغم/مل , ضد أنواع المبيضات المعزولة الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين وتبين أن هناك فروقات معنوية بين أنواع الفطريات المعزولة والأجزاء المستخلصة وكما موضح في الجدول (4-23) والشكل (4-14) وقد تبين أن جميع الأجزاء المستخلصة أظهرت فعالية تثبيطية تجاه الأنواع المختبرة وكان من بينها جزء المستخلص كلوروفورم : أثيل أسيتيت الذي أظهر فعالية عالية في تثبيط أنواع المبيضات مقارنة ببقية أجزاء المستخلص حيث بلغت معدلات أقطار تثبيط الأنواع الحساسة 14 ,

, *C.lusitaniae* , *C.dublinensis*, *C.albicans* , 21 , 20 , 21 , 19, 16 ملم لكل من *C.kefyr* , *C.parapsilosis* , *C.tropicalis* على التوالي , كما تبين ايضاً أن النوع *C.kefyr* كان الأكثر تأثراً بجزء الهكسان: كلوروفورم , والكلوروفورم : أثيل أسيتيت , اذ بلغت معدلات أقطار التثبيط 21 ملم لكل منها وعلى التوالي مقارنة ببقية الأنواع في حين أظهر النوع *C.tropicalis* حساسية عالية تجاه مستخلص الاثيل أسيتيت : كلوروفورم حيث سجل معدل تثبيط عالية بلغت 21 ملم مقارنة بأقطار تثبيط بقية الأنواع . وأشار (Jakovljevic et al. (2019 الى ان المذيبات القطبية اكثر فعالية في استخلاص المكونات الفينولية من المذيبات الأقل قطبية , أما فيما يخص السلالات المقاومة للامفوتيريسين تبين من الجدول (4-24) والشكل (4-15) أن أعلى معدلات التثبيط بلغت 14 و 19 ملم للأنواع *C.lusitaniae* , *C.albicans* على التوالي لجزء المستخلص كلوروفورم : أثيل أسيتيت وتلاه لجزء الاثيل أسيتيت بمعدلات تثبيط بلغت 13 و 17 ملم على التوالي .

الجدول (4-23):الفعالية التثبيطية لأجزاء مستخلص أوراق نبات الميريمية الخام الناتج من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين

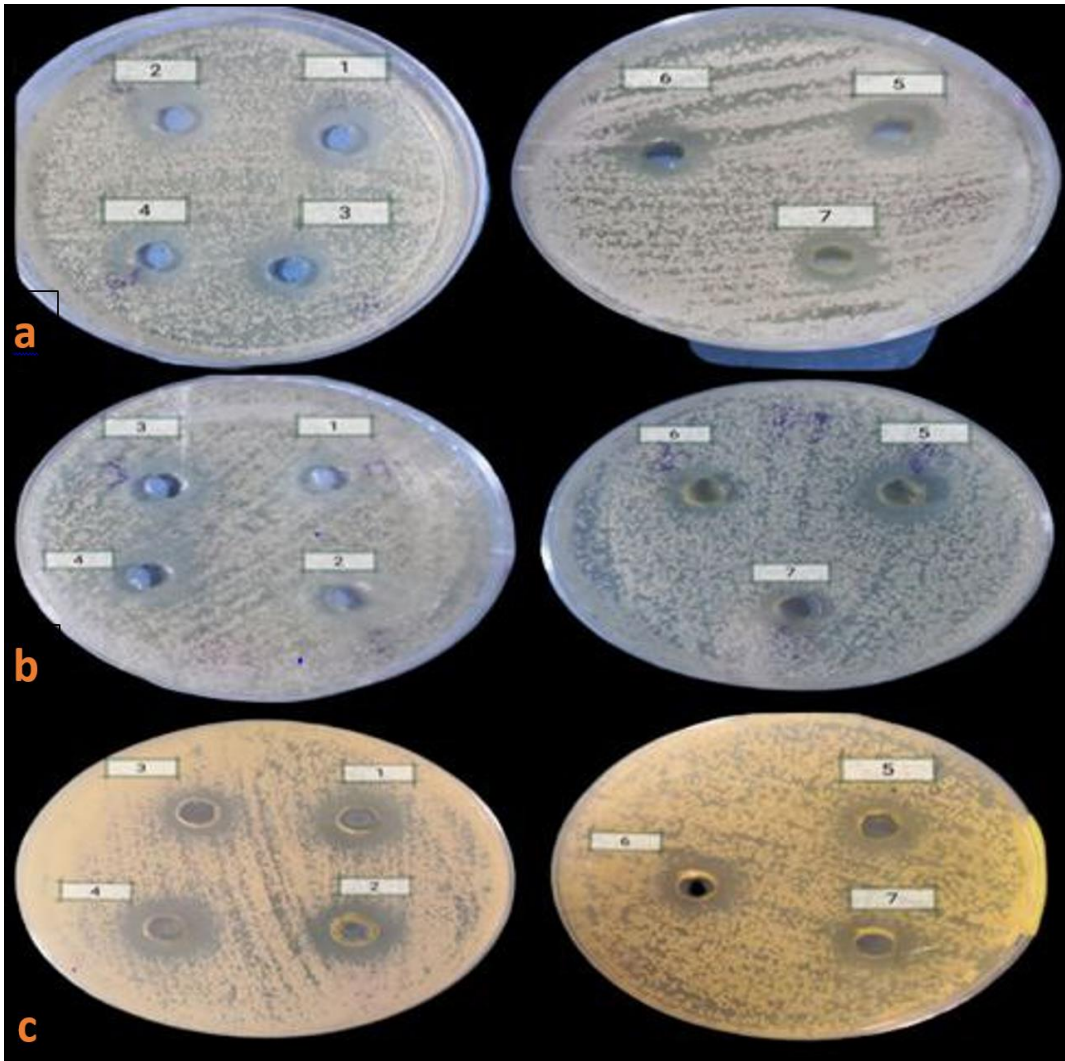
LSD للتداخل	أنواع الفطريات						نوع المستخلص
	معدل أقطار التثبيط (ملم)						
	<i>C.kefyr</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.dublinensis</i>	<i>C.albicans</i>	
0.782*	20.00	18.00	17.00	18.00	15.00	14.00	هكسان
	21.00	17.00	18.00	19.00	14.00	15.00	هكسان : كلوروفورم
	20.00	19.00	19.00	16.00	13.00	12.00	كلوروفورم
	21.00	20.00	21.00	19.00	16.00	14.00	كلوروفورم : أثيل أسيتيت
	19.00	17.00	20.00	17.00	14.00	15.00	أثيل أسيتيت
	20.00	16.00	19.00	17.00	13.00	15.00	ايتانول
	20.00	13.00	19.00	15.00	13.00	12.00	ميثانول
	*0.37	*1.19	*0.39	*1.07	*2.44	*1.11	LSD بين نوع الفطر ونوع المستخلص

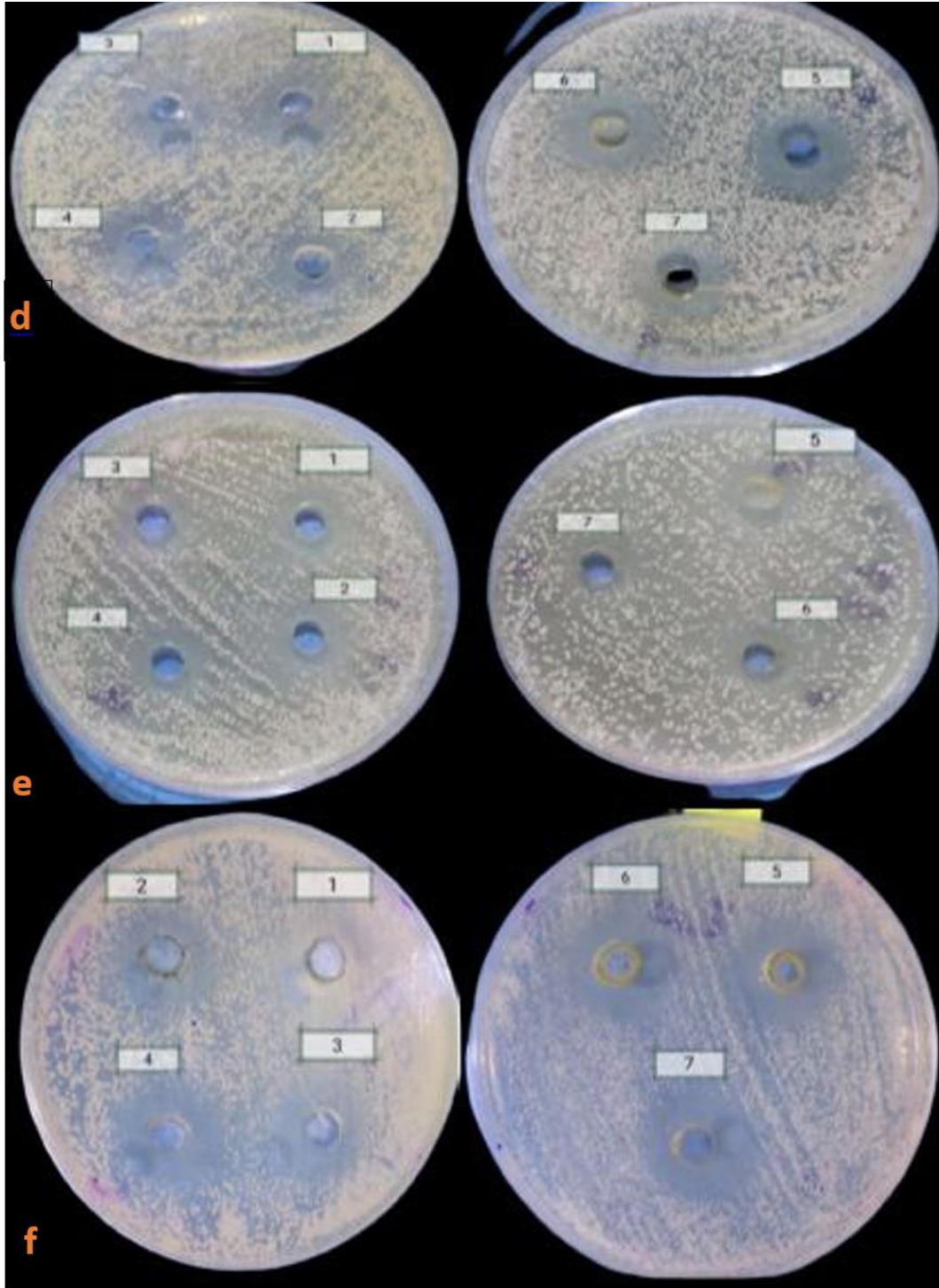
*: وجود فروقات معنوية .

الجدول (4-24): الفعالية التثبيطية لاجزاء مستخلص أوراق نبات الميرمية الخام الناتج من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين

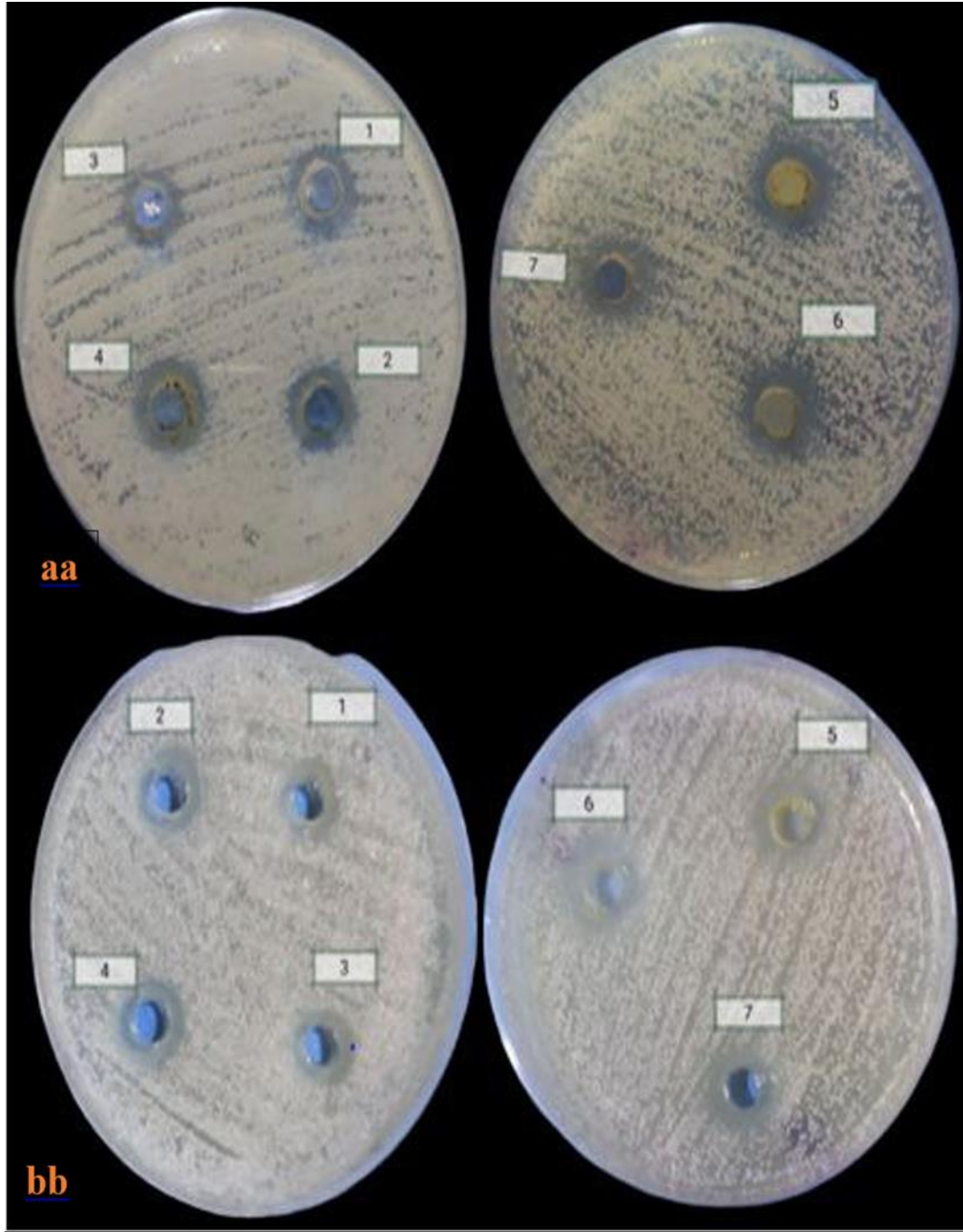
P.V. بين الفطر والمستخلصات 0.05	نوع المستخلص						الأنواع الفطرية	
	معدل أقطار التثبيط (ملم)							
	هكسان	كلوروفورم : هكسان	كلوروفورم : كلوروفورم	أثيل أسيتيت : كلوروفورم	إيثانول	ميثانول		
*0.00	12.00	13.00	13.00	14.00	12.00	12.00	11.00	<i>C.albicans</i>
*0.00	13.00	13.00	17.00	19.00	16.00	16.00	16.00	<i>C.lusitaniae</i>
							*0.06	LSD للتداخل

*: وجود فروقا معنوية .





الشكل (4-14):الفعالية التثبيطية لأجزاء المستخلص النباتي الخام ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين .a: *C.albicans* ,b: *C.dubliniesis* , *C.lusitaniae* :c
 , *C.tropicalis* :d, *C.parapsilosos* :e, *C.kefyr* :f. (1) الهكسان , (2) هكسان :
 كلوروفورم , (3) كلوروفورم , (4) كلوروفورم : أثيل أسيتيت , (5) أثيل أسيتيت , (6) أيثانول
 , (7) ميثانول



الشكل (4-15):الفعالية التثبيطية لاجزاء المستخلص النباتي الخام ضد سلالات الأنواع المقاومة للامفوتيريسين . *C.lusitaniae*:bb , *C.albicans*:aa . (1) الهكسان , (2) هكسان : كلوروفورم , (3) كلوروفورم , (4) كلوروفورم : أثيل أسيتيت , (5) أثيل أسيتيت , (6) إيثانول , (7) ميثانول

3.4.2.4: تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC)

لأجزاء المستخلص الكحولي الخام ضد أنواع المبيضات المعزولة

من خلال النتائج المبينة في الجدول (4-25) وجد أن أقل قيمة للتركيز المثبط الأدنى هي 50 مايكروغرام /مل والقاتل الأدنى 100 مايكروغرام /مل قد ظهرت في غالبية الأجزاء المستخلصة وتجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين , ففي جزء الهكسان سجلت ضد النوع *C.parapsilosis*, أما في جزء الهكسان :كلوروفورم سجلت هذه القيم تجاه النوع *C.kefyr*, في حين سجلت هذه القيم القليلة في جزء الكلوروفورم :أثيل أسيتيت ضد *C.albicans* و *C.lusitaniae* و *C.kefyr* بينما في جزء الايثانول سجلت تجاه *C.albicans* و *C.kefyr*, وفي جزء الميثانول كانت ضد *C.kefyr* بينما في جزء الاثيل أسيتيت سجلت MIC قيمة بلغت 100 مايكروغرام /مل تجاه جميع الأنواع , أما أعلى قيم التركيز المثبط الأدنى التي بلغت 200 مايكروغرام /مل والتركيز القاتل الأدنى 400 مايكروغرام /مل سجلت في جزء الهكسان : كلوروفورم تجاه النوعين *C.albicans* و *C.dubliniesis* و في جزء الميثانول تجاه النوع *C.dubliniesis*. كما تبين من الجدول أن النوع *C.kefyr* كان أكثر الأنواع تحسنا بأجزاء مستخلص الميريمية .

أما بخصوص الأنواع المقاومة للامفوتيريسين (جدول 4-26) , سجلت أقل قيم التركيز المثبط الأدنى وبلغت 200 مايكروغرام والقاتل الأدنى 400 مايكروغرام /مل في جميع الأجزاء المفصولة تجاه النوعين *C.albicans* و *C.lusitaniae* عدا الجزء هكسان : كلوروفورم للنوع *C.albicans* و جزء الميثانول للنوع *C.lusitaniae* إذ سجلت أعلى قيم التركيز المثبط الأدنى فيهما التي بلغت 400 مايكروغرام /مل تجاه كلا النوعين . أن الاختلاف في قيم التركيز المثبط والتركيز القاتل الأدنى يعزى الى المواد الفعالة الموجودة في كل جزء من المستخلص والى طبيعة المذيبات إذ تم الفصل على أساس القطبية وبالتدرج أي من القطبية الواطئه الى القطبية العالية .

الجدول (4-25): قيم التركيز المثبط والقاتل الأدنى لاجزاء المستخلص الكحولي الناتجة من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين

أنواع المبيضات						نوع التركيز	أجزاء المستخلص
<i>C. albicans</i>	<i>C. dublinensis</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. kefyr</i>		
التركيز مايكروغرام /مل							
100	50	100	100	100	100	MIC	الهكسان
200	100	200	200	200	200	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
50	100	100	100	200	200	MIC	هكسان : كلوروفورم
100	200	200	200	400	400	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
50	100	100	100	100	100	MIC	كلوروفورم
100	200	200	200	200	200	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
50	100	100	50	100	50	MIC	كلوروفورم : أثيل أسيتيت
100	200	200	100	200	100	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
100	100	100	100	100	100	MIC	أثيل أسيتيت
200	200	200	200	200	200	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
50	100	100	100	100	50	MIC	أيثانول
100	200	200	200	200	100	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
50	100	100	100	200	100	MIC	ميثانول
100	200	200	200	400	200	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) ، C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي). + : ظهور النمو ، - : عدم ظهور النمو.

الجدول (4-26): قيم التركيز المثبط والقاتل الأدنى لاجزاء المستخلص الكحولي الناتجة من عملية التجزئة تجاه أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيرييسين

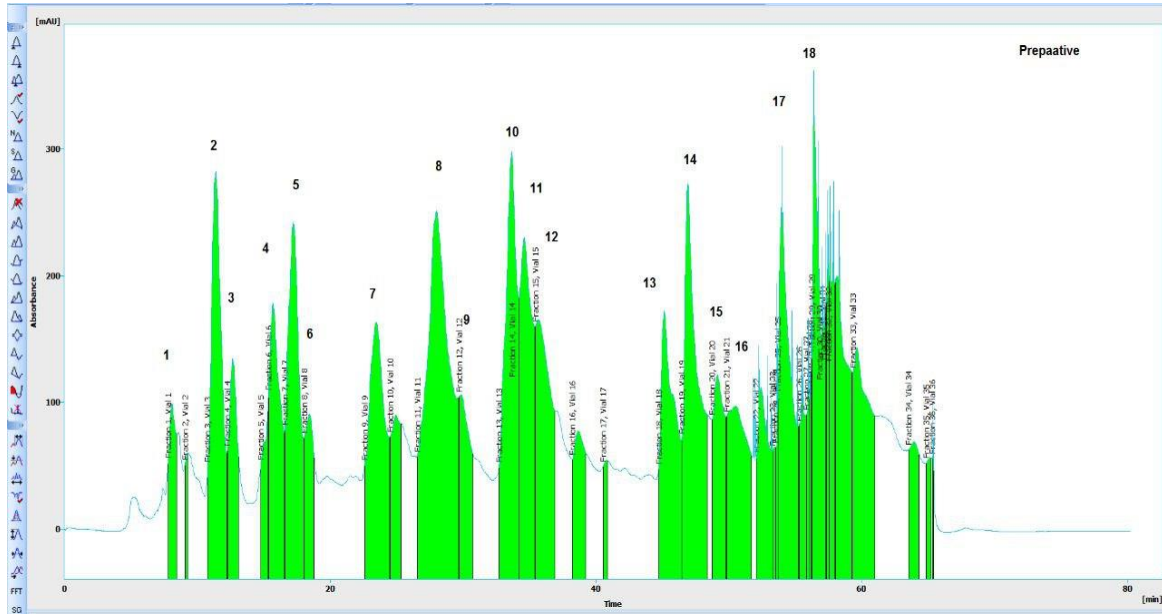
أنواع المبيضات		نوع التركيز	أجزاء المستخلص
<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.albicans</i>		
التركيز مايكروغرام /مل			
200	200	MIC	الهكسان
400	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
200	400	MIC	هكسان : كلوروفورم
400	800	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
200	200	MIC	كلوروفورم
400	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
200	200	MIC	كلوروفورم : أنيل أسيتيت
400	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
200	200	MIC	أنيل أسيتيت
400	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	و2	
200	200	MIC	أيثانول
400	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
400	200	MIC	ميثانول
800	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) ، C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي). + : ظهور النمو ، - : عدم ظهور النمو

(MIC) : التركيز المثبط الأدنى ، (MFC) : التركيز القاتل للفطريات الأدنى .

4.4.2.4 : تحليل بعض المركبات الفعالة في مستخلص نبات الميريمية و تنقيتها وتخليصها باستخدام تقنية السائل عالية الاداء (HPLC)

في الغالب يكون تركيز المواد الفعالة في المستخلصات النباتية منخفضًا ، وهنا يجب اختيار تقنية حساسة للكشف عنها وتعد تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC) إحدى هذه التقنيات المستخدمة على نطاق واسع لغرض فصل خليط من المركبات وتقدير وتنقية المكونات الفعالة للخليط (Oladimeji & Valan , 2020; Shoker , 2021). في هذه الدراسة اختير جزء الكلوروفورم : أثيل أسيتيت الذي أثبت كفاءته العالية في تثبيط كافة الانواع المختبرة , لغرض التعرف على المركبات الفعالة الموجودة فيه وتنقيتها باستخدام ال Prep.HPLC ، وتم تحليل العينة , وعزل مركباتها أولاً وحسبت الامتصاصية , وزمن الاحتجاز لكل مركب وتبين وجود 18 مركبا اساسيا تم الكشف عنها عند الطول الموجي 273 نانوميتر (Seal et al.,2016) وكما مبين في الشكل (4-16) . وتم تنقية المركبات الفعالة التي أظهرت قمم رئيسية والبالغ عددها 18 قمة التي تشير الى وجود 18 مركب فصلت عند زمن احتجاز (R_t) مختلف وبكميات مختلفة وأشير اليها بالرمز F مع رقم المركب وكما مبين في الجدول (4-27) باستخدام الكروماتوغرافيا التحضيرية Prep.HPLC.

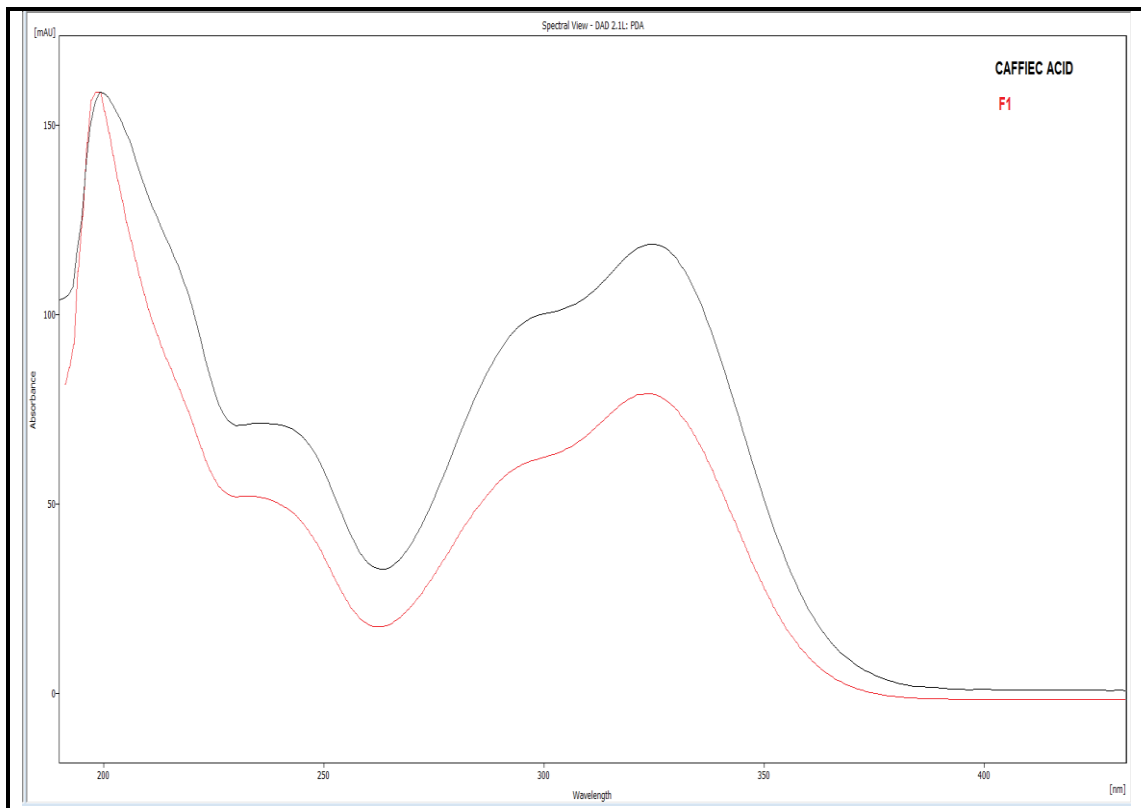


الشكل (4-16): كروماتوغرام تحليل مستخلص كلوروفورم – أثيل أسيتيت لمستخلص الميريمية الكحولي باستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء التحضيرية (Prep.HPLC) عند الطول الموجي 273 نانوميتر

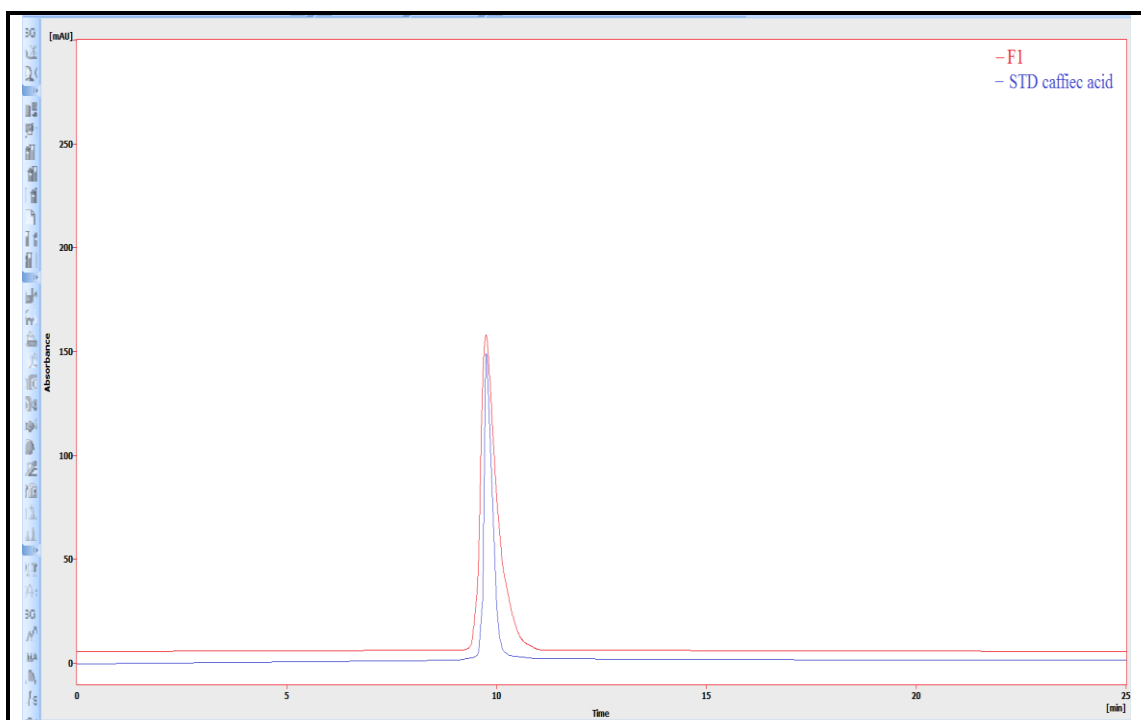
جدول (4-27) : المركبات التي تم فصلها بأستخدام تقنية كروموتوكرافيا السائل عالية الأداء التحضيرية (Prep.HPLC)

رمز المركب	كمية المركب (مايكروغرام)
F1	1000
F2	1000
F3	1000
F4	2000
F5	2000
F6	2000
F7	2000
F8	3000
F9	1000
F10	2000
F11	2000
F12	1000
F13	1000
F14	2000
F15	1000
F16	1000
F17	1000
F18	2000

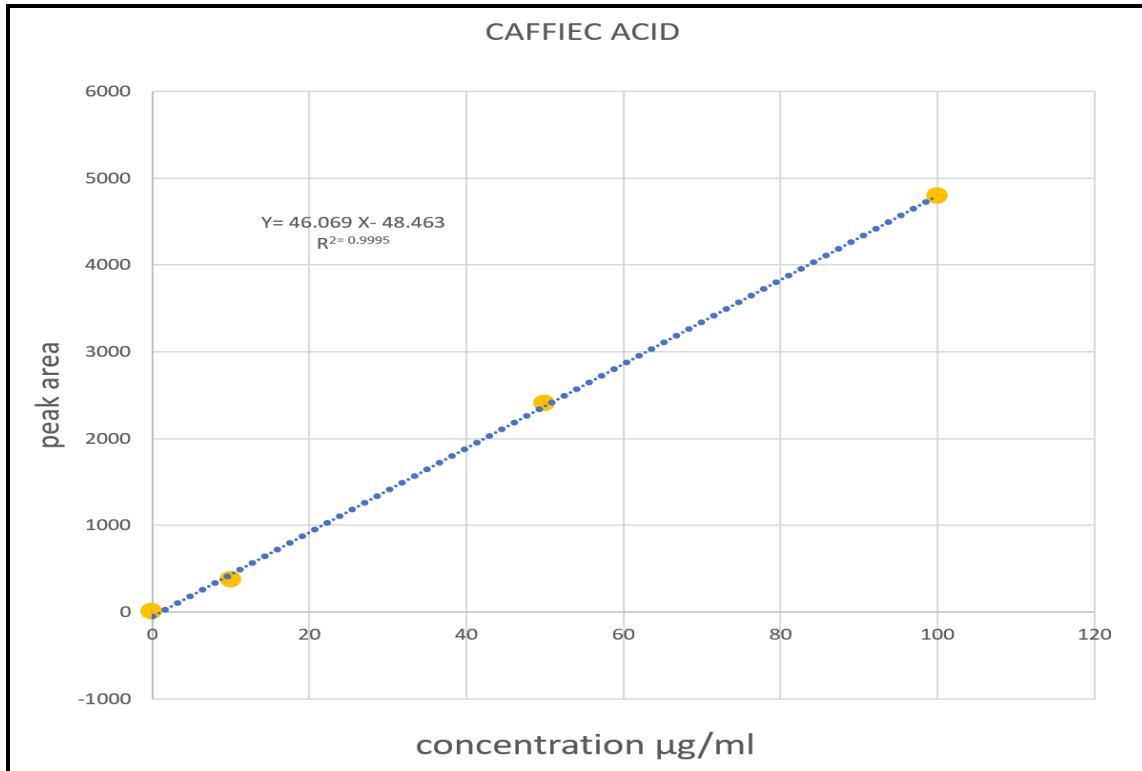
لغرض تشخيص المركبات المفصولة تم مقارنة أطياف الامتصاص لكل منها مع أطياف الامتصاص للمواد القياسية . وتم أيضا حساب كمية كل مركب تم تشخيصه من خلال استخدام التراكيز المتسلسلة للمواد القياسية الخارجية لبناء منحنى المعايرة بين التركيز ومساحة القمة المقابلة له (Seal,2016). ومن خلال ذلك تم تشخيص ثلاثة مركبات فعالة هي Caffeic acid (F1) و Ferulic acid (F5) و Kaempferol (F8) وبأوزان مختلفة بلغت تقريبا 1000 , 2000 و3000 مايكروغرام / مل على التوالي والشكل (4-17) و(4-18) و(4-19) و(4-20) و (4-21) و (4-22) و (4-23) و (4-24) و(4-25) الذي يوضح كروموتوكرام HPLC وطيف الامتصاص لكل مركب ومقارنته مع المركب القياسي .



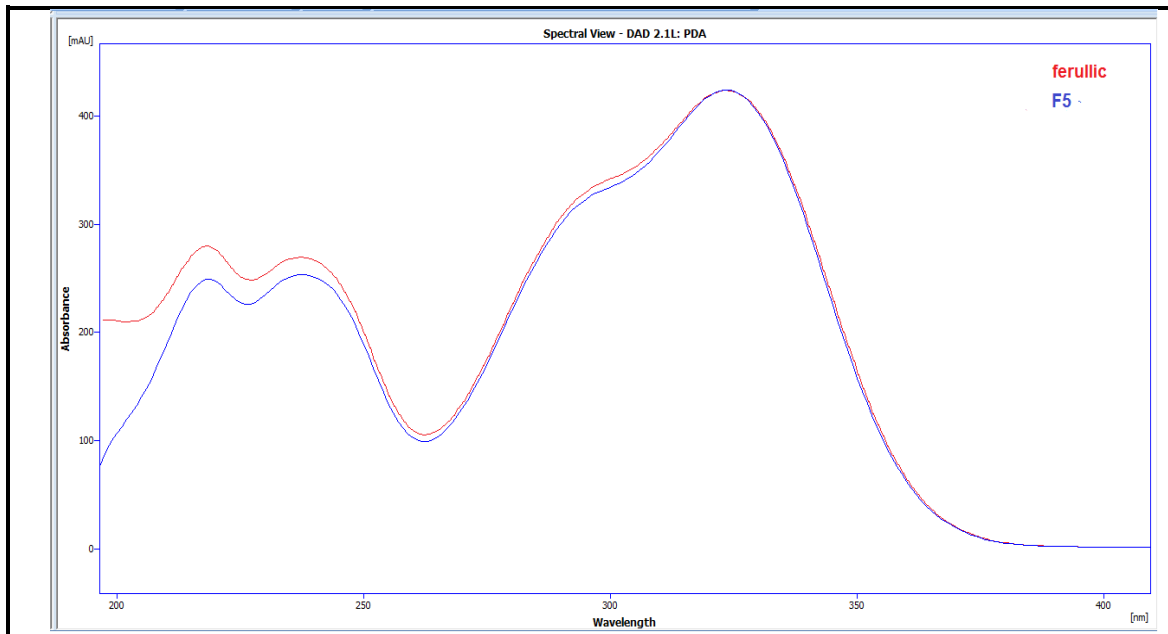
الشكل (4-17): طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمركب Caffeic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



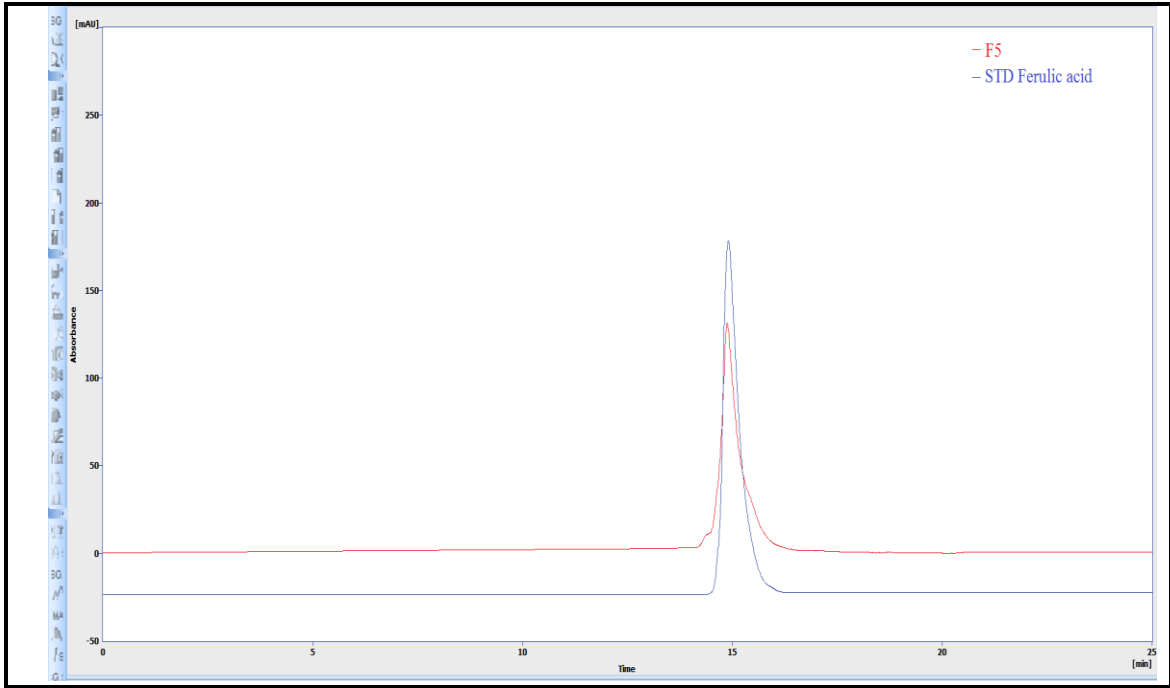
الشكل (4-18): كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Caffeic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



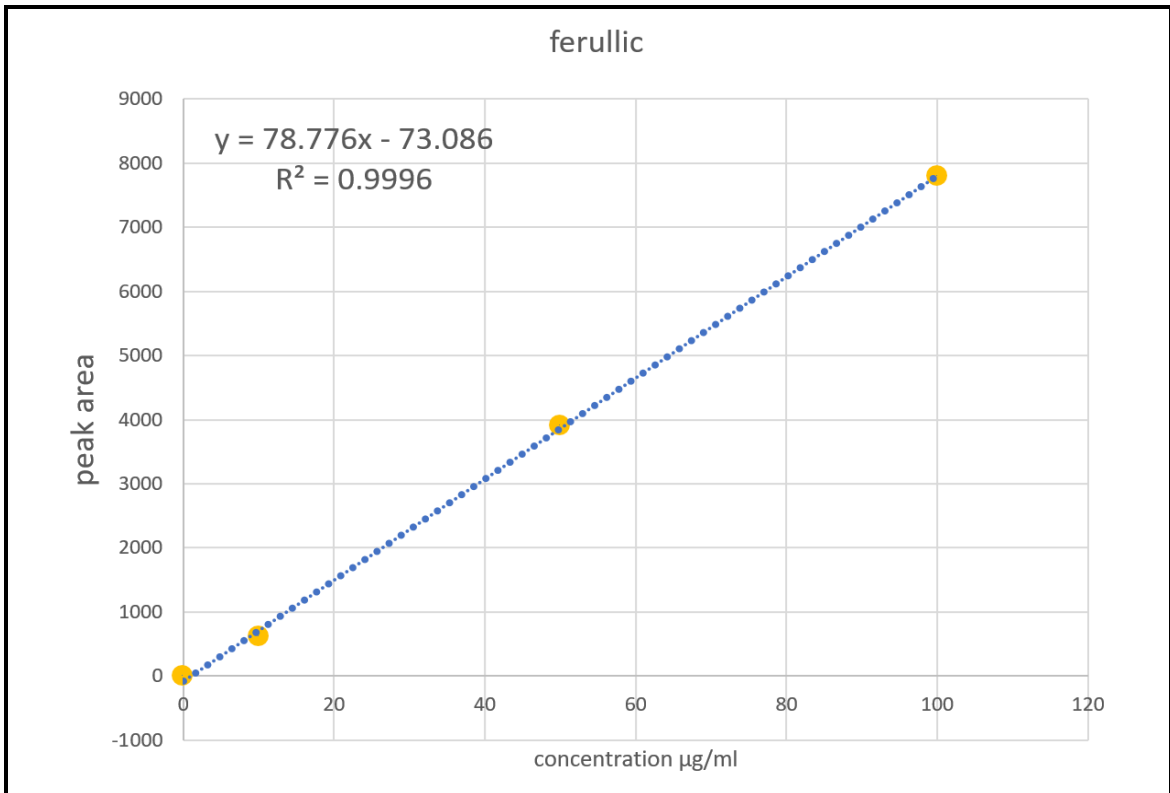
الشكل (4-19) : منحنى المعايرة القياسي للمركب Caffeic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



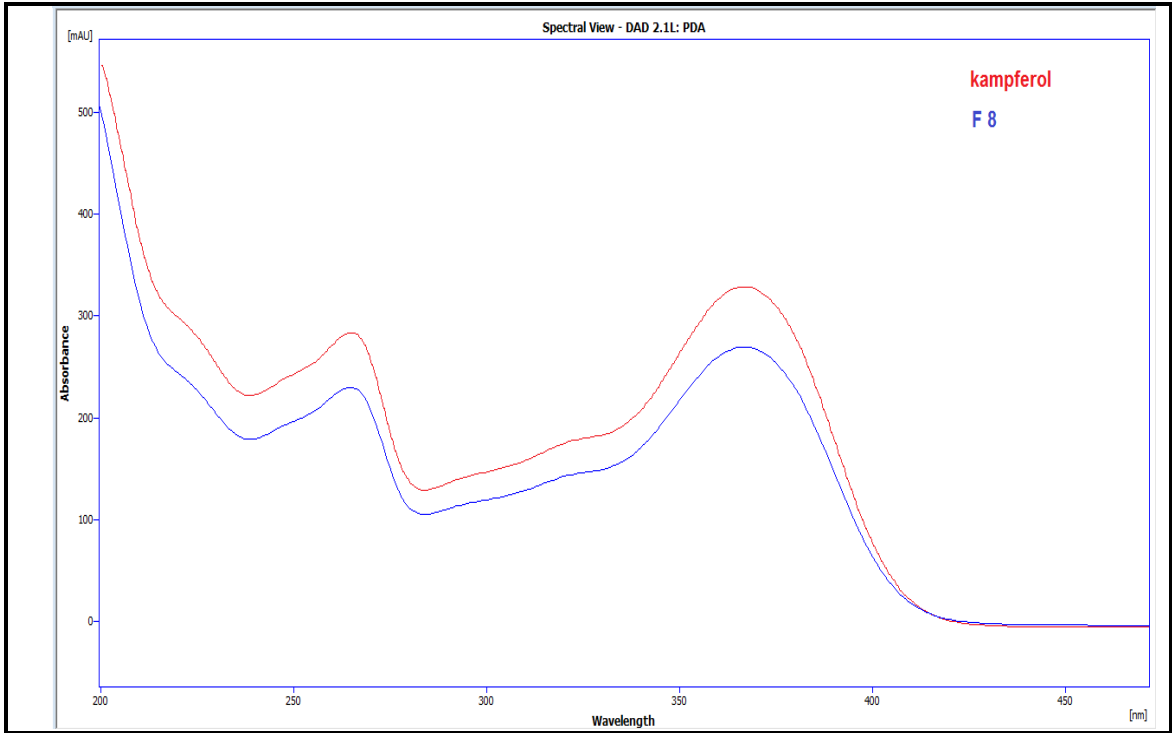
الشكل (4-20) : طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية لمركب Ferulic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



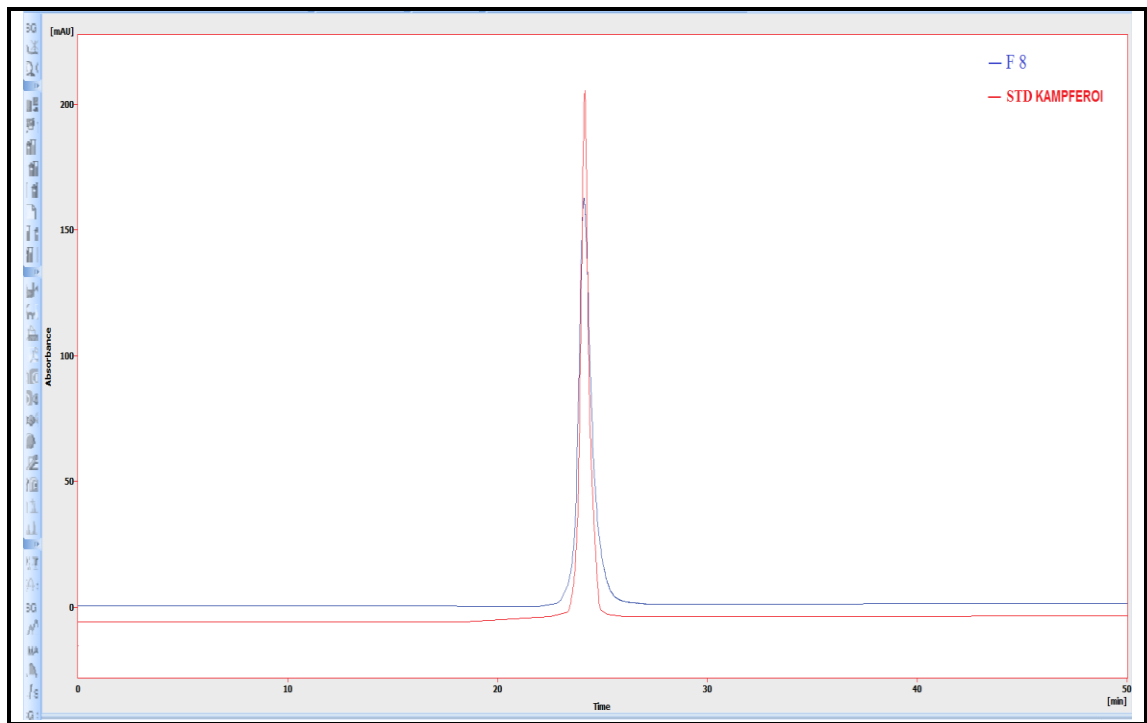
الشكل (4-21) : كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Ferulic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



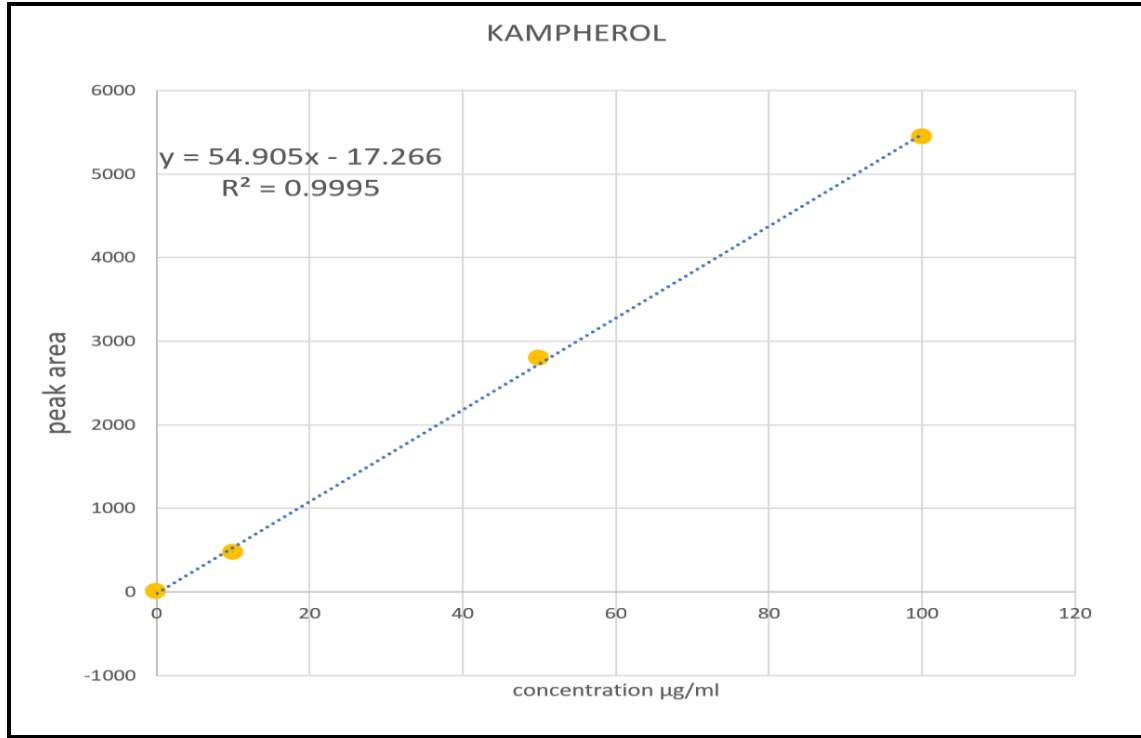
الشكل (4-22) : منحنى المعايرة القياسي للمركب Ferulic acid القياسي والمركب المعزول من النبات



الشكل (4-23) : طيف امتصاص الاشعة فوق البنفسجية لمركب Kaempferol القياسي والمركب المعزول من النبات



الشكل (4-24) : كروماتوغرام HPLC الخاص بمركب Kaempferol القياسي والمركب المعزول من النبات



الشكل (4-25) : منحنى المعايرة القياسي للمركب Kaempferol القياسي والمركب المعزول من النبات

5.4.2.4 : اختبار الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاة من مستخلص كلوروفورم :

أثيل اسيتيت لاوراق نبات الميريمية تجاه أنواع المبيضات المعزولة

أظهرت النتائج أن هناك فعالية تثبيطية للمركبات التي تم تنقيتها ضد جميع أنواع المبيضات المعزولة وكما مبين في الجدول (4-28) والشكل (4-26). اذ تبين أن معدلات أقطار التثبيط للمركب Caffeic acid تجاه الأنواع *C. albicans* و *C. dubliniensis* و *C. lusitaniae* و *C. tropicalis* و *C. parapsilosis* و *C. kefyri* الحساسة للامفوتيريسين بلغت 12 , 11 , 12 , 14 , 13 و 12 ملم على التوالي , اما المركب Ferulic acid فقد سجل معدلات تثبيط تجاه الأنواع المذكورة في أعلاه بلغت وعلى التوالي 10 , 12 , 13 , 12 , 12 و 11 ملم , في حين سجل للمركب Kaempferol معدلات أقطار تثبيط بلغت 13 , 13 , 12 , 14 , 12 و 13 ملم على التوالي للأنواع المذكورة في أعلاه وعلى التوالي .

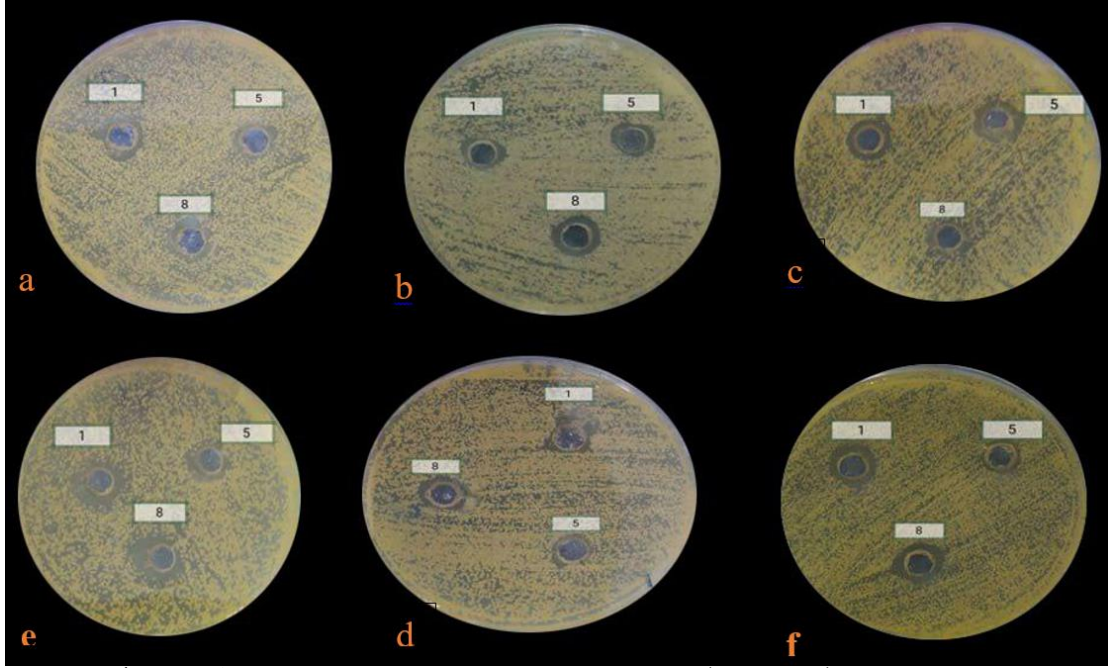
ذكر (2019) Jakovljevic *et al.* أن Caffeic acid و Ferulic acid و Kaempferol تعد من المركبات الفينولية الموجودة في أوراق نبات الميريمية , وهذه المركبات تكون ذات فعالية تثبيطية ضد الاحياء المجهرية (Aziz *et al.*,2012; Dent *et al.* ,2013 ; El-Feky &

(Wael , 2016). وتعزى فعالية المركبات الفينولية ضد الميكروبات الى الحلقة الاروماتية الفينولية القطبية التي تحتوي مجموعة واحدة من الهيدروكسيل (OH) أو أكثر وحسب نوع المركب وهذه المجموعة لها القابلية على الارتباط والتفاعل عن طريق تكوين أو اصر هيدروجينية مع المجاميع الفعالة للانزيمات المساعدة (Coenzymes) في جسم الكائن الحي وتعمل على تثبيط عملها كما أن بعض الفينولات ترتبط مع بروتينات جدار الخلية الميكروبية إضافة الى ارتباطها بأنزيمات غشاء الخلية مسببة تدمير الجدار أو الغشاء الخلوي (الجابر, 2008) .

الجدول (4-28) : الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاة من مستخلص كلوروفورم : أثيل اسيتيت لاوراق نبات الميريمية تجاه أنواع المبيضات المعزولة

المركبات أنواع الفطريات	Caffeic acid التركيز 500 مايكروغرام / مل	Ferulic acid التركيز 1000 مايكروغرام /مل	Kaempferol التركيز 1500 مايكروغرام /مل
أقطار التثبيط (مم)			
<i>C.albicans</i>	12	10	13
<i>C.dubliniesis</i>	11	12	13
<i>C.lusitaniae</i>	12	13	12
<i>C.tropicalis</i>	14	12	14
<i>C.parapsilosis</i>	12	12	13
<i>C.kefyr</i>	12	11	13
LSD	بين الفطريات *0.82	بين المستخلصات *0.60	بين التراكيز *0.60

*: فروقات معنوية .



الشكل (4-26) : الفعالية التثبيطية للمركبات المنقاه من مستخلص كلوروفورم - أثيل اسيتيت لاوراق نبات الميريمية ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين . a: *C. albicans* , b: *C. dubliniensis*, c: *C. lusitaniae*, d: *C. tropicalis* , e: *C. parapsilosos* , f: *C. kefyr*

. Kaempferol =8 , Ferulic acid =5 , Caffie acid =1

4.3: تحضير المستخلص النباتي النانوي الهجين باستخدام المستخلص الكحولي

الخام لاوراق نبات الميريمية

4.3.1: تشخيص المستخلص النباتي النانوي المحضر باستخدام الطرائق الطيفية

4.3.1.1: التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء (FTIR)

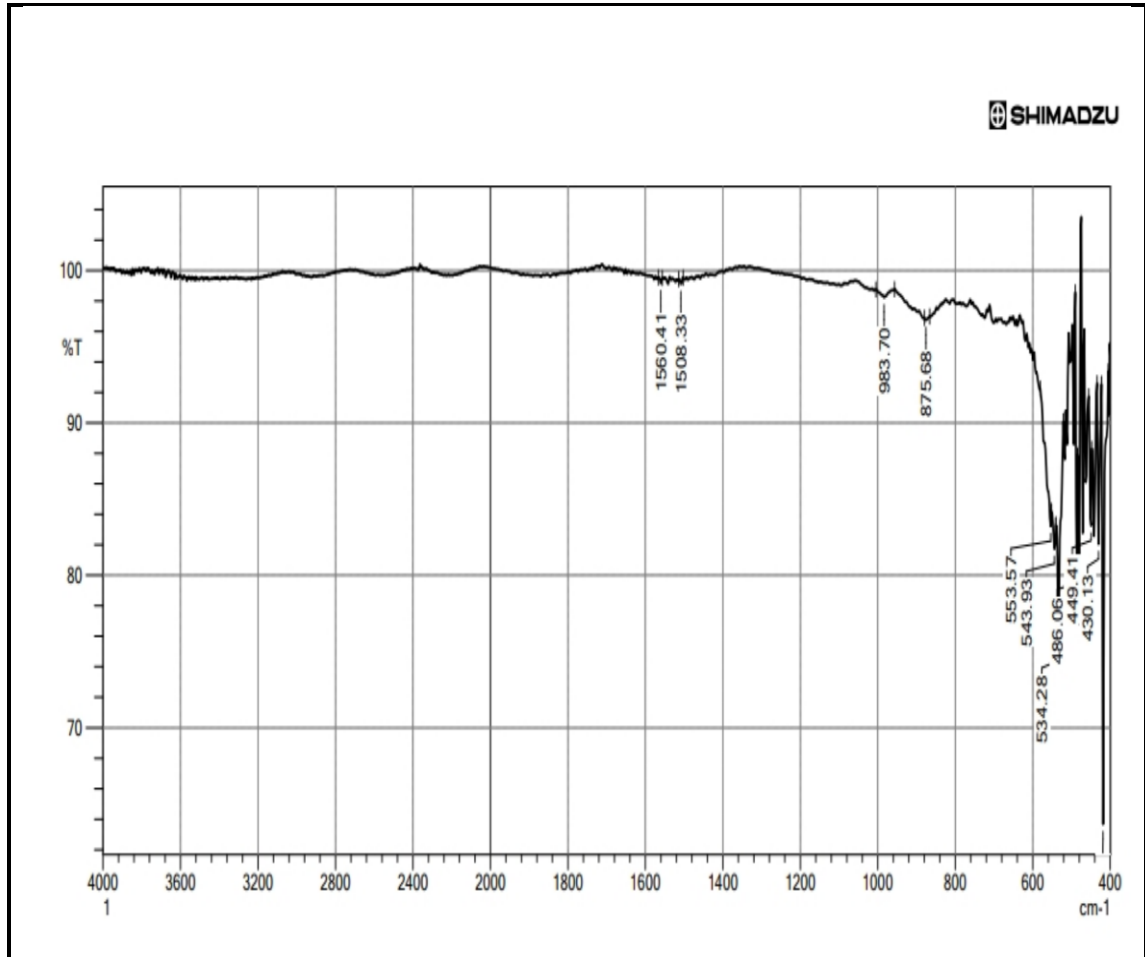
أولاً: طيف الأشعة تحت الحمراء لأكسيد الزنك النانوي

أظهرت نتائج التشخيص باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء لأكسيد الزنك النانوي وجود حزمة تقع عند التردد 400-500 سم⁻¹ وهذه تعزى الى الروابط التي بين الزنك والاكسجين في مركب أكسيد الزنك النانوي (Voicu et al.,2013) وكما موضح في الشكل (4-27) وهذه النتيجة تتفق مع السلطان (2018) والتميمي (2019).

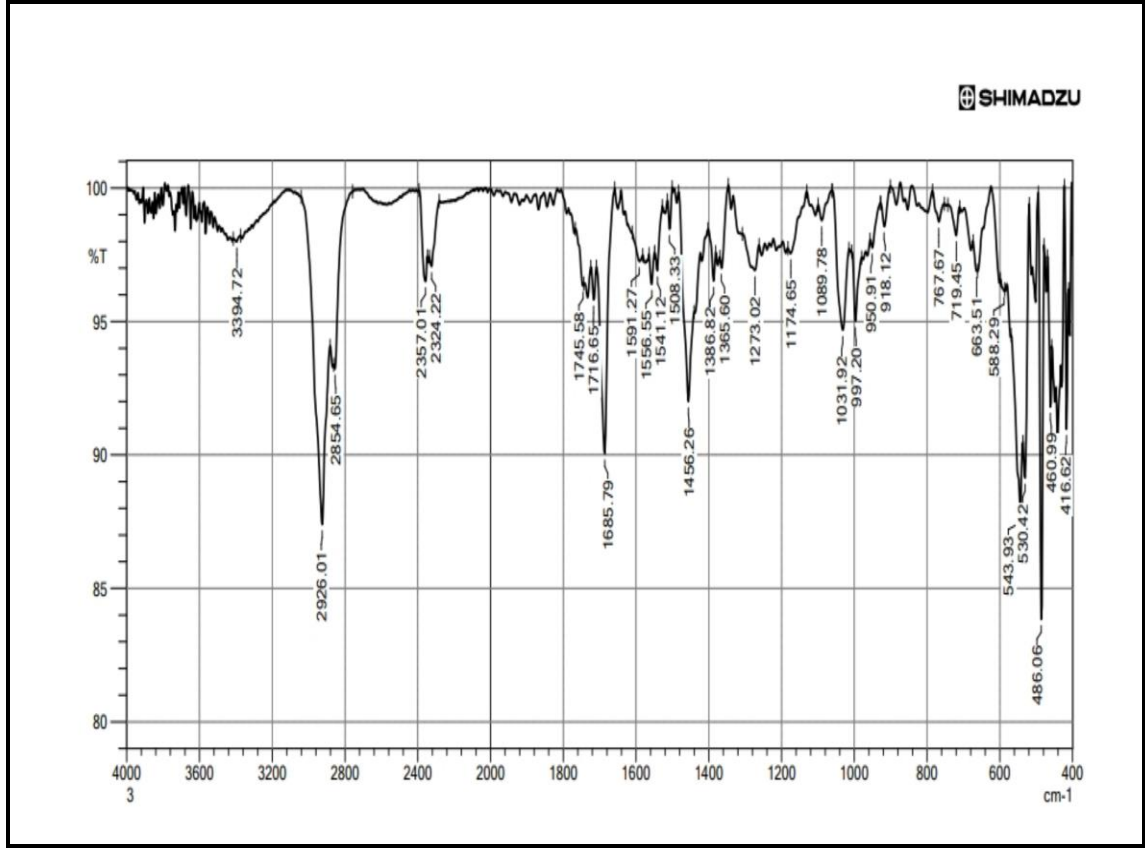
ثانياً: طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص النباتي النانوي الهجين

ان النتائج الموضحة في الشكل (4-28) تدل على نجاح عملية إقحام المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميريمية بين طبقات أكسيد الزنك وهذه تكون مستخلص نانوي هجين , وان ظهور حزمة عريضة عند التردد 3394 سم⁻¹ تشير الى وجود مجموعة OH كحولية ويلاحظ ظهور

حزمتين عند الترددین 2854-2926 سم⁻¹ يعزى الى مجموعة CH الالیفاتية. وبالنظر لاحتواء نبات الميرمية على زيت أساسي (Essential oil) في تركيبه (Porte *et al.*,2013) فإن ظهور حزمة قوية عند التردد 1685 سم⁻¹ يمكن أن يعزى الى وجود مجموعة كابونيل-كيتونية (C=O), ويمكن أن تعود الحزم الظاهرة عند 1456 و 1545 و 1596 سم⁻¹ الى حني مجموعة CH₃ و C=C وهذا يشير الى وجود مركبات أروماتية, اما ظهور الحزمة عند 1273 سم⁻¹ تعزى الى وجود الاواصر C-N و N-H وهذا يعكس وجود مركبات قلوية, والحزم عند التردد 1089 سم⁻¹ و 1031 سم⁻¹ تشير الى وجود مجموعة =C-H, N-H, -C-, مما يعكس وجود مجموعة أمين الیفاتية, فينول وحامض الكابوكسيل, , فيما يعزى ظهور الحزمتين عند الترددین 486 و 543 سم⁻¹ الى إهتزاز رابطة المعدن Zn-o (Abomuti *et al.*,2021 ; Silverstein *et al.*,2005).



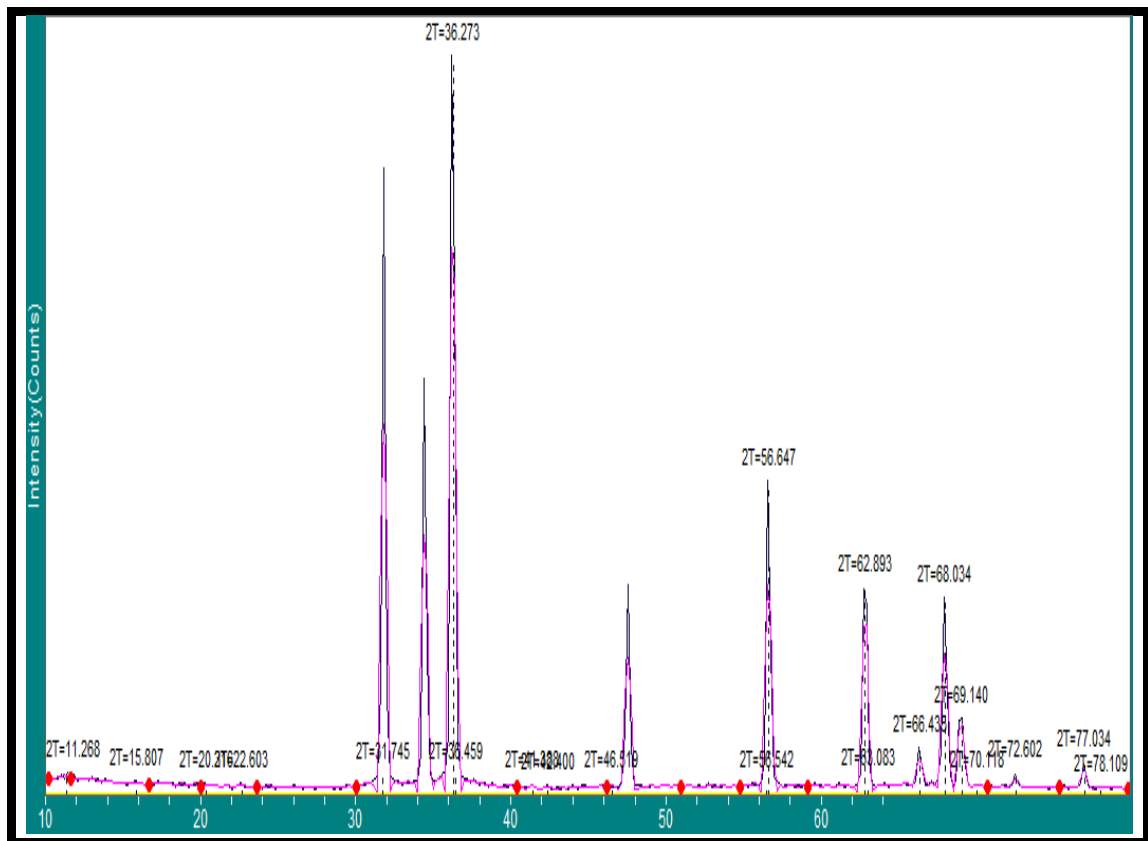
شكل (4-27): طيف الاشعة تحت الحمراء لأكسيد الزنك النانوي



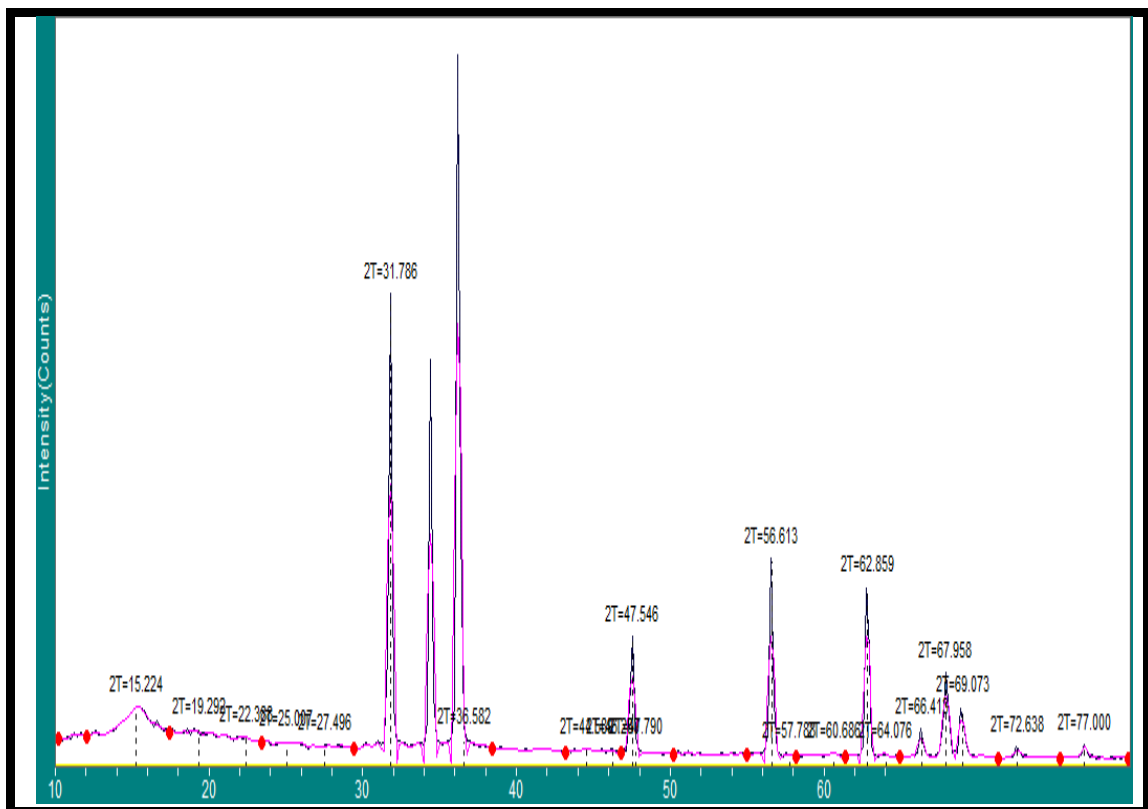
شكل (4-28): طيف الأشعة تحت الحمراء للمستخلص النباتي النانوي الهجين

2.1.3.4 : الفحص باستخدام طيف حيود الأشعة السينية (XRD)

أجريت دراسة طيف حيود الأشعة السينية لكل من طبقات أكسيد الزنك النانوية والمستخلص النانوي النباتي الهجين الذي تم تحضيره لمعرفة الاختلاف في سمك طبقة الأكسيد قبل الإقحام وبعده وذلك باستخدام قانون براك. وتبين من نتائج الفحص الموضحة في الشكل (4-29) أن طيف حيود الأشعة السينية لأكسيد الزنك يظهر عند المستوي 100 الزاوية 31.74° بمسافة بلورية تساوي 0.281 نانومتر، والمستوي 002 عند الزاوية 36.27° بمسافة بلورية 0.259 نانومتر في حين أن الحيود عند المستوي 101 فقد ظهر عند الزاوية 36.45° وبمسافة بلورية 0.246 نانومتر (Voicu *et al.*, 2013; Fatah, 2018). ومن خلال ملاحظة الشكل (4-30) يبدو أن عملية الإقحام مابين أكسيد الزنك والمستخلص النباتي قد تمت بنجاح إذ يظهر حيود عند المستوي 003 وعند الزاوية $(2\theta) 15.22^\circ$ بمسافة بلورية 0.58 نانومتر. كما يبدو أن مستوى الحيود 006 متداخل مع مستوى حيود أكسيد الزنك عند الزاوية $(2\theta) 31.78^\circ$ بمسافة بلورية 0.28، في حين يظهر حيود الأشعة السينية عند المستوى 009 عند الزاوية 36.58° وبمسافة بلورية 0.24 نانومتر مع وجود مستويات تعود إلى طبقات أكسيد الزنك.



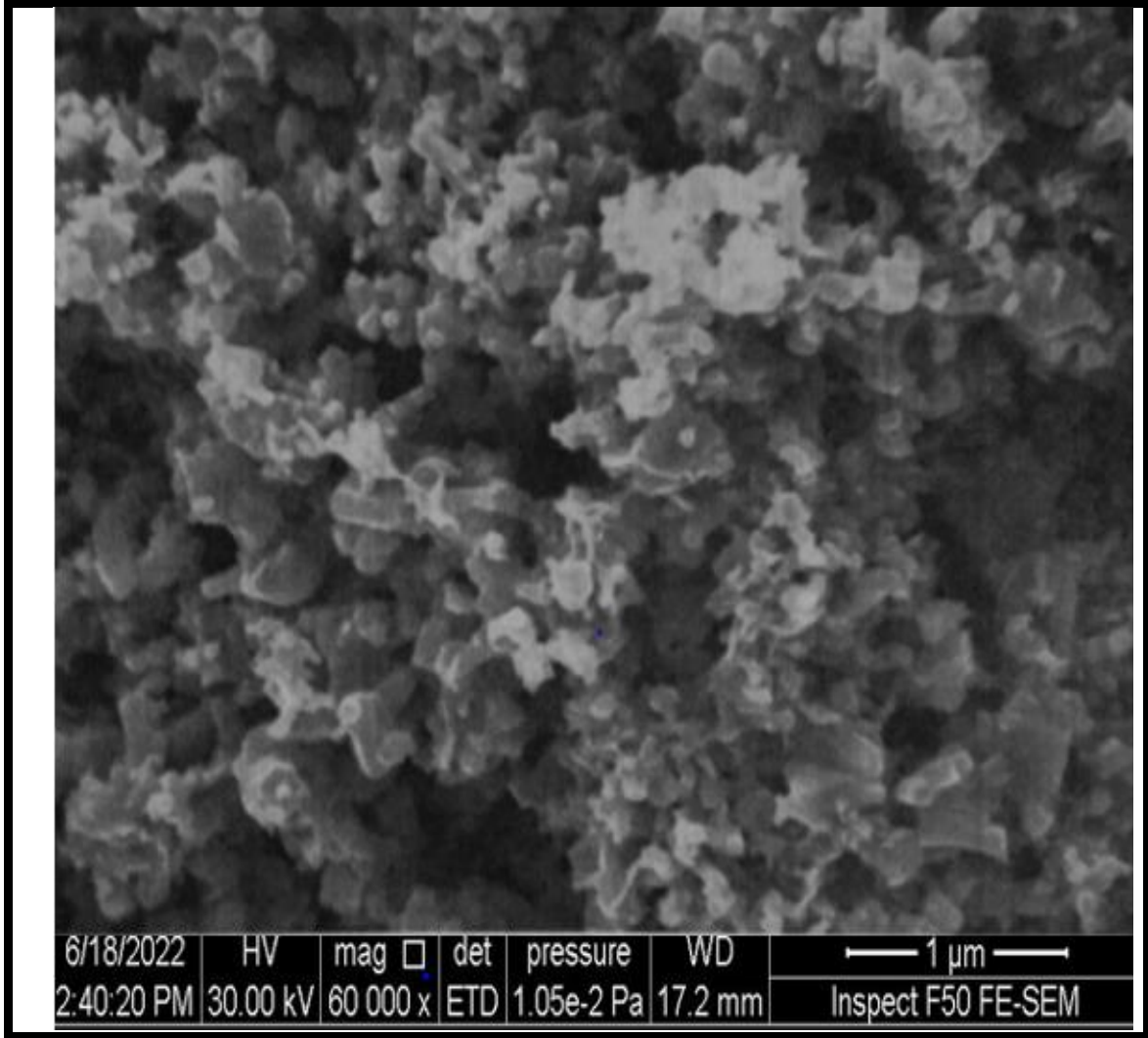
شكل (4-29): طيف حيود الاشعة السينية لطبقات أكسيد الزنك النانوي



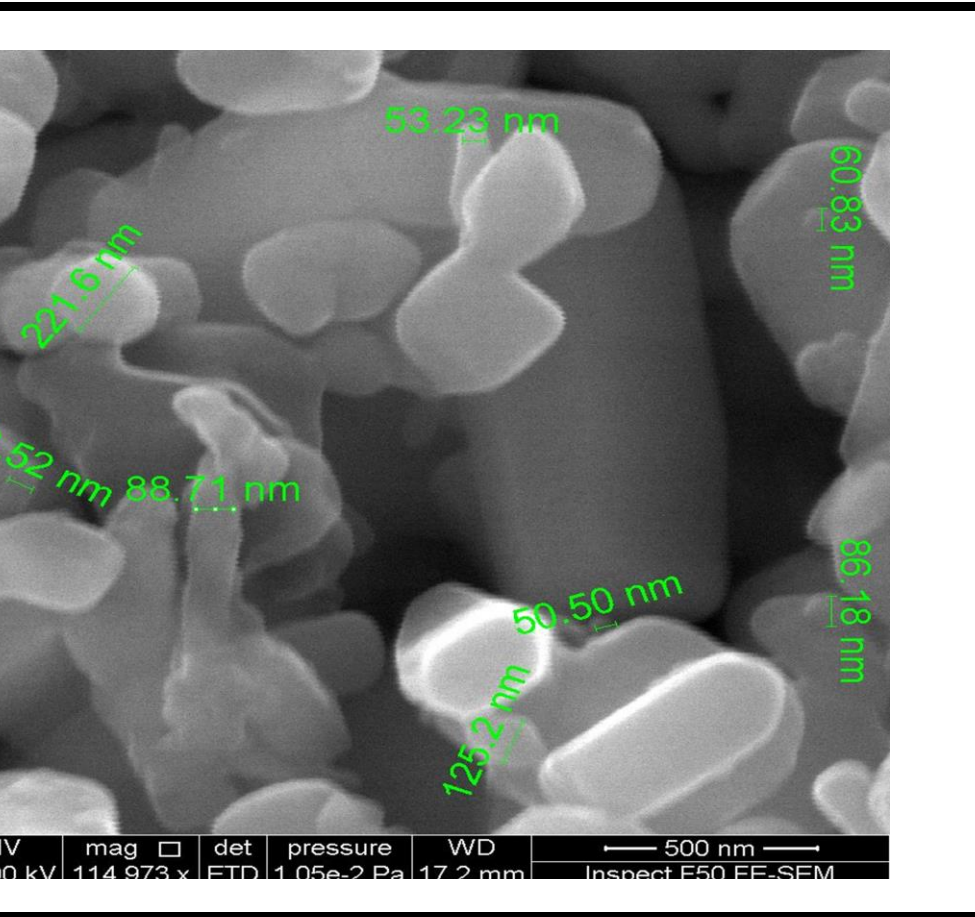
شكل (4-30): طيف حيود الاشعة السينية للمستخلص النانوي النباتي الهجين

3.1.3.4: الفحص باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح

تم دراسة السطح الخارجي للمستخلص النباتي النانوي الهجين وكذلك سطح طبقات أكسيد الزنك باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح وتبين كما في الشكل (4-31) وجود أشكال سداسية واضحة المعالم وتظهر فيها وريقات الأوكسيد مترابطة بعضها فوق بعضها الأخر بأشكال واحجام غير منتظمة وهذا يتفق مع ما ذكره (Bashi et al., 2013) هذه الأشكال غير المنتظمة تتحول الى أشكال هندسية منتظمة مختلفة تتخللها بعض الفراغات عند تكوين المستخلص النباتي النانوي الهجين الناتج من التفاعل المباشر لطبقات أكسيد الزنك مع مستخلص نبات الميريمية مما يدل على نجاح اقحام المستخلص النباتي بين طبقات الأوكسيد (شكل 4-32) وجاءت نتيجة الفحص بالمجهر الإلكتروني الماسح تؤيد النتائج التي تم الحصول عليها من طيف الأشعة تحت الحمراء وطيف حيود الأشعة السينية .



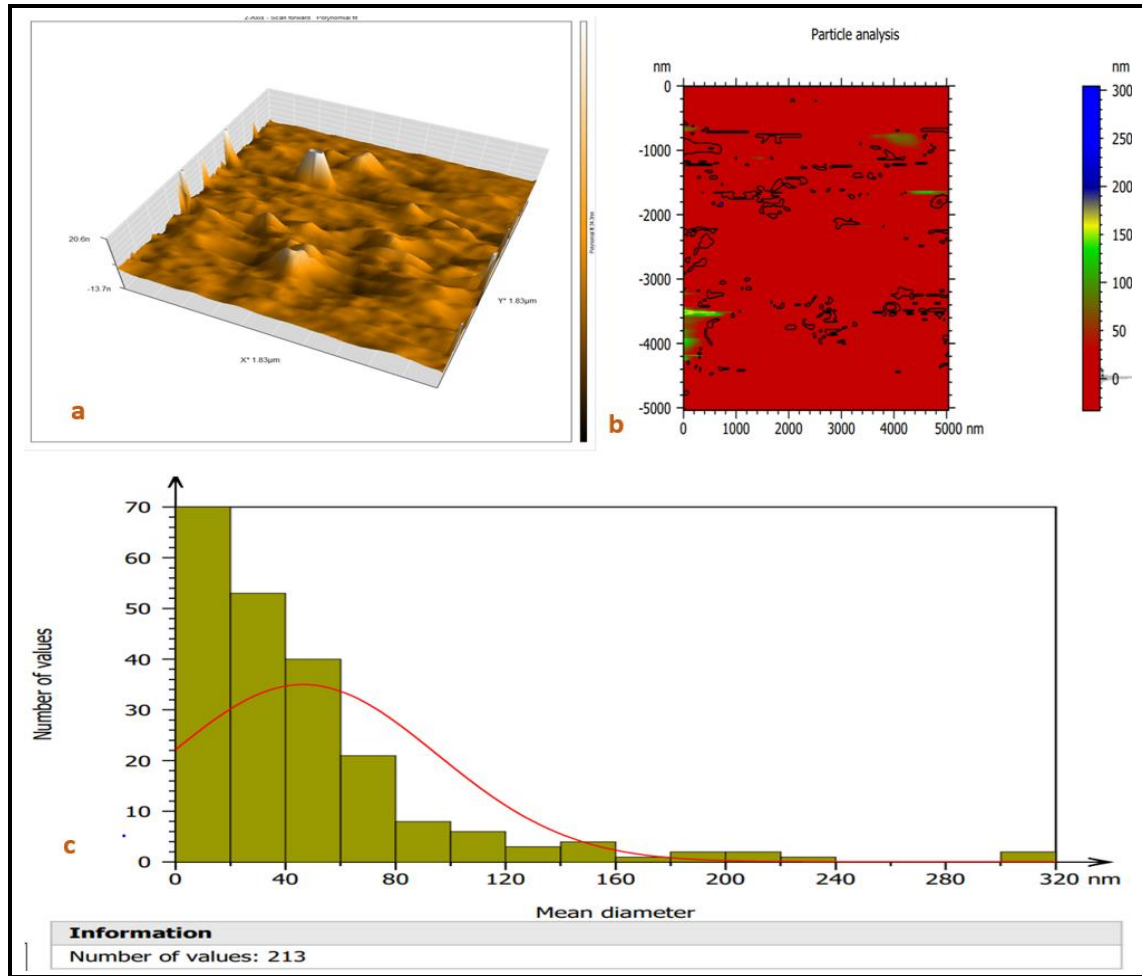
شكل (4-31): صورة أكسيد الزنك النانوي تحت المجهر الإلكتروني الماسح



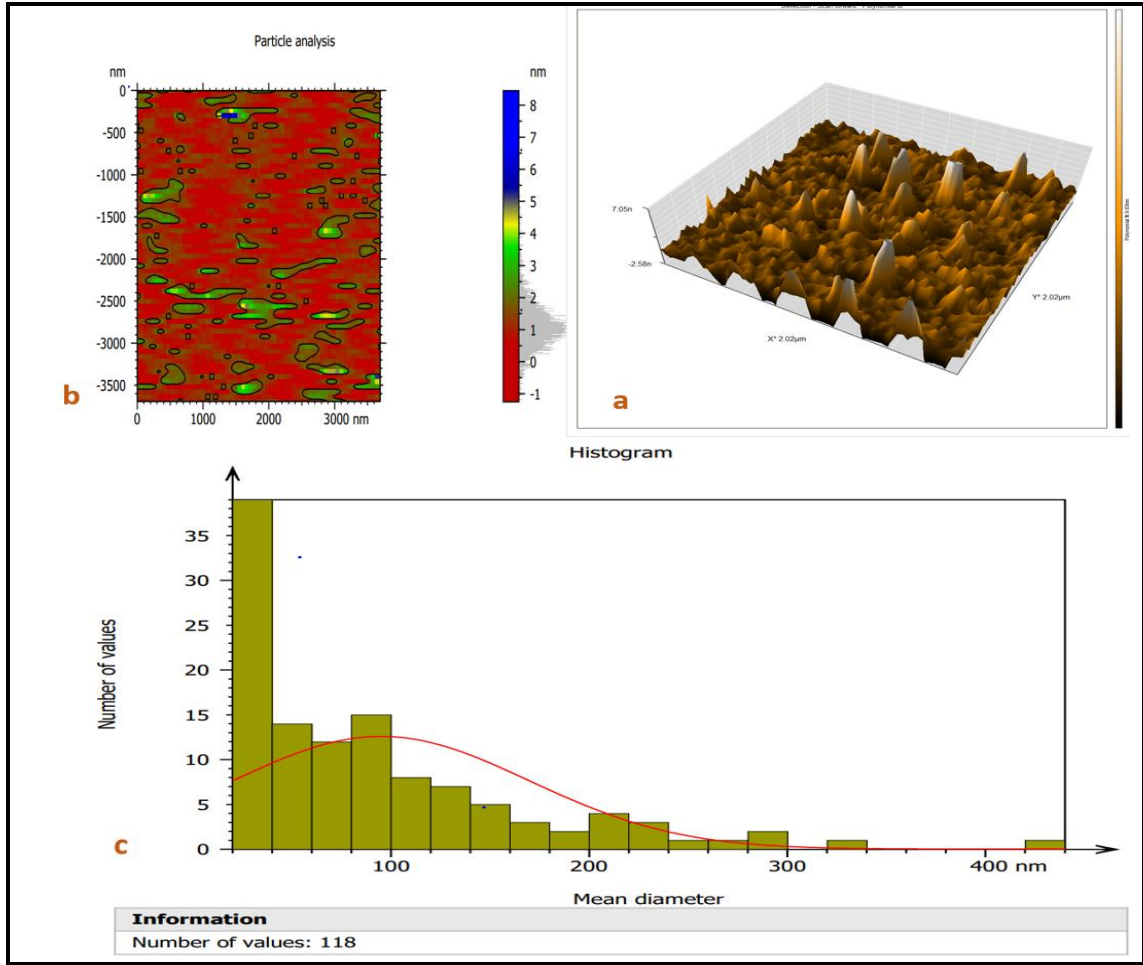
شكل (4-32): صورة للمستخلص النباتي النانوي باستخدام المجهر الالكتروني الماسح

4.1.3.4: التشخيص باستخدام مجهر القوة الذرية AFM

أجريت دراسة السطح الخارجي لدقائق أكسيد الزنك والدقائق النانوية النباتية الهجينة باستخدام مجهر القوة الذرية من نوع NaioAFM2022 nanosurf. اذ يبين الشكل (33-4a,b) صورة ثلاثية الابعاد وثنائية الابعاد لمقطع من سطح أكسيد الزنك النانوي تظهر فيها تجمعات دقائق أكسيد الزنك بأشكال مختلفة غير منتظمة و ذات ارتفاع 20.6 نانوميتر، وبأقطار تراوحت بين (20-100) نانوميتر (شكل 33-4 c) وبمعدل أقطار بلغ 46.5 نانوميتر، وبلغت خشونة السطح (Sa) 4.45 نانوميتر وأن معدل الجذر التربيعي (Sq) 7.79 نانوميتر .



الشكل (4-33):صورة أكسيد الزنك النانوي تحت مجهر القوة الذرية: (a) صورة ثلاثية الابعاد (b) صورة ثنائية الابعاد, (c)مخطط يوضح أقطار دقائق أكسيد الزنك النانوية وقد أدت عملية تحضير المستخلص النباتي النانوي الهجين (شكل 4-34a,b) الى الحصول على دقائق نانوية ذات اشكال مختلفة منتظمة ذات ارتفاع 7.05 نانوميتر, وبأقطار محصورة بين 100-25 نانوميتر (شكل 4-34c) وبمعدل أقطار بلغ 62.32 نانوميتر, وبلغت خشونة السطح (Sa) 19.73 نانوميتر وأن معدل الجذر التربيعي (Sq) 22.53 نانوميتر. أشار (طه, 2019) الى أن قيمة الجذر التربيعي تعرف بأنها مجموع الارتفاعات والانخفاضات السطحية مقسوما على حاصل جمع عددهما الكل تحت الجذر التربيعي وتعد هذه القيمة دليلا على خشونة السطح فكلما زادت قيمة متوسط الجذر التربيعي دل ذلك على زيادة معدل الخشونة.



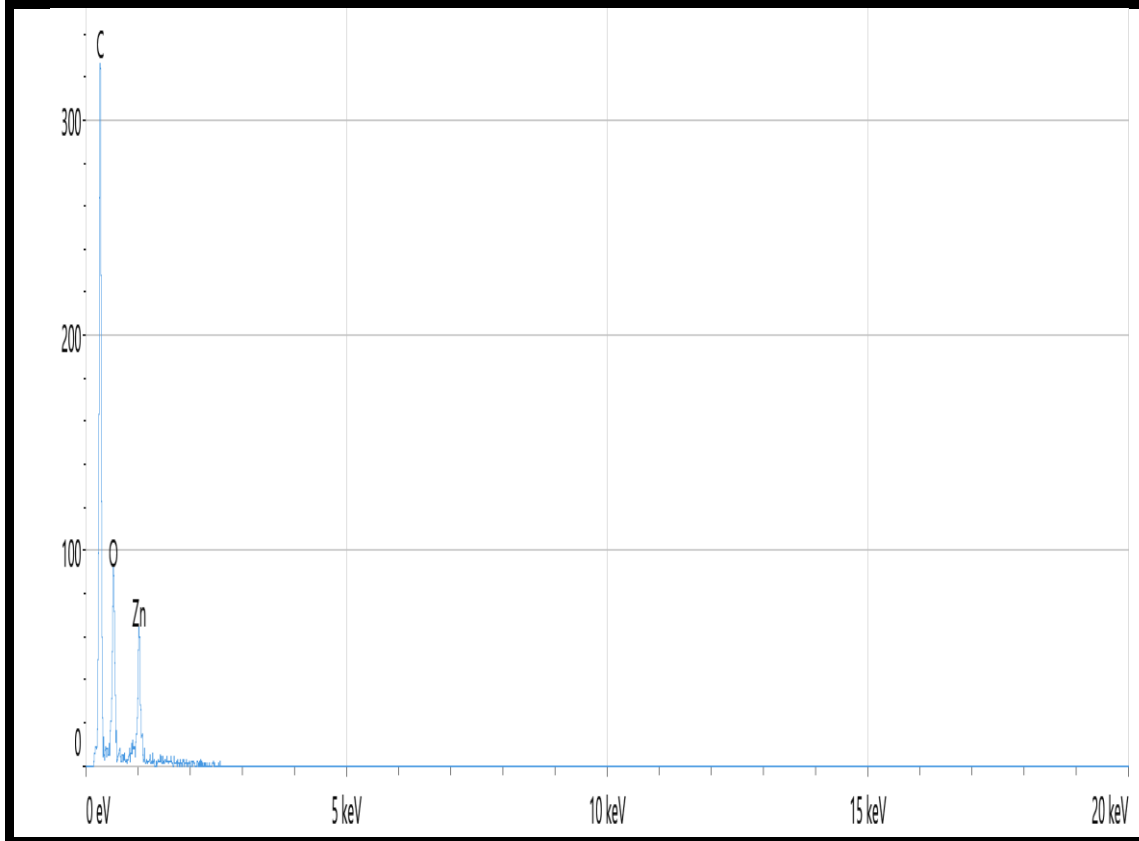
الشكل (4-34): صورة المستخلص النباتي النانوي تحت مجهر القوة الذرية: (a) صورة ثلاثية الابعاد (b) صورة ثنائية الابعاد (c) مخطط يوضح أقطار دقائق أكسيد الزنك النانوية

5.1.3.4: التشخيص باستخدام مطيافية التشتت Energy Dispersive Spectroscopy(EDS)

بينت نتائج الدراسة الموضحة في الشكل (4-35) عن وجود عناصر الزنك والاكسجين والكربون في تركيب المستخلص النباتي النانوي الهجين وهذا يدل على نجاح عملية الاقحام لمركبات المستخلص النباتي وطبقات أكسيد الزنك النانوية وبذلك تكون مركب نانوي نباتي هجين. هذه النتيجة توافقت مع ماتوصل اليه (Fatah (2018) كما تم التعرف على نسب العناصر الموجودة في المستخلص النانوي النباتي الهجين كما في الجدول (4-29) وتبين أن نسبة الكربون بلغت 57.5% ونسبة الاوكسجين 26.8% ونسبة الزنك بلغت 15.8%، هذه النتيجة توافقت مع ماتوصل اليه (Abomuti et al.(2021) الذي أشار الى أن وجود الكربون يشير الى المركبات البايولوجية مثل الحوامض الامينية والفلافونيدات والفيتامينات والفينولات المتعددة والصابونينات .

الجدول (4-29) : التحليل الدقيق للعناصر الموجودة في المستخلص النباتي النانوي

العنصر	النسبة المئوية (%)
C	57.5
O	26.8
Zn	15.8



الشكل (4-35): طيف تحليل مطيافية التشتت للمستخلص النباتي النانوي الهجين

2.3.4: الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي النباتي الهجين ضد أنواع المبيضات المعزولة

تمت دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي النانوي الهجين ZnOSNPs ضد سلالات أنواع المبيضات المعزولة الحساسة والمقاومة للامفوتيريسين , وتبين ان المستخلص النباتي النانوي الهجين اظهر فعالية عالية في تثبيط نمو الأنواع الحساسة والمقاومة مقارنة بمعاملات السيطرة التي لم تظهر أي فعالية تثبيطية وأظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود فروقات معنوية بين أنواع الفطريات والمعاملات التي أجريت عليها .اذ بينت النتائج الموضحة في

الجدول (4-30) والشكل (4-36, 4-37), أن السلالات الحساسة التابعة للانواع *C.albicans* , *C.kefyr* , *C.parapsilosis* , *C.tropicalis*, *C.lusitaniae* , *C.dubliniensis* والسلالات المقاومة من النوعين *C.lusitaniae* , *C.albicans* أظهرت حساسية تجاه المستخلص النباتي النانوي بلغت للانواع الحساسة 16,22,20,21,21.67,18.33 ملم , وللانواع المقاومة بلغت 19,17 على التوالي, وكانت اكثر كفاءة من المستخلص الكحولي في تثبيط كافة الأنواع المختبرة ومقاربة لفعالية مضاد الامفوتيريسين.

أشار (Alamdari et al. (2020) الى أن الآلية المحتملة لتكوين الدقائق النانوية باستخدام المستخلص النباتي ترتبط بجزيئات الفلافونويد او الفينول التي تتفاعل مع أيونات الزنك Zn^{+2} من خلال آلية الواهب (donor) - المستلم (acceptor) اذ تميل مركبات الاوكسجين أو الهيدروكسيل الموجودة في المستخلص النباتي الى التبرع بالكترون الى معقدات الزنك المحبة للالكترونات مما يؤدي الى أكسدة مجموعات الهيدروكسيل (OH) وإختزال الأيونات التي تعاني من نقص الالكترونات الى ذرات الزنك.

كما تبين من الجدول (4-30) أن أوكسيد الزنك النانوي لوحده لم يظهر أي فعالية تجاه الأنواع المختبرة وهذه قد تعزى حسب ما ذكر (Abed & Ali (2015) الى أن دقائق أوكسيد الزنك النانوية تكون فعالة كمضادات فطرية وبكتيرية عندما تغلف بمواد أخرى , كما ان فعاليتها المضادة تعتمد على شكل الجسيمات ووقت التعرض والتركيز ودرجة الحموضة والتوافق الحيوي (Siddiqi et al. 2018) .

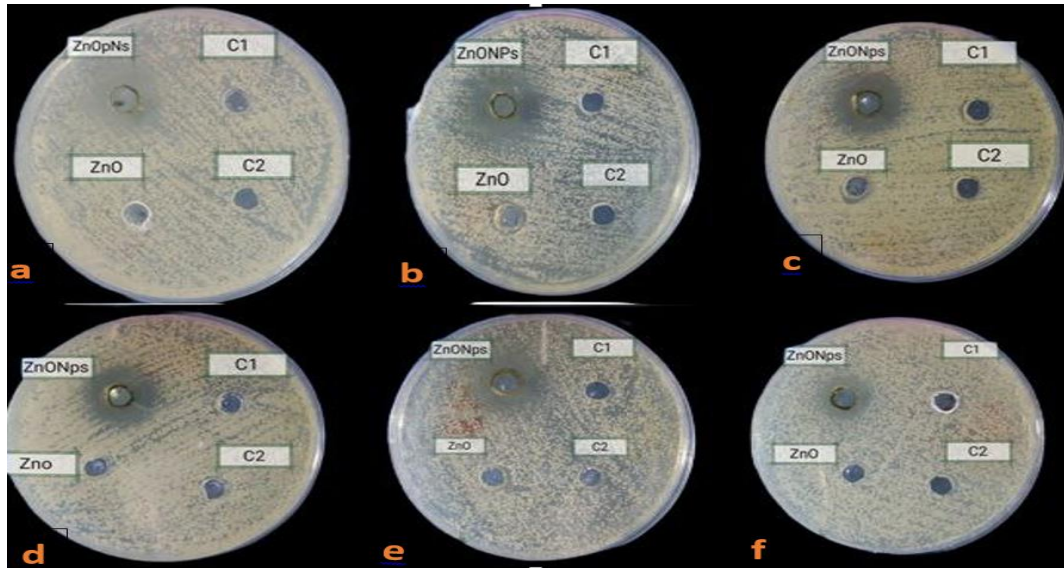
ذكر (Ocsoy et al.(2017) أن خصائص الدقائق النانوية مثل الحجم , والشكل , والتركيب , وشحنة السطح والديناميكية الحرارية تؤثر مباشرة على تفاعل الدقائق النانوية مع الجزيئات أو الخلايا. وجاءت النتيجة الحالية متوافقة مع ماسجله (Katafa & Hamid (2020) اذ سجلت لدقائق أوكسيد الزنك النانوية معدل تثبيط بلغ 11ملم عند التركيز 800 ملغم /مل في حين لم يظهر أي تثبيط عند التراكيز 500 و 50 و 10 و 2 و 1 و 0.5 ملغم /مل وتخالف ماتوصل اليه (Abed & Ali (2015) اذ أظهرت دقائق أوكسيد الزنك النانوية فعالية تثبيطية تجاه *C.albicans* عند التركيز ملغم 5.8 ملغم /مل .

جدول (4-30): الفعالية التثبيطية للمستخلص النانوي الهجين لاوراق نبات الميرمية ضد أنواع المبيضات المعزولة ومقارنته مع فعالية المستخلص الخام والمضاد الحيوي

السلالات الحساسة	ZnONSps (10 ملغم /مل)	المستخلص الكحولي الخام (10 ملغم /مل)	الأمفوتيريسين B (10 ملغم /مل)	C1	C2	ZnO	قيمة LSD بين كل سلالة والمعاملات
<i>C.albicans</i>	18.33	14.00	19.5	0.00	0.00	0.00	*1.76
<i>C.dubliniesis</i>	21.67	16.00	21.00	0.00	0.00	0.00	*1.25
<i>C.lusitaniae</i>	21.00	16.00	22.00	0.00	0.00	0.00	*1.73
<i>C.tropicalis</i>	20.00	18.00	20.5	0.00	0.00	0.00	*0.68
<i>C.parapsilosis</i>	22.00	16.00	20.00	0.00	0.00	0.00	*3.13
<i>C.kefyr</i>	16.00	15.00	18.00	0.00	0.00	0.00	*1.52
السلالات المقاومة							
<i>C.albicans</i>	17.00	12.00	17.00	0.00	0.00	0.00	*0.06
<i>C.lusitaniae</i>	19.00	15.00	19.00	0.00	0.00	0.00	*0.60

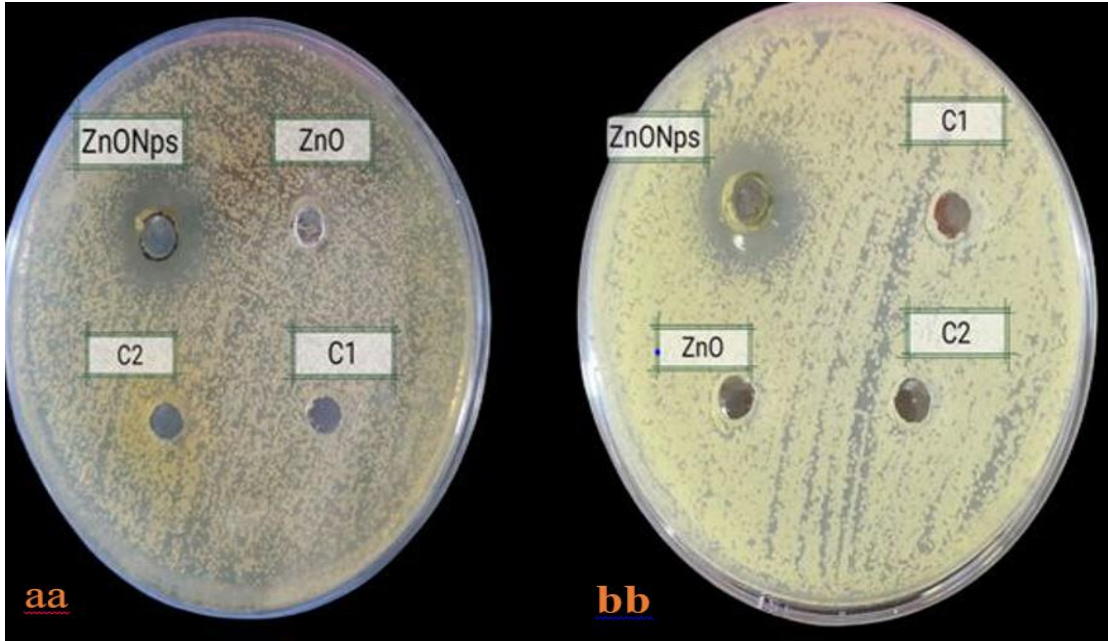
C1: معاملة سيطرة DMSO , C2: معاملة سيطرة كحول أثيلي 50%.

* : وجود فروقات معنوية.



الشكل (4-36): الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر ضد سلالات الأنواع الحساسة للامفوتيريسين . a= *C.albicans* , b= *C.dubliniesis* , c= *C.lusitaniae* , d=*C.tropicalis* , e= *C.parapsilosos* , f=*C.kefyr*

C1 = معاملة سيطرة DMSO , C2 = معاملة سيطرة كحول اثيلي 50%.



الشكل (4-37):الفعالية التثبيطية للمستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر ضد سلالات الأنواع المقاومة للامفوتيريسين . *C.lusitaniae* =bb , *C.albicans* = aa

C1 = معاملة سيطرة DMSO ، C2 = معاملة سيطرة كحول ايثلي 50%

3.3.4: تحديد التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص النباتي النانوي الهجين ضد أنواع المبيضات المعزولة

بينت نتائج الجدول (4-31) ان المستخلص النباتي النانوي الهجين أظهر فعالية تثبيطية عالية تجاه الأنواع المختبرة مقارنة بفعالية المستخلص الكحولي الخام والمضاد الحيوي الامفوتيريسين وكانت النتائج مقارنة لفعالية المضاد ، فقد التركيز المثبط الأدنى للمستخلص النانوي تجاه الأنواع الحساسة وهي *C. albicans* , *C.dubliniesis* , *C.lusitaniae* , *C.tropicalis* , *C.parapsilosis* , *C.kefyr* ، فقد بلغ 6.25 , 6.25 , 3.125 , 3.125 , 6.25 مايكروغرام/مل لكل منها وعلى التوالي في حين كانت قيم التركيز القاتل الأدنى 12.5 , 12.5 , 6.25 , 6.25 , 12.5 مايكروغرام/مل وبذلك تكون الأنواع *C.lusitaniae* , *C.tropicalis* , *C.parapsilosis* أكثر استجابة للمستخلص من بقية الأنواع . وفيما يخص الأنواع المقاومة للامفوتيريسين (جدول 4-32) فقد بلغت قيمة التركيز المثبط الأدنى , 50 25 مايكروغرام /مل لكل من *C.albicans* و *C.lusitaniae* ، فيما بلغت قيم التركيز القاتل 100 , 50 مايكروغرام /مل وعلى التوالي للأنواع أنفة الذكر ، وبذلك نجد أن السلالات الحساسة للامفوتيريسين تكون أكثر تحسنا للمستخلص النباتي النانوي الهجين مقارنة بالسلالات المقاومة وهذه النتيجة توافقت مع ماسجله (Abomuti et al.(2021) اذ توصل الى

أن التركيز المثبط والقاتل للمستخلص النباتي النانوي لنبات الميريمية تجاه *C.albicans* أظهر كفاءه عالية في تثبيط السلالات الحساسة اذ بلغت قيمة MIC 1.95 مايكروغرام /مل وقيمة MFC 3.91 مايكروغرام /مل مقارنة بفعاليتها تجاه السلالات المقاومة اذ سجلت قيم للتركيز المثبط والقاتل الأدنى بلغت 7.81 و 15.62 مايكروغرام /مل على التوالي .

جدول (4-31): قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص النباتي النانوي الهجين والكحولي الخام المحضر من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين

أنواع المبيضات						نوع التركيز	المركب النباتي النانوي الهجين
<i>C.albicans</i>	<i>C.dublinensis</i>	<i>C.lusitanae</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.kefyr</i>		
التركيز مايكروغرام /مل							
6.25	6.25	6.25	6.25	3.125	3.125	MIC	
12.5	12.5	12.5	12.5	6.25	6.25	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
12.5	25	12.5	12.5	12.5	25	MIC	المستخلص الكحولي الخام
25	50	25	25	25	50	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	
0.781	0.1953	0.781	0.781	0.3905	0.3905	MIC	المضاد الحيوي الامفوتيريسين
1.562	0.3905	1.562	1.562	0.781	0.781	MFC	
+	+	+	+	+	+	C1	
-	-	-	-	-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) ، C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي). +: ظهور النمو ، -: عدم ظهور النمو.

(MIC) : التركيز المثبط الأدنى ، (MFC) : التركيز القاتل للفطريات الأدنى .

جدول (4-32): قيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) والتركيز القاتل الأدنى (MFC) للمستخلص النانوي الهجين والكحولي الخام المحضر من أوراق نبات الميريمية ضد أنواع المبيضات المقاومة للامفوتيريسين

أنواع المبيضات		نوع التركيز	
<i>C.lusitaniae</i>	<i>C.albicans</i>		
التركيز مايكروغرام /مل			
25	50	MIC	المركب النباتي النانوي الهجين
50	100	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
50	200	MIC	مستخلص كحولي خام
100	400	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	
3.125	6.25	MIC	المضاد الحيوي الامفوتيريسين
6.25	12.5	MFC	
+	+	C1	
-	-	C2	

C1: سيطرة نمو (وسط زرعي مع عالق الفطر) ، C2: سيطرة خالية من النمو الفطري (فقط وسط زرعي). +: ظهور النمو ، -: عدم ظهور النمو.

(MIC) : التركيز المثبط الأدنى ، (MFC) : التركيز القاتل للفطريات الأدنى .

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات :

- 1- وجود أنواع مختلفة من المبيضات التي تسبب داء المبيضات الفموي لدى الأطفال في محافظة كربلاء وكان من أكثرها ترددا المبيضات البيضاء *Candida albicans* .
- 2- أظهرت جميع عزلات الأنواع المعزولة حساسيتها تجاه المضادات الحيوية Fluconazole و Caspofungin و Voriconazole , Micafungin باستثناء عزلتين من *C.albicans* وعزلة واحدة من *C.lusitaniae* كانت مقاومة لمضاد الامفوتيريسين , وعزلة واحدة من النوع *C.dublinsiensis* كانت مقاومة للفلوسايتوسين .
- 3- احتواء المستخلص المائي والكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية على مركبات الصابونينات والتانينات والكاربوهيدرات والكلايكوسيدات والراتنجات والفلافونويدات , في حين أظهرت الكشوفات وجود مركبات إضافية مثل القلويدات والفينولات في المستخلص الكحولي مقارنة بالمستخلص المائي .
- 4- تفوق المستخلص الكحولي الخام لاوراق نبات الميريمية في تثبيط جميع أنواع المبيضات المعزولة الحساسة, والمقاومة عند جميع التراكيز المختبرة بالمقارنة مع فعالية المستخلص المائي وكانت أقل من فعالية المضاد الحيوي الامفوتيريسين .
- 5- كفاءة الجزء المفصول بوساطة الكلوروفورم : أثيل أسيتيت في تثبيط جميع أنواع المبيضات المختبرة مقارنة ببقية الأجزاء المفصولة من المستخلص النباتي الكحولي .
- 6- إمكانية فصل وتنقية المركبات الفعالة من جزء الكلوروفورم : أثيل أسيتيت باستعمال تقنية Prep.HPLC وتشخيص هذه المركبات باستعمال الكروماتوغرافيا التحليلية HPLC .
- 7- أظهرت المركبات المفصولة وهي Kaempferol , Caffeic acid , Ferulic acid فعالية تثبيطية تجاه جميع أنواع المبيضات الحساسة للامفوتيريسين.
- 8- إمكانية تحضير مستخلص نباتي نانوي هجين باستخدام المستخلص الكحولي لاوراق نبات الميريمية .
- 9- كفاءة المستخلص النباتي النانوي الهجين المحضر في تثبيط أنواع المبيضات المعزولة وكانت مقارنة لفعالية المضاد الحيوي الامفوتيريسين .

التوصيات :

- 1- التحري عن الجينات المسؤولة عن مقاومة أنواع المبيضات للامفوتيريسين .
- 2-أجراء دراسات للتعرف على بقية أنواع المركبات الفعالة الموجودة في أوراق نبات الميريمية واختبار فعاليتها التثبيطية.
- 3- دراسة تأثير المستخلص النباتي النانوي الهجين لأوراق نبات الميريمية على التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن عوامل ضراوة المبيضات.
- 4-استعمال مستخلص الميريمية والاجزاء المفصولة منه في تثبيط ممرضات فطرية أخرى وممرضات بكتيرية وطفيلية .
- 5-استعمال تقنيات أخرى لتحضير مركبات نانوية من مستخلص أوراق الميريمية .
- 6-ادخال المستخلص النانوي الهجين المحضر في صناعات دوائية بعد اجراء دراسات موسعة عليه للحد من الإصابات الفطرية وغيرها .
- 7-أختبار كفاءة الأنواع الأخرى من جنس *Salvia* والمتوفرة في العراق في تثبيط نمو المبيضات.

المصادر

المصادر العربية :

- أحمد , سهاد عدنان ; محمود سيرين شحده و عبد الكاظم , لمياء سليم .(2008).دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلصات نبات المرمية *Salvia officinalis* في نمو بعض أنواع البكتريا المرضية .المجلة العراقية للتقانات الحياتية .7(1):51-63.
- الاسكندراني , محمد شريف .(2010). تكنولوجيا النانو من أجل غد أفضل. المجلس الوطني للثقافة والفنون والاداب .الكويت .
- التميمي , زينب لطيف حميد . (2019). الخصائص الجزيئية للفطر *Rhizoctonia solani* على نبات الطماطة وأمكانية مكافحته باستخدام العوامل الحيوية والتقنية .رسالة ماجستير .كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء.
- الجبوري , نيران عبد الكاظم .(2016). تقييم الكفاءة التثبيطية لبعض المضادات الحيوية الحرة والنانوية ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة محلياً . رسالة ماجستير .كلية العلوم / جامعة كربلاء.
- الجابر , غزوان طالب نوري . (2008) . الفعالية ضد جرثومية لمستخلص أثنين من المركبات الفينولية لنبات السماق *Rhus sp*. مجلة أبحاث البصرة .2(34) .22-32 .
- الخزعلي , ميساء تقي .(2017) . عزل وتشخيص خمائر المبيضات *Candida spp* من حالات التهاب اللثة وتسوس الاسنان والكشف عن قدرتها على تكوين الغشاء الحيوي . مجلة جامعة كربلاء العلمية .15 (4) : 105 – 115.
- الخفاجي , زهراء خضير عباس .(2017) . توصيف بعض عوامل الضراوة والتعبير الجيني لانزيم Secreted Aspartyl Proteinase في المبيضات البيضاء المعزولة من داء المبيضات الفموي في مرضى السرطان .اطروحة دكتوراة.كلية التربية/جامعة القادسية.
- الخفاجي , كريمة أمين حسين والمعموري زيدان خليفة عمران .(2019).أهم الفطريات الطبية وأمراضها , طرائق عزل :تشخيص ومعالجة . بيروت – لبنان.
- الرفاعي , فؤاد نمر . (2016) . مفاهيم أساسية في تقنية النانو . العراق.

- **السلمان** , قيصر عبد السجاد محمد حسين . (2018) . تحضير مركبات نانوية من بعض ادوية التهاب المفاصل الرثواني مع أوكسيد الزنك ودراسة تأثيرها على بعض المعايير المناعية في الجرذان البيضاء . أطروحة دكتوراة . كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء .
- **الساعدي** , عباس خماس . (2020) . النانوتكنولوجيا . مكتبة اليمامة للطباعة والنشر , ط1 . بغداد .
- **الساعدي** , عباس خماس . (2022) . أساسيات المواد النانوية . بغداد . ص232 .
- **الساعدي** , عباس خماس . (2021) . تشخيص و توصيف المواد النانوية . ط1 . دار الأمير للطباعة والنشر - بغداد .
- **السعيد** , زهراء شاكر . (2015) . تحضير مضادين فطريين نانويين هجينين من النسنتين و الكلوتريمازول و تقييم كفاءتهما التثبيطية ضد بعض أنواع خميرة . *Candida spp* . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .
- **الشيخلي** , محمد عبد الستار ; عبد الجليل , فريال حسن و العزاوي , حسن فياض . (1993) . الكيمياء التحليلية . الجامعة المستنصرية .
- **الشيخلي** , زيدون وليد محمد و هوازن احمد عبد . (2022) . عزل وتشخيص المبيضات عند الأطفال المصابين بداء السلاق الفموي ودراسة قدرتها على انتاج انزيمي hemolysin , protease , مجلة الدراسات التربوية والعلمية-الجامعة العراقية . 2(1):47-57 .
- **العابدي** , عقيل نزال; أبو دكة , احمد برير ; الغزالي , نور علي و علي , امل عاجل . (2018) . التشخيص الجزيئي لعزلات تابعة للفطريات *Rhizoctonia solani* و *Fusarium verticilliodes* و *Pencillium tardosgenum* المعزولة من جذور بعض نباتات الطماطة . مجلة كربلاء للعلوم الزراعية . (2):41-59 .
- **الغزالي** , ليندا حميد تركي . (2008) . دراسة الفعالية التثبيطية لبعض المستخلصات النباتية ضد بعض الفطريات الجلدية . رسالة ماجستير . كلية العلوم / جامعة كربلاء .
- **الفتلاوي** , نورة غانم . (2021) . عزل وتشخيص بعض انواع البكتريا المسببة لإصابات المسالك التنفسية وتقييم كفاءة تثبيطها باستخدام المضادين أزيثرومايسين وسبروفلوكساسين المحضرين نانويا . رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة كربلاء .

- **المقداد , منال و الكفري, عبير . (2019).** دراسة حساسية المبيضات البيض المعزولة من العينات المرضية المختلفة من مرضى مستشفى المواساة والأطفال الجامعي لمضادات الفطريات. مجلة التشخيص المختبري . 8(7) .
- **تركي ,نصر عافت ;علي, حميد حسين و ثابت , زيد أكرم .(2019).** الفعالية البايولوجية لمستخلصات جذور نبات القسط الهندي ضد نوعين من الخطوط الخلوية السرطانية. مجلة كلية المعارف الجامعة . 29(1):694-713 .
- **جمعه , عبير نزار ; عبد الحميد ,حنان رشيد ;نعمان ,ايناس محجن و جاسم ,عبد الرزاق داود .(2019).** أستخلاص وتقييم الفعالية المضادة لتوليفة نباتية من مستخلصي نباتي الشيح والميريمية على فطر *C.albicans*. المجلة العراقية للبحوث الصناعية . 6(2):1-6.
- **حبيب , خالد عبد الرزاق ; عبد المجيد , سرى مؤيد و الجميلي ,عصام فاضل .(2007).** دراسة حول المبيضات *Candida spp* المسببة لداء السلاق الفمي والبكتريا المرافقة لها لدى الأطفال . مجلة أم سلمة للعلوم 4(2) : 207-201 .
- **حبيب , رجاء علي ; السعدي , علي محمود و جاسم , نيران عبيد .(2015).** عزل وتشخيص بعض أنواع خمائر *Candida species* ودراسة حساسيتها لبعض المضادات الفطرية ,مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية .العدد(3) المجلد (32).
- **حميد , نضال وهاب .(2021).** تأثير المركبات الثانوية المحضرة من الفطر *Agaricus bisporus* على الفطرين *Trichophyton rubrum* و *Microsporum canis* . رسالة ماجستير . كلية التربية للعلوم الصرفة- جامعة كربلاء .
- **خضير,امال سالم .(2021).** تأثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الميريمية *Salvia officinalis* في بعض الفطريات المنتجة لسلم الافلا والمعزولة من بعض منتجات الحليب.رسالة ماجستير.كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة كربلاء.
- **سرحان ,عبد الرضا طه , (2012).** علم الفطريات العملي ,وزارة التعليم العالي والبحث العلمي, كلية مدينة العلم الجامعة .ط1- بغداد .
- **سماكة, حيدر محمود علي .(2012).** الخصائص الجزيئية للمبيضات البيضاء المعزولة من المرضى المثبتين مناعيا في النجف. اطروحة دكتوراة .كلية الطب / جامعة الكوفة .

- شهاب, زينة هاشم و صالح, ضفاف محمد. (2013). مقارنة فاعلية مستخلصات نبات الميريمية *Salvia officinalis* والغسول الفموية Chlorhexidine على بعض أجناس بكتريا الفم. مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة. 7(1): 1-7.
- شوكت, مؤيد صبري ; احمد, نجوى شهاب ; عبد الأمير, علي صبيح والدراغجي, واثق عباس. (2012). أستخلاص بعض المركبات الفعالة والمعدنية من أوراق نبات الميريمية ودراسة التأثير التثبيطي ضد بعض الفطريات الممرضة للنبات. مجلة ديالى للعلوم الصرفة. 3(3): 308-324.
- طه, زينب خضير . (2019). التصنيع الحيوي لدقائق الفضة المتناهية في الصغر بأستخدام فطر *Pencillium italicum* وتقييم الفعالية المضادة للاكسدة والصد مكروبية والمضادة للسرطان. رسالة ماجستير. كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم /جامعة بغداد .
- محمد , عائشة ; زوبي, وفاء ; مريم, م. ورجاء, ف. (2021). عزل وتشخيص أنواع المبيضات المسببة لمرض السلاق الفموي في الأطفال. مجلة العلوم الإنسانية والطبيعية. 2(4): 469-479.
- عبد الواحد, وفاء ; الحمداني, عدنان حمد و الشبلي, ماجد كاظم. (2016). التوصيف المظهري والجزئي لبكتريا *Streptococcus mutans* المعزولة من الفم وأختبار قدرتها على تكوين الاغشية الحيوية ومقاومتها للمضادات الحيوية. مجلة القادسية للعلوم الصرفة. 21(2): 1-20.
- علوش, ميساء توفيق. (2020). التخليق الحيوي للجسيمات النانوية وتطبيقاتها في مجال مكافحة الافات الزراعية: دراسة مرجعية. الجمعية العربية لوقاية النبات. 38(4): 267 - 279.
- علي, سارة رياض. (2021). التأثير النسيجي والفسلجي المستحث في الجهاز التناسلي لاناث الجرذان الحوامل واجنتها المصابة تجريبيا بفطر *Candida albicans* والكشف عن فاعلية المستخلص النانوي للثوم في المعالجة. اطروحة دكتوراة. كلية العلوم / جامعة تكريت .
- علي, منعم رضوان و عبود, أنمار سعدي. (2010). الفعالية المضادة للبكتريا للمستخلص المائي والكحولي لنبات الميرمية والصفصاف المستعملة في علاج أخماج الجروح. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. 23(3): 3-3.

- كريم , بيمان علي والسماك اسراء غانم . (2017) . تأثير الدقائق النانوية للفضة واوكسيد الزنك على بعض من سلالات النوع *Staphylococcus aureus* المتعددة المقاومة للمضادات الحيوية وملاحظتها بالمجهر الالكتروني الماسح .مجلة تكريت للعلوم الصرفة . 22(4):27-34 .
- محمد , بان طه ; المطيري , محمد كاظم و العبودي , خنساء عبد الحسين . (2016) . عزل وتشخيص *Candida albicans* مظهرها وجزئيا من منطقتي الفم والحفاظة لاطفال من مستشفى كربلاء التعليمي للأطفال في مدينة كربلاء المقدسة . مجلة جامعة كربلاء العلمية . 14 (4) .116-121.
- محمد,سحر باسل و زينة وجيه الجادر . (2021) . عزل وتشخيص عزلات محلية من الخميرة *Candida spp.* بالاختبارات الكيموحيوية .مجلة التربية والعلوم . 30(3):150-166.

المصادر الإنكليزية :

- AbdelKader**, H.; Massoud,H.; Mosa, H.; Eisa, E. and Nour ,E. (2014). Effect Of Bio- Fertilizaters And Plant Extracts On Growth, Essential Oil And Chemical Constituents Of Sage (*Salvia officinalis* L.) plant, under water stress conditions . J. Plant Production, Mansoura Univ., 5 (6): 1003 – 1020.
- Abdullahi ,R.** & Manul ,H.(2021).Preperation of medicinal plants:basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes , J. of Pharmacy and Biollied Sciences.12(1):1-10.
- Abed** ,S. and Ali,A.(2015).Effect of zinc oxide nanoparticles on *C. albicans* of human salivaria (in vitro study). European J. of Medicine.10(4):235-243.
- Abomuti**,M.;Ekram,Y.;Ahmad,F;Nazim,H.andMaqsood,A. (2021). Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using *Salvia officinalis* Leaf Extract and Their Photocatalytic and Antifungal Activities.Biology .10(11):1075.

Abubakar,A. and Haque , M. (2020). Preparation of Medicinal Plants : Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes . Pharm Bioallied Sci .12(1) :1-10 .

Adane , B. and Yeshiwork,A.(2018). Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern . BMC Women's Health . 18(94):1-10.

Afrin, I.; Jahan, A. and Hasan, K. (2018).Novel approaches of herbal drug delivery, J. Pharm. Res. Int. 21 :1-11.

Ahmed,I.;Mehmood , Z. & Mohammad , f . (1998) . Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties . J. Ethnopharmacole . 62 : 183-193 .

Ahmed ,S.; Ghulam , M.;;Muhammad , F.;; Khadija , A.;;Tayyaba , F.;; Muhammad , S.;; Irshad, K. and Tayyaba , M.(2021). Recently Developed Methods for Synthesis of Nanoparticles, Recent Advances and Applications for Scientific Developments. Sch Bull. 7(10): 274-278.

Alamdari,S.; Ghamsari,M.;; Lee ,C.;; Han,W.;; Park ,H.;; Tafreshi ,M.;; Afarideh,H. and Ara,A.(2020) Preparation and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles Using Leaf Extract of *Sambucus ebulus* .Appl.Sci.10:1-19.

Aldossary, M.;Nasir,A. and Bahar,S. (2016).Isolation and identification of *Candida* species from oral cavity of cancer patients undergoing

chemotherapy in Basrah,Iraq.Journal of Biology ,Agriculture and Healthcare.18(6):22-30 .

Ali A. ; Mohammad S. ; Khokhar I. ; Basher . ; Moshtak . and Mocktar I . (2011b). Antibacterial activity of culture extracts of penicillium species against soil -borne bacteria .Institute of Agricultur Sciences , Univ. of the Punjab , Lahore 54590 Pakistan.

Ali , J .; Biazar , E .; Montazeri , M .; Majdi , A .; Aminifard , S .; Safari , M. and Akbari , H. R. (2011b) . Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical Solar Cells designs . Int .J. Nanomedicine , 6 : 1117-1127.

AL-Mamoori,F.;AL-Twalbe.D.;and AL-naqeeb,M.(2021).Medical plants for the treatment and management of oral infections .Areview.Trop.J.Nat.Prod.Res.5(9):1528-1536.

Almeida ,C. ;Rochat ,E.; Alves ,E.; Lima,R.; Cavalcanti , Y.; Gomes , R.; Pereira ,J. and Costa,E.(2019) . In vitro Evaluation of the Antimicrobial Potential of *Salvia officinalis* L. against Oral Pathogens.J Health Sci .21(2):129-33.

Al-Rawi,A.(2014).Discription of wild plants in Iraq,3th , Baghdad-Iraq.Pp.154.

Al-Somaiday ,H.; Al-Samaray ,M. and Al-Samydai,A.(2020). Role of Herbal Medicine in Oral and Dental Health; Ethnopharmacological Study of Medicinal Plants in Iraq/Baghdad . Int. J. Res. Pharm. Sci. 11(1: 553-560.

Altaee,R.,Q. and Alzubaidy ,R.Q . (2020). Isolation and diagnosis of *Candida albicans* yeast from patients infected with oral candidiasis in mosul city and study its activity in production of phospholipase and hemolysin .J.of Education and Science 29(2):133-148.

Al-Terehi,M.; Al-Saadi,A.; Abed-Neama,Z.; Al-Askeri,M.;Zaidan,H.; Habeeb,R. Noora ,M. and Zahraa , H.(2015). Some Herbal Medicinal Plants Activity against *Candida* spp. which Resistance to Antifungal Drugs. Advances in Life Science and Technology .36:53-56.

Anane,S; Kaallel ,K.; Kauch,and Chaker,E.(2007).*Candida dubliniensis* emerging species ,An.Rio.Clin.,65(1):13-1.

Anibal, A.; Janaina , S.; Iza, T .; Julianna, J.and José,F.(2010). Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis .Brazilian Journal of Microbiology.41:824-831.

Anushri,M.;Yashoda,R.and Puranik,M.(2015).Herbs:Agood alternatives to current treatments for oral health problems.dermatitis(from topical application) .Int.J.Health.Sci.1(12):9-12.

Ashe , B. (2011) . A Detail investigation to observe the the effect of zinc oxide an Silver nanoparticles in biological system .Thesis.National Insstitute of Technology.

Aslam,S.; Tahir,A.;Mohammed , F.A.;Muhammed,W.; Arshad,A.and Sehrish,S.(2017). Recent advances in molecular techniques for the identificationofphytopathogenic fungi.Amini review.J.Plant.Int.12(1):493-5504.

Aziz,R.;Enas,J. and Zainab,G.(2012). Chemical composition and antimicrobial activity of *Artemisia monosperma* and *Salvia officinalis* L.plants.J.of the college of basic education .73.

Badiee ,P.; Nasirzadeh,A. and Motaffaf ,M.(2012). Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against candida species. J. of Pharmaceutical Technology & Drug Research . 120:1-7.

Bahrami M .; Ramazani , A .; Hanifehpour , Y .; Fattahi , N .; Taghavi Fardood , S; Azimzadeh , P. and Joo , S. W. (2016) . In situ generated stabilized phosphorus ylides mediated a mild and efficient method for the preparation of some new sterically congested electron - poor N - vinylated heterocycles . Phosphorus , Sulfur , and Silicon and the Related Element 191 (10) , 1368-1374.

Bagdat, B.(2011). Thin Layer Chromatography (TLC) Separation of Some Medicinal and Aromatic Plants . 6(3):353-356.

Bashi,A.;Hussein,M.;Zainal,Z.and Tichit ,D.(2013).Synthesis and controlled release properties of 2,4-dichloropheoxy acetate-zinc layered hydroxide nanohybrid .J.of Solid State Chemistry.203:19-24

Bhai, N.; Tendolkar, U.;Baradkar, V. ; Mathur,M. and Madhuri Kulkarni.(2014). Paediatric oropharyngeal and cutaneous candidiasis with special reference to *Candida dubliniensis*.J.of Medical Microbiology.63(4):518-521.

-Bhargava,B.(2019).Standard operating procedures for fungal identification and detection of antifungal resistance.2nd .ICMR.India.

Bhat , V .; Sharma , S.M .; Shetty , V .; Shastry , C.S. and Rao , V. (2011) Extracellular Enzyme of *Candida albicans* and their role in development of Denture Stomatitis - a Review . JIADS VOL - 2 Issue 1 January - March : 26- 30.

Bhattacharya, S.; Sutthichai ,S, and Bitten ,C.(2020).Chandidiasis and mechanisms of antifungal resistance.Antibiotics .9(6):312.

Behradmanesh, S .; Derees , F. and Rafielan – kopaei , M.(2013). Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients . J. Renal Inj . Prev . 2 (2) : 51-54.

Berkow,E.;Lochart,S. and Zeichner,L.(2020).Antifungal susceptibility testing;current approaches. Clin. Microbiol .Rev.33(3):19-69.

Berthomieu,C.and Hienerwadel ,R.(2009).Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy .Phytosynthesis research.101(2):157-170.

Calgin ,M. and Yeliz, C.(2018). Distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species at a university hospital in Northern Turkey . J Infect Dev Ctries . 12(2):97-10 .

Caroling , G .; Tiwari , S. K .; Ranjitham , A. M. & Suja , R. (2013) . Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous broccoli extract - characterization and study of antimicrobial , cytotoxic effects . Asian J Pharm Clin . Res. 6 (4) 165-172 .

Castillo , A.; Laila ,N.;; Rigoberto ,M.;; Reyna ,R . and Erasmo, O. (2018). Nanoparticles as New Therapeutic Agents against *Candida albicans* .www.intechopen.com.

Chaffin , W.L. (2008) . *Candida albicans* Cell Wall Proteins .
Microbiol Mol Biol Rev.72 (3) : 495-544.

Chan,G.; Sivaranjini,S.;Tengku,I.;Mohamad, S.and Ahmed , z.
(2013).Multiple rare opportunistic and pathogenic fungi in persistent foot
skin infection .Pak.J.Biol.Sci.16(5) ; 208218.

Chinsebu , K.(2016). Plants and other natural products used in the
management of oral infections and improvement of oral health .Acta
Tropica .154 : 6–18 .

Clinical and Laboratory Standards Institute .(2008). Reference
Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast
Approved Standard - Third Edition . CLSI document M27 A3 . Wayne :
Clinical and Laboratory Standards Institute ; Institute,Wayne.

Doligez,C.(2017).Biomerieux reinforces its offering of high medical value
immunoassay biomarkers with the acquisition of astatus medical .

Dent , M.; Dragović , V.; Penić , M.; Brnčić , M.; Bosiljkov ,T. and
Branka , L. (2013). The Effect of Extraction Solvents , Temperature and
Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian
Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) . Food Techno.Biotechnol.51(1):84-91

.
EL-feky , A. and Wael,A. (2016),
Phytochemical and Biochemical Studies of Sage (*Salvia officinalis* L.).
UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences.4(5):56-62.

Elkelany, A. ; Elswaify , Z. and Elsaid , M.(2020) . Phytochemical and
biological studies on some medical plants .Az. J . Pharm .Sci. 62 :110-
134.

- Ellis, D.;** Stephen, D.; Helen, A.; Rosemary, H. & Robyn, B. (2007). Description of medical fungi. 2nd ed. Adelaide, Australia. Pp. 20-40.
- Espitia, P. J. ;** Soares, N. D. ; dos Reis Coimbra, J. S. ; de Andrade, N. J. ; Cr R. S. & Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: synthesis antimicrobial activity and food packaging applications. Food and bioprocess technology, 5 (5), 1447-1464.
- Fanning, S.** and Mitchell, A. (2012). Fungal biofilms. PLoS Pathog. 8(4):e1002585.
- Faraj, M.;** Kamil, M. and Muhsin, H. (2020). Evaluation of Vitik2 System for Clinical Identification of *Candida* species and Their Antifungal Exposure Test. Iraqi Journal of Biotechnology. 19(1): 28-39.
- Fatah, S.** (2018). Synthesis and characterization of zinc oxide nanopowders prepared by precipitation method. Diyala Journal for pure science. 14(3):41-47.
- Forbes, B.A.;** Sohm, D.F. and Weissfeld, A.S. (1998). Diagnostic Microbiology. 10th edn. Mosby Inc.
- Garcia, C. ;** Menti, C. and Lambert, A. (2016) Pharmacological perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): antioxidant, and antitumor in mammalian cells, Anais da Academia Brasileira de Ciências. 88: 281-292.
- Ghareeb, M.;** Mohamed, R.; Hanan, S. and Mohamed, S. (2018). Phytochemical analysis of Eucalyptus camaldulensis leaves extracts and testing its antimicrobial and schistosomicidal activities. Bulletin of the

National Research Centre . 42(16):2-9.

Gherbawy , Y. and Voigt , K.(2010).Molecular identification of fungi . Springer Heidelberg Dordrecht London,New York. Laboratory press,New York.

Ghom ,GA. and Ghom , AS. (2014).Textbook of Oral Medicine, third edition, Jaypee Brothers Medical Publication Limited, New Delhi, India, 156.

Gîrd,C.; nencu, I.; Costea, T.; Duțu , L.; Popescu, M. and Ciupitu ,N. (2014). Quantitative analysis of phenolic compounds from *salvia officinalis* L. leaves . FARMACIA, 62 (4): 649-657 .

Grdiša ,M.; Marija, J.; Matija, L.; Klaudija C.; Tonka, N.; Zlatko ,L.; Ivan ,R. and Zlatko ,S.(2015). Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. Agriculturae Conspectus Scientifi cus . 80 (2): 69-78.

Groppo,F.; Cristiane ,B.; Karina, C.; Michelle ,F.;; Rogério , H. and Eduardo ,A. (2008). Review Article Use Of Phytotherapy In Dentistry . Phytother. Res . 22(8):993-8.

Habeeb ,A.R.& Ali,H.AL.(2015).Isolation and identification of some Candida spp. And study susceptibility against some antifungals. Journal of Babylon University for Applied Pure Sciences ,3(23) 955-963.

- Hadi , U. M.;** Adnan ,M. and Zuhair ,S. R. (2012). A bacteriological study of the isolation and diagnosis of bacteria causing tooth decay and some gum and oral infections. 4(20):1303-1310
- Hall,G.**(2012).Interactions of yeasts ,moulds and antifungal agents.Human press,New York ,USA.
- Harbone,G.B.**(1984).Phytochemical methods, aguid to modern technique of plants analysis .2nd ed. Chapman and Hall.London .New York.
- Hasse,G.**Sonntage,I.Van,de.;Uijthof,A.;Podbielski,A.andMelzer,K.(1995).Phylogenetic analysis of ten black yeast species using nuclear small subunit rRNA gene sequences.Antonie van leeuwenhoek.68:19-33 .
- Haziri,A.;**Faiku,F.;Mehmeti,A.,Kurteshi,K.;Naziri,I. and Ruhani,I.(2018). In Vitro Antibacterial Properties of Ethanol Extract from *Salvia Officinalis* (L.) Plant Growing Wild in Kosovo.Biomedical J.of scientific & Technical Research.2(3):2578-2580.
- Irman ,Z.**and Youser ,F.(2015). Comparison of 25S and 18 S primers for estimating clinical isolates of *Candida* diversity and evaluatete their virulence in eyes infections in Iraq.App.Sci.Repot.9(3):166-171.
- Iwata,K.**andYamanmota,Y.(1983).High molecular weight toxins produced by pathogenic fungi particulary *Candida albicans* and their role in pathogenesis of fungal infection .First international symposium on hemodynamics.Chiba.Japan.
- Iwata, K;** Uchida, K.; Hmajima, K. and Kamamura, A. (1984). Role of candidotoxin in experimental *Candida* infections. J.Med Bio.27:130-133.J. Ann.Inter.Med.8.12-15.

Jabir ,M.;Saleh,Y. and Yaseen ,N .(2017).Detection of active compounds in the crude aqueous extract of *Annona muricata* plant peels and used as an anti-oxidant . *Engineering and Technology Journal* ,35(1):157- 160.

Jagessar,R.(2020). Plant Extracts Based Nanoparticles, a Good Perspective in the Development of Drugs in Nanomedicine. *Modern Approaches in Drug Designing* . 3(2): 1-8.

Jakovljević,M .; Jokić,S.; Molnar,M.; Jašić , M.; Babić,J.; Jukić, H. and Banjari,I.(2019). Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations .*J. plants.*8(55):1-30.

Jasim,R.& Abd Al - khaliq ,I.(2011).Inhibitory Effect of Aqueous *Salvia officinalis*'s leaves in the Growth of *Candida albicans* from Infected Women with Vaginal Candidiasis. *Al - Kindy Col. Med. J.* 7 (1): 47-51.

Jeddy N.; Ranganathan K. Devi U. and Joshua E.(2011). A study of antifungal drug sensitivity of *Candida* isolated from human immunodeficiency virus infected patients in Chennai, South India. *JOMFP.*15(2).182-186.

Jesionek, W.; Barbara , M .; Györgyi , H.;Ágnes ,M. and Irena , M. (2017). Screening of Antibacterial Compounds in *Salvia officinalis* L. Tincture Using Thin-Layer Chromatography–Direct Bioautography and Liquid Chromatography–TandemMass Spectrometry Techniques . *Journal of Planar Chromatography*,30(5):357- 362 .

-kadhim , S.M . ; Mohammed , M.T. and Ahmed , O.M. (2016) . Study of *Salvia officinalis* (Sage) Components and effect of their Aqueous Extracton Antioxidant , *Publishedsearch , Int . Chem . Sci .:* 14 (2): 711- 719.

Karkowska-Kuleta, J.; Rapala-Kozik, M. and Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*. 56(2): 211-224.

Katafa,A. and Hamid,M.(2020).Influence of ZnO nanoparticles on *C. albicans* of human male pleural fluid.Iraqi Journal of Science. 61(3):540-549.

Khot,P.;Daisy,L. and David ,N. (2009).Sequencing and analysis of fungal rRNA operons for development of broad range fungal PCR assays.75(6):1559-1565.

Kidd,S.;Catoriona ,H.Helen,A& David ,E.(2016).Descriptions of medical fungi .3 ed . edition .Pfizer Australia.Pp.34-49.

Klotz, M. ; Monod, D. A. ; Schofield , A. J. P. ; Brown and Gow , N. A. R.(2010). Expression of Seven Members of the Gene Family Encoding Secretory Aspartyl Proteinases in *Candida albicans*, *Molecular Microbiology*, Vol. 14, No. 1,, pp. 87-99.

Koundal,S. and Cojandaraj,L.(2020). *Candida* Species – Morphology, Medical Aspects And Pathogenic Spectrum. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine* . 7(7):4015 -4021 .

Kumar,S.;Glen,s. and Koichiro,T.(2016).Molecular evolutionary genetics analysis Version 7.0 for biggar datasets.Mol.Evolu.Gene.Ana.

33(7):1870-1874.

Kwon Chung, G. and **Bennet, J.** (1992). *Medical mycology*. Williams and Willins Company, Pp.:105-161.

Lemle, K. (2018). *Salvia officinalis* used in pharmaceuticals. International Conference on Applied Sciences. 294: 1-6.

Macfaddin, J. F. (2000). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*, 3rd Ed. Williams and Willkins company. USA, pp. 912.

Mallya, B. and **Shrikara, M.** (2019). *Candida and oral candidosis areview*. J. HEALTH and Allied Science. 9(2):91-102.

Manikandan, C. and **Amsath, A.** (2013). Isolation and Rapid identification of *Candida* species from the Oral cavity. Int. J. Pure App. Biosci. 1 (3) : 23-27.

Marsh, P.; **Martin, M.V.** (2003). *Oral Microbiology*, 4th ed.; Wright Edinburgh: London, UK.. **Shoker, R.** (2021). A review Article, Identification and isolation plants constituents by HPLC. Journal NX-Amultidisciplinary peer Reviewd Journal. 6(12):1-7.

Martins, A.C., Macia, L.F. & Terezinha, I.e. (2011). Prevalence of yeast species in the oral cavity and its relationship to dental caries

.Acta.Scientiarum Health Science .33(1):107-112.

Martins , N.; Lillian , B.; Celestino , S.; Mariana , H. and Sónia Silva , i. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. Food chemistry . 170 :378-385 .

Masoko,P.andDavid ,M. (2015). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of *Olea africana* against pathogenic yeast and nosocomial pathogens . BMC Complementary and Alternative Medicine . 5(409):1-9 .

Maurya, A. ;Kalani , K. ; Chandra , S. ; Singh ,R. and Anupam , S. (2018). Vacuum liquid chromatography :simple , efficient and versatile separation technique for natural products.Opinion .7(2):1-3.

Megwati , A .and Indah,S.(2021). Potential Of Herbal Medicine In Asia For Oral Candidiasis Therapy: A Systematic Review Review Article . Int J App Pharm. 13(4) : 1-6.

Melhim,M.;Bertoletti,A.;;Lucca,H.;;Silva,R.;;Meneghin,F.andZeszes,M.(2014).Use of the vitek2 system to identify and test the antifungal susceptibility of clinically relevant yeast species.Braz.J.Microbiol.;;44(4):1257-1266.

Meurman,J.Slikala,E.;Richardson,M.&Rautemaa,R.(2014).Non*Candida albicans* ,*Candida* yeasts of the oral cavity .Communicating current

research and educational tropics and trends in applied microbiology
A.Mendez-Vilas(Ed).719-731.

Mishra,K.; Chanchal , D.; Anil , K.; Rajnikant ,P.; Saraswati ,P. and Shweta , D.(2020). Medicinal Plants Having Antifungal Properties. [Medicinal Plants Having Antifungal Properties | IntechOpen](#) .

Mohammad,A.;Sallal,A. and Ali,S.(2013).Biochemical study of ethanol extracts of *Salvia officinalis* leaves.Engineering and Technology Journal.31(1):15-23.

Mohammad , A.; Suhall , A.; Noura , Al . and Ziauddin , K.(2017). Population structure and molecular genetic characterization of 5-flucytosine - susceptible and - resistant clinical *Candida dubliniensis* isolates from Kuwait .PLOS ONE.5:1-15.

Mohammad, J.;Mohammad A. A.;Syed, G. A ;,Haris, M, K.;Ahmad, A.and Mohammad, I. S.(2019). Anticandidal activity of biosynthesized silvernanoparticles: effect on growth, cell morphology,and key virulence attributes of *Candida*spp.International Journal of Nanomedicine:14

Mroczek ,T.; Aleksandra , D.; Jarosław , W. and Krzysztof, K.(2020). The Bioassay-Guided Fractionation and Identification of Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from *Narcissus c.v. 'Hawera'* Using Optimized Vacuum Liquid Chromatography, High Resolution Mass Spectrometry and Bioautography . Metabolites . 10(10): 395 .

Muttalib , L. and Naqishbandi ,A. (2012). Antibacterial and Phytochemical Study of Iraqi *Salvia officinalis* Leave Extracts. Iraqi J PharmSci.21(1):93-97.

Nadeem,S.;Amna,S.;;Shazia,T.;;Yasmeen,A. and

Shahana,U.(2013).Effect of growth media ,Ph and temperature on yeast to hyphal transition in *Candida albicans*.OJMM.3:185-192.

Nagarajan ,S. and Kuppusamy ,K. (2013). Extracellular synthesis of zic oxide nanoparticles using seaweeds of gulf of mannar.India J. of Nanobiotechnology .11(1):1-11.

Nejad,B.S.;Allollab,B.&Fereshteh,M.(2011).Prevalence of *Candida* spp. In the oral cavity of patients with prendonitis. Afr.J.Biotechnol.10(15).

Ocsoy , TM. ;Celik, C. ;Altinsoy, B.; Yilmaz ,V. and Duman, F. (2017) .A green approach for formation of silver nanoparticles on magnetic graphene oxide and highly effective antimicrobial activity and reusability . Journal of Molecular Liquids . 227 : 147-152 .

Oladimeji, A. & Valan , M.(2020). HPLC techniques for phytochemistry .International Journal of Chemical Studies .8(6):2590-2596.

Olivira,J.;Gracas,P.;Almeida,r.Oliveira,F.;Carvlho,C.Camargo,S.Jorge,A .andOliveria,L.(2019).Antimicrobial activity of non cytotoxic concentrations of *Salvia officinalis* extract against bacterial and fungal species from the oral cavity. Jeneral Dentistry.434:22-27.

Oluah,A.;Oputa,A.;Ndukwe,G. and Fekarurhobo,G.(2020).Application of Vaccum Liquid Chromotography to the separation of secondary metabolites of *Baphia nitida* Lodd.Stem .J.Chem.Soc.Nigeria,45(2):220-225.

Palmqvist , M. (2017) . Nanoparticles : Case studies of their synthesis properties and biological interaction . Doctoral thesis , Swedish

University Agricultural sciences .

Patel,M.(2022). Oral Cavity and *Candida albicans*: Colonisation to the Development of Infection.Pathogen.11(3):2-17.

Patil ,S.; Roopa ,S. ; Barnali , M. and Sukumaran , A. (2015).Clinical Appearance of Oral *Candida* Infection and Therapeutic Strategies . Frontiers in Microbiology .6:1-10.

Patrick,T.;Nessel,T.and Zito,P.(2022).Antifungal antibiotics.State pearls Publishing.Island .

Pereira ,R.; Fontenelle , R.; De Brito, E. and De Morais, S.(2021). Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. Journal of Applid Microbiology.131(1):11-22.

Phargava,B.(2019).Standard operating procedures for fungal identification and detection of antifungal resistance . 2nd. Edn..icm2.New Delhi,India.

Pinjon , E .; Sullivan , D .; Salkin , I .; Shanley , D. and Coleman , D. (1998) .Simple , inexpensive , reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* , J. Clin Microbiol . 36 : 2093-2095.

Porte , A .; Goody , R.L. and Main - porte , L.H. (2013) Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil) Rev. Bras . PJ . Med . Campinas . 15(3): 438-441

Raal,A.; ANNE , O. and ELMAR , A. (2007).Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from Yarious European countries. Naturel Protlut't Resear'tlt. 21(5): 406 411 .

-Rahman,H.; Hemn , H.; Nahidah, I.; Swee , K.; Kawa

and Noorjahan , B.(2020) . Novel Drug Delivery 20 ,M.; Nozlana , A. Systems for Loading of Natural Plant Extracts and Their Biomedical Applications . International Journal of Nanomedicine . 15 .

Rajagopalan ,P.; Shadma , W.; Ayed A.; Harish ,C. ; Chandramoorthy , S.; Ayyub A.; Shahabe , S. ; Gaffar , S. and Irfan , A.(2020) , Anti - Cancer Activity of Ethanolic Leaf Extract of *Salvia officinalis* against Oral Squamous Carcinoma Cells in vitro via Caspase Mediated Mitochondrial Apoptosis . Pharmacogn . Mag .16 (5): 546-552.

Rajan,A.;Cherian,E. and Baskar,G.(2016). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Aspergillus fumigatus* JCF and its antibacterial activity .INT.J.Modern Sci.Technol.,1(2):52-57.

Raju,S.B.& Shashank,R.(2011).Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity .Int.Scchot.Rese.Notice.20(11):1-7.

Randhawa , M .,Abdulhakim , B.; Mouhanad , Al .; Mohamed ,H. and Oueslati ,J.(2018). Antimicrobial Effects of Methanolic Extract of *Salvia Officinalis* , including RSA and Multidrug Resistant *Acinetobacter Baumannii*.International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research (PPR) . 8(4) :1-5.

Ravindra,S.; Pooja ,S.and,Kshitij,R.(2020). Introduction to Composite Materials: Nanocomposites and their Potential Applications. In book: Composite Materials .Edn. 1 . Chapter ,1 . CRC Press Publisher: pp.1-28.

Rickl,V.(1996). Plant drug analysis (Thin layer chromatography atlas) . 2nd Ed . Springer.197 Pp.

Roby, M.H ; Sarhan, M.A.; Selim, K. and Khalel, I.K. (2013). Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts. Industrial Crops and Products, 43: 827-831 .

Sabir , S .; Arshad , M. & Chaudhari , S. K. (2014) . Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture : synthesis and applications . The Scientific World Journal , .Article ID 925494 , 8 pp.

Salem ,S. ; Eman , N. ; Asem , A. and Wagdi ,E.(2022). A Comprehensive Review of Nanomaterials: Types, Synthesis, Characterization, and Applications . Biointerface Research in Applied Chemistry .13(1) :1-30.

Saliem,B. ;Orooba,I. and Salih,S.(2016). Biosynthesis of Silver Nanoparticles using Cinnamon zeylanicum Plants Bark Extract . Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences. 7(1):51-63.

Sandbrook, J. and Russell, D.(2001).Molecular cloning:Alaboratory manual ,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory press,New York.

Sara,C. ; Ana ,M. ,Martins,E. and Samapio , A.(2012).Susceptibilities of *Candida albicans* Mouth Isolates to Antifungal Agents, Essentials Oils and Mouth Rinses . Mycopathologia .174:69–76.

Schwalbe , R.;Lynn,S. and Avery,C. (2007).Anitimicrobial susceptibility testing protocols.CRC Press,London.U.S.

Seal, T. (2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, *Sonchus arvensis* and *Oenanthe linearis* of North-Eastern region in India. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2), 157-166.

Seelinger, M., Ruxandra, P.; Prapairat, S.; Judith, Singhuber, Benedikt, G. Christine, U., Sabine, B.; Karl, H.; Monika, F., Thomad, S. and Rene, D. (2012). Fractionation of an Extract of *Pluchea odorata* Separates a Property Indicative for the Induction of Cell Plasticity from One That Inhibits a Neoplastic Penotype . *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*: 1-11.

Sharma, A. (2019). Oral candidiasis :An opportunistic infection- A review. *International Journal of Applied Dental Sciences*. 5(1):23-27.

Shoker , R. (2021). A review Article, Identification and isolation plants constituents by HPLC . *Journal NX- A multidisciplinary peer Reviewed Journal* . 6(12):1-7.

Siddiqi, K.; Rahman, A. and Husen, A. (2018). Properties of Zinc Oxide nanoparticles and their activity against microbes. *Nanoscale Research Letters*. 13:1-13.

Silverstein , R.M.; Webster, F.X. and Kiemle, D.J. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. 7th Ed. *Jon Wiley & Sons. INC.* Printed in USA.

Spampinato,C. and **Leonardi,D.**(2013). *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents . BioMed Research International.13.

Staib , P. and **Morschhäuser , J.** (2005) Differential expression of the NRGI repressor controls species - specific regulation of chlamydospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* . Molecul . Microbiol . , 55 (2) : 637 652 .

Suganya,T.; **Senthil,R.;** **Lakshmi,B.** and **Giridev,V.**(2011) Herbal drug incorporated antibacterial nanofibrous mat fabricated by electrospinning: an excellent matrix for wound dressings, J. Appl. Polym. Sci. 121 (5): 2893e-2899e.

Sundaram,M&Navaneethakrish,R.M.(2016). Evaluation of Vitek 2 system for clinical identification of *Candida spp.* And their antifungal susceptibility test . J.Evolution Med.Dent.Sci.5(47):2948-2951.

Tamo,B.(2020). *Candida* Infections: Clinical Features, Diagnosis and Treatment. Infect Dis Clin Microbiol . 2(2): 91-102.

Tarçın , G.(2011). Oral Candidosis : Aetiology , Clinical Manifestations Diagnosis and Management. MUSBED.1(2):140-148.

Taylor , M.; **Brizuela, M.** and **Raja ,A.**(2014). Oral Candidiasis. An Overview . Journal of oral and maxillofacial pathology .18(1):81-85.

Tocci, N.; **Perenzoni, D.;** **Iamónico, DF.;** **Weil ,T.** and **Mattivi, F.**(2018). Extracts from *Hypericum hircinum* subsp. *majus* exert antifungal activity against a panel of sensitive and drug-resistant clinical strains. Front Pharmacol. 9(5):1-10.

Ünver,A.; Arslan, D. Çetýnkaya,Z. and Özcan,M.(2008).Antimycotic activity of methanol extracts of Sage (*Salvia officinalis* L.) ,Laurel (*Laurus nobilis* L.) and Thyme (*Thymbra spicata* L.).JEOP.11(1):90-95.

Veen, M.; Stahl, U. and Lang, C.(2003). Combined overexpression of genes of the ergosterol biosynthetic pathway leads to accumulation of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 4: 87–95.

Veličković,D.;Randjelovic,N.;Ristic,M.;Veličkovic,A.andSmelcerovic,A. (2003). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower , leaf and stem of *Salvia officinalis* L. Pharmaceutical. J S erh Chem Soc . 68 (1): 17-24 .

Verkhovodovoda,Y.V.;Kireyev,L.V.;Koshovyi,O.M. and Osolodchenko ,T.P .(2019) . In vitro antimicrobial study of new modifications of *Salvia officinalis* extracts. Annals of Mechnikov Institute , 1:31-35.

Vidal,M.V.;Cristina,M.A.,Elena,E.&Guillermo,Q.(2011).Variation in biofilm formation among blood oral isolates of *Candida albicans* and *C.dubliniensis*.Enfem.Infecc.Microbiol Clin.29(9):660-665.

Voicu , G .; Oprea , O .; Vasile , B. S. & Andronescu , E. (2013) . Antibacterial Activity Of Zinc Oxide - Gentamicin Hybrid Material . Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures .DJNB.8(3):1191-1203.

Wilczewska , A.Z .; Niemirowicz , K .; Markiewicz , K.H. and Car , H . (2012) Nanoparticles as drug delivery systems . Pharmacological Reports , 64 : 1020-1037.

Williams ,D.&Lewis,m.(2011).Pathogenesis and treatment of oral candidosis ,J.Oral Microbiol.3:57-71.

Williams, D.;Tomoari ,K.; Sonia ,S.; Sladjana, M. and Michael A. (2011). Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontology* . 55: 250–265.

White,T.;Bruns,S.andTaylor,J.(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gene for phylogenetics.in book *PCR Protocols and applications.A laboratory manual.* Publisher- Academic press.

Zafar,A.;Kauser,J.&Joveria,F.(2017). Practical guide and atlas for the diagnosis of fungal infections. United states.

الملحق (1): تقارير تشخيص عزلات المبيضات باستخدام جهاز الفايتهك

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Feb 7, 2021 04:39 CST

Patient Name: 51, 51 Patient ID: 696
 Location: Location: Physician:
 Lab ID: ab596 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
 Selected Organism : *Candida albicans*

Source: Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time: 17.93 hours	Status: Final
Selected Organism	99% Probability Bionumber: 4502546065327371	<i>Candida albicans</i>
ID Analysis Messages		

3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	+	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	(+)	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	(-)
61	IProa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Feb 6, 2021 06:21 CST

Patient Name: 44, 44 Patient ID: 670
 Location: Location: Physician:
 Lab ID: ab570 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
 Selected Organism : *Candida dubliniensis*

Source: Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time: 17.98 hours	Status: Final
Selected Organism	98% Probability Bionumber: 6502544061105371	<i>Candida dubliniensis</i>
ID Analysis Messages		

3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	(+)
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	-
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	-	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	(-)
61	IProa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	(+)						

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Feb 6, 2021 08:49 CST

Patient Name: 54, 54 Patient ID: 676
 Location: Location: Physician:
 Lab ID: ab576 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
 Selected Organism : *Candida lusitaniae*

Source: Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time: 17.93 hours	Status: Final
Selected Organism	93% Probability Bionumber: 4146554655363771	<i>Candida lusitaniae</i>
ID Analysis Messages		

3	LysA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	+	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	+
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	+	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	+
39	IRHAa	+	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARaA	-	52	dGATa	+	53	ESC	+
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	-	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IProa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	(+)	64	dGNTa	+						

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Feb 6, 2021 06:22 CST

Patient Name: 20, 20 Patient ID: 674
 Location: Physician:
 Lab ID: ab574 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
 Selected Organism : *Candida parapsilosis*

Source: Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time:	17.95 hours	Status:	Final
Selected Organism	97% Probability	<i>Candida parapsilosis</i>		
ID Analysis Messages	Bionumber:	6502544245113731		

3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	+
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	-	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	+
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	(-)	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	-	64	dGNTa	+						

bioMérieux Customer: Microbiology Chart Report Printed Feb 6, 2021 08:49 CST

Patient Name: 56, 56 Patient ID: 679
 Location: Physician:
 Lab ID: ab579 Isolate Number: 1

Organism Quantity:
 Selected Organism : *Candida tropicalis*

Source: Collected:

Comments:

Identification Information	Analysis Time:	17.92 hours	Status:	Final
Selected Organism	96% Probability	<i>Candida tropicalis</i>		
ID Analysis Messages	Bionumber:	6102744245327771		

3	LysA	-	4	IMLTa	+	5	LeuA	+	7	ARG	+	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	(+)	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	-	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	+	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	-	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	+
47	dTURa	+	48	dTREa	+	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	+	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	+	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	+
61	IPROa	+	62	2KGa	+	63	NAGa	+	64	dGNTa	+						

bioMérieux Customer : Microbiology Chart Report Printed Feb 6 , 2021 06:21 CST

Patient Name : 55 ,..... Patient ID :671
 Location : Physician :
 Lab ID : ab571 Isolate Number : 1

Organism Quantity :
 Selected Organism : *Candida kefyr*

Source : Collected

Comments:

Identification Information	Analysis Time :	17:98 hours	Status :	Final
Selected Organism	94% Probability	<i>Candida kefyr</i>		
ID Analysis Messages	Bionumber:	4002345061005350		

3	LYsA	-	4	IMLTa	-	5	LeuA	+	7	ARG	-	10	ERYa	-	12	GLYLa	-
13	TyrA	-	14	BNAG	-	15	ARBa	-	18	AMYa	-	19	dGALa	+	20	GENa	-
21	dGLUa	+	23	LACa	+	24	MAdGa	+	26	dCELa	-	27	GGT	-	28	dMALa	+
29	dRAFa	+	30	NAGA1	-	32	dMNEa	+	33	dMELa	-	34	dMLZa	-	38	ISBEa	-
39	IRHAa	-	40	XLTa	+	42	dSORa	+	44	SACa	+	45	URE	-	46	AGLU	-
47	dTURa	-	48	dTREa	-	49	NO3a	-	51	IARa	+	52	dGATa	-	53	ESC	-
54	IGLTa	+	55	dXYLa	-	56	LATa	+	58	ACEa	+	59	CITa	+	60	GRTas	-
61	IPROsa	+	62	2KGa	-	63	NAGa	+	64	dGNTa	-						

الملحق (2) : نتائج الاختبارات الكيميائية الحياتية باستخدام جهاز الفايترك وبطاقة التشخيص YST card

Test	Mnemonic	Amount/well (mg)	Result					
			C.albicans	C.dubliniensis	C.lusitanae	C.tropicalis	C.parapsilosis	C.kefyr
L-Lysine-ARLAMIDASE	LYsA	0.0228	-	-	-	-	-	-
L-MALATE assimilation	IMLTa	0.15	V		V	-	+	-
Leucine-ARYLAMIDASE	LeuA	0.0234	+		+	+	+	+
ARGININE	ARG	0.15	+		+	V	+	-
ERYTHRITOL assimilation	ERYa	0.3	-		-	-	-	-
GLYCEROL assimilation	glylA	0.16	V		V	V	-	+
Tyrosine ARLAMIDASE	TYrA	0.0276	V	V		-	-	-
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	BNAG	0.0408	V		-	-	-	-
ARBUTIN assimilation	ARBa	0.3	-		-	V	+	-
AMYGDALIN assimilation	AMYa	0.3	-		V	-	-	-
D-GALACTOSE assimilation	dGALa	0.3	+		+	V	+	+
GENTOBIOSE assimilation	GENa	0.3	-		V	V	-	-
D-GLUCOSE assimilation	dGLUa	0.3	+		+	+	+	+
LACTOSE assimilation	LACa	0.96	-		-	-	V	+
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOISE assimilation	MAdGa	0.3	+		+	+	+	-
D-CELLOBIOSE assimilation	dCELa	0.3	-		-	V	-	+
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	GGT	0.0228	-		-	-	-	-
D-MALTOSE assimilation	dMALa	0.3	+		+	+	+	+
D-RAFFINOSE assimilation	dRAFa	0.3	-		-	-	-	+
PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase1	NAGA1	0.0306	V		-	V	-	-
D-MANNOSE assimilation	dMNEa	0.3	+		V	+	+	+
D-MELIBIOSE assimilation	dMELa	0.3	-		-	-	-	+
D-MELEZITOSE assimilation	dMZLa	0.3	-		-	+	+	-
L-SORBOSE assimilation	ISBEa	0.3	-		-	+	V	-
L-RHAMNOSE assimilation	IRHAa	0.3	-		-	+	V	-
XYLITOL assimilation	XLTa	0.3	+		+	V	-	+
D-SORBITOL assimilation	dSORa	0.1875	+		V	+	+	+
SACCHAROSE/SUCROSE ssimilation	SACa	0.3	+		+	+	+	+
UREASE	URA	0.15	-		-	-	-	-
ALPHA-GLUCOSIDASE	AGLU	0.036	+		-	+	+	-
D-TURANOSE assimilation	dTURa	0.3	+		V	+	+	-
D-TREHALOSE assimilation	dTREa	0.3	+		V	+	+	-
NITRATE assimilation	NO3a	0.03	-		-	V	-	-
L-ARABINOSE assimilation	IARaA	0.3	-		-	-	-	+
D-GALACTURONATE assimilation	dGATa	0.15	V		V	V	+	V
ESCULIN hydrolysis	ESC	0.225	-		-	V	-	-
L-GLUTAMATE assimilation	IGLTa	0.15	+		+	+	+	+
D-X YLOSE assimilation	dXYLa	0.3	V	-		V	+	+
DL-LACTATE assimilation	LATa	0.15	V		+	+	V	V
ACETATE assimilation	ACEa	0.15	+		+	-	+	+
CITRATE (SODIUM) assimilation	CITa	0.15	+		+	+	+	+
GLUCURONATE assimilation	GRTas	0.15	V		V	+	+	+
L-PROLINE assimilation	IPROa	0.15		+		+	+	+
2- KETO-D-GLUCONATE assimilation	2KGa	0.15	+		V	+	+	+
N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	NAGa	0.15	V		-	V	+	V
D-GLUCONATE assimilation	dGNTa	0.15	V		V	+	+	+

+ :نتيجة موجبة , - :نتيجة سالبة , v :نتيجة متغيرة variable .

الملحق (3) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *C.albicans* في المركز الدولي لمعلومات التقانات
الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#) ▼

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank ▼ Send to: ▼

Candida albicans strain Maysaa.T.Al.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ574137.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) (▼)

LOCUS MZ574137 1284 bp DNA linear PLN 24-JUL-2021
DEFINITION Candida albicans strain Maysaa.T.Al.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ574137
VERSION MZ574137.1
KEYWORDS .
SOURCE Candida albicans
ORGANISM [Candida albicans](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; Candida.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1284)
AUTHORS Alkhozali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Candida albicans isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1284)
AUTHORS Alkhozali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUL-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1284
/organism="Candida albicans"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.Al.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:5476"
/country="Iraq: Kerbala"
rRNA
<1..1284
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 ggggttctgt ctagtatagc atttatacag tgaactcgc aatggctcat taaatcagtt
61 atcgtttatt tgatagtacc ttactacttg gataaccgtg gtaattctag agctaataca
121 tgcttaaaat cccgactgtt tggaaaggat gtatttatta gataaaaaat caatgccttc
181 gggctctttg atgattcata ataacttttc gaatcgcgat gccttctgct ggcgatgggt
241 cattcaaat tctgccctat caactttcga tggtagata gtggcctacc atggtttcaa
301 cgggtaacgg ggaataaggg ttcgattccg gagaggagc ctgagaacg gctaccacat
361 ccaaggaagg cagcaggcgc gcaaattacc caatcccac acggggaggt agtgacaata
421 aataacgata caggccctt ttgggtcttg taattggaat gactacaatg taaatacctt
481 aacgaggaac aattggaggg caagtctggt gccagcagcc gcggaattc cagctcaaa
541 agcgtatatt aaagttggt cagttaaaa gctcgtagtt gaacctggg cttggctggc
601 cggtcacct ttttgatcgc tactggacc agccgacct ttccttctg gtagccattt
661 atggcgaacc aggaacttta cttgaaaaa attagagtg tcaaacgagg cctttgctg
721 aatataatag catggaataa tagaatagga cgttatggtt ctattttgtt ggtttctagg
781 accatcgtaa tgaataatag gacggctcgg gggatcagtt attcagttg cagaggtgaa
841 attcttggat ttactgaaga ctaactactg cgaagcatt taccaaggac gttttcatta
901 atcaagaacg aaagttaggg gatcgaagat gatcagatag cgtcgtagt ttaaccataa
961 actatgccga ctaggatcg gttgtgttc ttttattgac gcaatcggca cttacaaga
1021 aactcaagtc tttgggttct ggggggaata tggctcgaag ggtgaaaatt taaaggaatt
1081 gacggaaggg cccccgggg agggggccc ggggttaatt tgatccaac ggggaaaaat
1141 cccggggccc aaccataag ggttgggtga atggaaacct tcttctgtg ttgggggggg
1201 gggggggggg cctccttctt ttgggggggg gaatgtttgt gttttttgt gtaaaagaaa
1261 aaaaccttcc cccccaaaa aaag
//

الملحق (4) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *C.dubliniensis* في المركز الدولي لمعلومات
التقانات الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#) ▼

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank ▼ Send to

Candida dubliniensis strain Maysaa.T.AI.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ574410.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS MZ574410 1240 bp DNA linear PLN 24-JUL-2021
DEFINITION Candida dubliniensis strain Maysaa.T.AI.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ574410
VERSION MZ574410.1
KEYWORDS .
SOURCE Candida dubliniensis
ORGANISM [Candida dubliniensis](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; Candida.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1240)
AUTHORS Alkhazali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Candida dubliniensis isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1240)
AUTHORS Alkhazali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUL-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1240
/organism="Candida dubliniensis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.AI.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:42374"
/country="Iraq: Kerbala"
rRNA
<1..>1240
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gcgtcgggct gtctagtata gcatttatac agtgaactc cgaatggctc attaaatcag
61 ttatcgttta ttgatagta cttactactc tggataaccg tggtaattct agagctaata
121 catgcctaaa atcccgaactg tttggaaggg atgtatttat tagataaaaa atcaatgcct
181 tcggctctct tgatgattca taataacttt tcgaatcgca tggccttctg ctggcgaatg
241 ttcaattcaaa tttctgccct atcaactttc gatggttaga tagtggccta ccatggtttc
301 aacgggtaac ggggaataag ggttcgattc cggagaggga gcctgagaaa cggctaccac
361 atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatc cccaatccc acacggggag gtagtgacaa
421 taataacga tacagggccc ttttgggtct tgaattgga atgagtacaa tgaataatcc
481 ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcgtaat tccagctcca
541 aaacgctata ttaaagttgt tgcaagttaa aagctcgtag ttgaacctg ggcttggctg
601 gccggctcat cttttgatg cgtactggac ccagccgagc ctttctctct ggctagccat
661 ttatggcgaa ccaggacttt tactttgaaa aaattagagt gttcaaaaca ggcctttgct
721 cgaatatatt agcatggaat aatagaatag gacgttatgg ttctattttg ttggtttcta
781 ggaccatcgt aatgattaat agggacggtc gggggatca gtattcagtt gtcagagggtg
841 aaattcctgg atttactgaa gactaactac tgcgaaagca tttaccaagg acgtttcat
901 taatcaagaa cgaaagttag gggatcgaag atgatcgat accgtcgtag tcttaacct
961 aaactatgcc gactagggat cggttgtgt tctttattg acgcaatcgg caccttacga
1021 gaaatcaaa gctttgggtt ctggggggag tatggctgca aggcgtaaac ttaaaggaat
1081 tgacggaagg gcaccaccag gaattggaac tggcggctta atttgactca acacggggaa
1141 actcaccagg tcccgaacca ataaggattg aagaattgag aactcttctc tgatttttgg
1201 gggggggggg gcatgggctc tctttatttg gggggaagga
//

الملحق (5) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *C.lusitaniae* في المركز الدولي لمعلومات التقانات
الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#) ↓

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide | Advanced

GenBank ↓ Send to: ↓

Clavispora lusitaniae strain Maysaa.T.AL.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ376949.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☺

LOCUS MZ376949 1238 bp DNA linear PLN 16-JUL-2021
DEFINITION Clavispora lusitaniae strain Maysaa.T.AL.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ376949
VERSION MZ376949.1
KEYWORDS .
SOURCE Clavispora lusitaniae
ORGANISM [Clavispora lusitaniae](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Metschnikowiaceae; Clavispora.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1238)
AUTHORS Alkhezali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Clavispora lusitaniae isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1238)
AUTHORS Alkhezali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-JUN-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1238
/organism="Clavispora lusitaniae"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.AL.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:36911"
/country="Iraq: Kerbala"
rRNA <1..>1238
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gtgacgctgt ctagtataag cattatacag tgaactgcg aatggctcat taaatcagtt
61 atcgtttatt tgatagtacc ttgctaattg gcatacgcct ggcaattcta gagctaatac
121 atgctgctcaa gcccgacctc tggaaaggct gtatttatta gataaaaaat caacatccgt
181 gatgattcat aataacttgt cgaatcgagc gccctcgagc cggcgtatgt tcattcaaat
241 ttctgcccta tcaactttcg atggtaggat agaggcctac catggtttca acgggtaacg
301 gggaaattagg gttcggttcc ggaaggaggc cctgagaaac ggctaccaca tccaaggaag
361 gcagcaggcg cgcaaatc ccaatcccga cacggggagg tagtgacaat aaataacgat
421 gcaggccctc ttccggctct gtaattgaa tgagtacaat gtaataact taacaggaa
481 caattggagg gcaagtctgg tgccagcagc cgcgtaatt ccagctccaa gagcgtatat
541 taaagtgtt gcagttaaaa agctcgtagt tgaaccttgg aggcgccgtg ccgggtccgt
601 tagcgagca ctggaggcgg cgccctttc ctccctctc tagcaataag aggggactg
661 ttactttgag taaatgagag ttttcaaagc aggcgcagc ttgaatctgt tagcatggaa
721 taatagaata ggacgatgg ttctattttg ttggtttcta ggaccatcgt aatgattaat
781 agggacggtc gggggcatca gtattcagtt gtcagagggt aaattcttgg atttactgaa
841 gactaactac tgcgaagca ttgccaagg acgttttcat taatcaagaa cgaagtttag
901 gggatcgaag atgatcagat accgtcgtag tcttaaccat aaactatgcc gactagggat
961 cggcggcgt tcatttagt acgcgctcgg caccttacga gaaatcaaaag tctttgggtt
1021 ctgggggggg agaattggcc caagggtgaa accttaagga attgacggaa gggccacc
1081 ggagtggggg cccgggggtt tatttgaatc aacacgggga aaatctccc gggccgaacc
1141 cataagggtt ggcgaatgg agcccttctt gattgttggg gggggggggg gcccggcgc
1201 gcttctttgt gggggggggg aaatgttttc cccttata
//

الملحق (6) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *C.tropicalis* في المركز الدولي لمعلومات التقانات الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank

Candida tropicalis strain Maysaa.T.AI.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ376951.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MZ376951 1266 bp DNA linear PLN 16-JUL-2021
DEFINITION Candida tropicalis strain Maysaa.T.AI.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ376951
VERSION MZ376951.1
KEYWORDS .
SOURCE Candida tropicalis
ORGANISM [Candida tropicalis](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; Candida.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1266)
AUTHORS Alkhazali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Candida tropicalis isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1266)
AUTHORS Alkhazali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (11-JUN-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1266
/organism="Candida tropicalis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.AI.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:5482"
/country="Iraq: Kerbala"
[rRNA](#) <1..1266
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 ggggtcatga atgtctagta tagcatttat actgtgaaac tgcgaggggc tcattaaatc
61 atttatcgtt tatttgatag taccttacta ctggataac cgggtaatt ctaaagctaa
121 tacatgctta aatcccgcac tgtttggaag ggatgtatt attatataaa aatcaatgt
181 cttcggactc tttgatgatt cataataact ttccaatcg cacggccttg tgctggcgat
241 ggttcattca aatttctgcc ctatcaactt tccgatgtag gatagtgccc taccatggtt
301 tcaacgggta acggggaata agggttcgat tccggagagg gagcctgaaa aacggctacc
361 acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat taccatcacc cgacacgggg aggtagtgc
421 aataaataac gatcacgggc cctttcgggt ctgttaattg gaatgagtac aatgtaata
481 ccttaacgag gaacaattgg agggcaagtc tgggtccagc agcccggtta attccagctc
541 caaaagcgta tataaaagt gttgcagtta aaaagctcgt agttgaacct tgggcttgg
601 tggcgggtcc atctttctga tgcgtactgg acccaaccga gcctttcctt ctggtaacc
661 ttttggcgaa ccaggacttt tactttgaaa aaattacagt gttcaaaaga ggcctttgct
721 cgaatatatt agcatggaag aatagaatag gacgttatgg ttctattttg ttggtttcta
781 ggaccatcgt aatgattaat agggacggtc gggggtatca gttatcagtt gtcagaggtg
841 aatttctgg atttactgaa gactaacctc tgcgaaagca tttaaccagg acgttttcat
901 taatcaagaa caaaagttaa gggatcgaag atgatcacat accgtctgac tcttaaccat
961 aaactatgcc gactatggga tcggttgctg ttcttttatt gacacatcca gcatcttcg
1021 ataaatacaag atctttgggt cctgggggga gtagatcgc aatgctgaa gtcacaaggaa
1081 ttgactgagg cgaccaccta ggatggcagc ctggcgctaa gtcgactcga tcacagcga
1141 actcacgcat gtcagatccc aatcagattg acgaatggga gcgcctgtct gaattgggct
1201 ggggggggcca gggcctctac tgtgtgggac gaattgtcgg gctcactttg cgccatccaa
1261 ccagac

//

الملحق (7) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *C.parapsilosis* في المركز الدولي لمعلومات
التقانات الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank

Candida parapsilosis strain Maysaa.T.A1.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ572966.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS MZ572966 1253 bp DNA linear PLN 23-JUL-2021
DEFINITION Candida parapsilosis strain Maysaa.T.A1.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ572966
VERSION MZ572966.1
KEYWORDS .
SOURCE Candida parapsilosis
ORGANISM [Candida parapsilosis](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Debaryomycetaceae; Candida/Lodderomyces clade; Candida.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1253)
AUTHORS Alkhozali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Candida parapsilosis isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1253)
AUTHORS Alkhozali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-JUL-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..1253
/organism="Candida parapsilosis"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.A1.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:5480"
/country="Iraq: Kerbala"
rRNA
<1..>1253
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gttggctgct tgtctatgta tagcattata cagtgaact gcgaatggct cattaatca
61 gttatcgctt atttgatagt acctactac ttggataacc gtgtaattc tagagcta
121 acatgcttaa aatccgact gtttgaagg gatgtattha ttagataaaa aatcaatgcc
181 ttcggctctc ttgatgattc ataataactt ttcgaatcgc atggccttgt gctggcgtg
241 gttcattcaa atttctgccc tatcaacttt cgatggtagg atagtgccct accatggtt
301 caaccggtaa cggggaataa ggggttcgatt ccggagaggg agcctgagaa accgctacca
361 catccaagga aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatccc gacacgggga ggtagtaca
421 ataaataacg atacagggcc ctttcgggtc ttgtaattgg aatgagtaca atgtaatac
481 cttaacgagg aacaattgga gggcaagtct ggtgccagca gcccggttaa tccagctcc
541 aaaagcgtat attaaagttg ttgcagttaa aaagctcgtg gttgaacctt gggcttggct
601 ggccggtcca tcttttttga tgcgtactgg acccagccga gcctttcctt ctggctagcc
661 tttttggcga accaggactt ttaacttgaa aaaattagag tgtcaaaagc aggcctttgc
721 tcgaatatat tagcatggaa taatagaata ggacgttatg gttctattht gttggtttct
781 aggaccatcg taatgattaa tagggacggt cgggggtatc agtattcagt agtcagaggt
841 gaaattcttg gatttactga agactaacta ctgcgaaagc atttacaag gacgtttca
901 ttaatacaaga acgaaagtta ggggatcgaa gatgatcaga taccgtcgtg gctttaacca
961 taaactatgc cgactagggg tcggttgggt tctttttatt gacgcaatcg gcaccttacg
1021 agaaatcaaa gtcctttgggt tctggggggg aatatggtcg caaggctgaa acctaaagga
1081 attgacggaa gggcaccctc cgggaatgga acctcgggtg taattgact caacacgggg
1141 aaaatcaccg gggcccaaac caataaggat tgacaaatga gaactcttct ttgtttttgt
1201 gggggggggg ggggagggcc ctcttttttg gggggggggg aattggttgg gct
//

الملحق (8) : إثبات تسجيل عزلة الفطر *K.marxianus* في المركز الدولي لمعلومات
التقانات الاحيائية ضمن بيانات الGenBank

An official website of the United States government [Here's how you know](#) ✓

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank

Kluyveromyces marxianus strain Maysaa.T.AL.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MZ574180.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS MZ574180 1237 bp DNA linear PLN 24-JUL-2021
DEFINITION Kluyveromyces marxianus strain Maysaa.T.AL.1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MZ574180
VERSION MZ574180.1
KEYWORDS .
SOURCE Kluyveromyces marxianus
ORGANISM [Kluyveromyces marxianus](#)
Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Kluyveromyces.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1237)
AUTHORS Alkhezali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE molecular features of Kluyveromyces marxianus isolated from oral candidiasis in Iraq
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1237)
AUTHORS Alkhezali,M.T., Lahuf,A.A. and Hassan,B.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (19-JUL-2021) biology department, science college-university of kerbala, city center, kerbala, kerbala kk13DR, Iraq
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..1237
/organism="Kluyveromyces marxianus"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="Maysaa.T.AL.1"
/host="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:4911"
/country="Iraq: Kerbala"
[rRNA](#)
<1..>1237
/product="small subunit ribosomal RNA"
ORIGIN
1 gggagggttaa tgtctagtat agcatttata cagtgaact gcgaatggct cattaatca
61 gttatcgttt atttgatagt tcctttacta catggatata tgtgtaatt cttagagctaa
121 tacatgccta aaactcgcac ctttgggaag agatgtattt attagataaa aaatcaatgt
181 cttcggactc cttgatgatt cataataact ttctgaatcg catggccttg tctggcgat
241 ggttcattca aattctgcc ctatcaactt tcgatgtag gatagtgcc taccatggtt
301 tcaacgggta acggggaata agggttcgat tccggagagg gagcctgaga aacggctacc
361 acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaaat tacccaatc taattcaggg aggtagtgc
421 aataaataac gatacagggc ccattcgggt cttgtaattg gaatgagtac aatgtaata
481 ccttaacgag gaacaactgg agggcaatc tgggtccagc agcccggtta attccagctc
541 cagtagcgta tattaagttt gttgcagttt aaaagctcgt agttgaactt tgggtctggt
601 tggccggctc gattttatgt cgcgactgg ttttcaaccg gatctttcct tctggctaac
661 ctgtactcct tgtgggtgca ggcgaaccag gacttttact ttgaaaaaat tagagtgtt
721 aaagcaggcg aaagctcgaa tatattagca tggataatg gaataggacg tttggttcta
781 tttgtttggt ttctaggacc atcgtaatga ttaataggga cggtcggggg catcagtatt
841 caattgtcag aggtgaaatt cttggattt tgaagacta actactcgga aagcatttgc
901 caaggagctt ttcattaatc aagaacgaaa gttaggggat cgaagatgat cagataccgt
961 cgtagctcta accataaact atgccgacta gggatcgggg tgggtttttt cttatgacct
1021 actcggcacc ttacagaaaa tcaaatcttt tgggttctgg gggggaatat ggtcgaagg
1081 gtgaactta aaggaattga cggaaaggcc caccgggat ggaagccgcg ggttaatttt
1141 gatccacacg gggaaaatcc cccggccca acccaaaaag gatggaaga ttggaagcct
1201 tttgtttttt gttggggggg gggggggcggg gcccccc
//

الملحق (9) : نتائج فحص الحساسية لعزلات المبيضات الحساسة للامفوتيريسين

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed Mar 7, 2021 11:01 CST		
Patient Name: 15,				Patient ID: 802		
Location:				Physician:		
Lab ID: ab702				Isolate Number: 1		
Organism Quantity:						
Selected Organism : Candida tropicalis						
Source:				Collected:		
Comments:						
Susceptibility Information		Analysis Time: 12.17 hours		Status: Final		
Antimicrobial		MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Fluconazole		<= 0.5	S	Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole		<= 0.12	S	Amphotericin B	<= 0.25	S
Caspofungin		<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S
+= Deduced drug *= AES modified **= User modified						
AES Findings						
Confidence:		Analysis not performed				

bioMérieux Customer:		Microbiology Chart Report		Printed Mar 7, 2021 10:51 CST		
Patient Name: 20,				Patient ID: 787		
Location:				Physician:		
Lab ID: ab687				Isolate Number: 1		
Organism Quantity:						
Selected Organism : Candida parapsilosis						
Source:				Collected:		
Comments:						
Susceptibility Information		Analysis Time: 16.80 hours		Status: Final		
Antimicrobial		MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Fluconazole		1	S	Micafungin	0.5	S
Voriconazole		<= 0.12	S	Amphotericin B	1	S
Caspofungin		0.5	S	Flucytosine	<= 1	S
+= Deduced drug *= AES modified **= User modified						
AES Findings						
Confidence:		Analysis not performed				

bioMérieux Customer :		Microbiology Chart Report		Printed Mar 9 , 2021 0707:22 CST		
Patient Name : 55 ,.....				Patient ID : 808		
Location :				Physician :		
Lab ID : ab708				Isolate Number : 1		
Organism Quantity :						
Selected Organism : Candida kefyr						
Source :				Collected		
Comments:						
Susceptibility Information		Analysis Time : 18:95 hours		Status : Final		
Antimicrobial		MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Fluconazole				Micafungin		
Voriconazole		< = 0.12	S	Amphotericin B	0.5	S
Caspofungin				Flucytosine		
+= Deduced drug *= AES modified **= User modified						
AES Findings						
Confidence :		Analysis not performed				

الملحق (10): نتائج فحص الحساسية لعزلات المبيضات المقاومة للامفوتيريبيين

bioMérieux Customer :	Microbiology Chart Report	Printed Mar 7, 2021 10:59 CST			
Patient Name : 4 ,.....		Patient ID : 800			
Location :		Physician :			
Lab ID : ab700		Isolate Number : 1			
Organism Quantity :					
Selected Organism : Candida lusitaniae					
Source :		Collected			
Comments:					
Susceptibility Information		Analysis Time : 18:95 hours			
		Status : Final			
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Fluconazole			Micafungin		
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	>8	R
Caspofungin			Flucytosine	<=1	S
+ = Deduced drug * = AES modified ** = User modified					
AES Findings					
Confidence :	Analysis not performed				

bioMérieux Customer:	Microbiology Chart Report	Printed Mar 7, 2021 10:49 CST			
Patient Name: 45,		Patient ID: 780			
Location:		Physician:			
Lab ID: ab680		Isolate Number: 1			
Organism Quantity:					
Selected Organism : Candida albicans					
Source:		Collected:			
Comments:					
Susceptibility Information		Analysis Time: 13.80 hours			
		Status: Final			
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
Fluconazole	<= 0.5	S	Micafungin	<= 0.06	S
Voriconazole	<= 0.12	S	Amphotericin B	4	R
Caspofungin	<= 0.12	S	Flucytosine	<= 1	S
+ = Deduced drug * = AES modified ** = User modified					
AES Findings					
Confidence:	Analysis not performed				

Summary

The current study included isolating and identifying the *Candida* species that cause oral candidiasis, preparing a nano plant extract using sage leaves, separating and purifying the active ingredients in the leaves of the plant, and testing their inhibitory effects against the isolated *Candida* species. The results showed the following :

From 22/1/2021 to 5/2/2021, 83 samples were collected from children who were clinically diagnosed with oral candidiasis, and the results of isolation and diagnosis revealed the presence of growth in 63 samples (76%), of which 58 samples (92%), and it turned out that the majority of them belong to the genus *Candida*, with a percentage of 93.1% (54 samples), while other non-candida yeasts recorded a percentage of 6.9% (4 samples), and the *Candida albicans* Predominance Isolated with a rate of 53.7%, Followed by *C.dubliniesis* With a rate of 18.5%, then *C.lusitaniae* with a rate of 12.9%, followed by *C.tropicalis* with a rate of 7.4%, *C.parapsilosis* with a rate of 5.6% and *C.kefyr* with a rate of 1.9%. The Diagnosis of the species was confirmed using Vitek device with the Vitek 2 YST.

The isolated species were also molecularly characterized using polymerase chain reaction in the presence of the primers NS1 and NS8, which succeeded in doubling the SrRNA 18 region, with a duplication product whose sizes ranged between bp 1624 and 1656 and were deposited in the National Center for Biotechnology Information's Genbank database, and each isolate was assigned a sequence code: MZ574137.1, MZ574410.1, MZ376949.1, MZ376951.1, MZ572966.1, MZ574180.1 .

The sensitivity of the isolated species towards six types of antifungals, namely Fluconazole, Flucytosine, Caspufungin, Amphotericin B, Miconazole, and Voriconazole, was examined by the Vitec device, and the minimum inhibitory concentration value for each type was determined. Two isolates from *C.albicans* and one from *C.lusitaniae* showed resistance to amphotericin, while one isolate from *C.dublinskiensis* showed resistance to flucytocin.

A crude aqueous and alcoholic extract of the leaves of the sagebrush plant was prepared for the purpose of identifying the antagonistic activity against the isolated species. It was found that both contain saponins,

tannins, carbohydrates, glycosides, resins, and flavonoids, while the alcoholic extract contains more alkaloids and phenols than the aqueous extract. The study proved that the alcoholic extract in all tested concentrations of 10, 25, 50, 75, and 100 mg/ml showed efficacy in inhibiting all isolates sensitive to and resistant to amphotericin, compared to the aqueous extract, which showed efficacy against all species at a concentration of 100 mg/ml. When comparing the effect of the alcoholic extract with the effect of the antifungal amphotericin at the same concentration, it was found that the effectiveness of the crude extract was less than that of the antifungal amphotericin, and that the sensitive species *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* and *C. kefyr* are the most affected by the extract and the antifungal. The study also showed that the lowest inhibitory concentration (MIC) of the alcoholic extract against the sensitive species in the above was 12.5 µg/ml for each, while the minimum lethal concentration value was 25 µg/ml, and for amphotericin-resistant species, the value of the minimum inhibitory concentration was 200 and 50 µg/ml for each. of *C. albicans* and *C. lusitaniae*, respectively, while the lethal concentration values were 400 µg/ml and 100 µg/ml, respectively, for the aforementioned species.

The alcoholic extract was subjected to a fractionation process using the rarefied liquid chromatography (VLC) technique, and it was found that there were the largest number of compounds in the chloroform part: ethyl acetate, and this part showed high effectiveness in inhibiting sensitive and amphotericin-resistant species compared to the rest of the parts, as the rates of inhibition diameters reached sensitive species 14, 16, 19, 21, 20, and 21 mm for *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, and *C. kefyr*, respectively, and 14, 19 mm for *C. albicans* *C. lusitaniae*, which are resistant to amphotericin.

18 active compounds were isolated and purified using preparative high-performance liquid chromatography (Prep.HPLC) at a wavelength of 273 nm, and using analytical high-performance liquid chromatography, three active compounds were diagnosed: caffeic acid, ferulic acid, and kaempferol, and all these compounds showed inhibitory activity against *Candida* species. sensitive to amphotericin.

Also, during the study, a hybrid nano-extract of alcoholic extract of sagebrush was prepared after loading it on zinc oxide. This was confirmed by the results of the infrared spectroscopy (FTIR) examination, which showed a shift in the frequencies of some chemical groups towards

high and low frequencies, as revealed by X-ray spectroscopy (XRD). The emergence of new levels in the spectrum of the hybrid nanocomposite compared to the spectrum of the carrier zinc oxide, which indicates that the compound under study is nano. It was clear from the results of the examination by atomic force microscope (AFM) that the average dimensions of the diameters of the particles of the hybrid nanocomposite amounted to 62.32 nanometers. As for the examination using a scanning electron microscope (SEM) SEM) revealed the appearance of regular geometric shapes and the formation of structures with high porosity.

The results of the analysis by EDS spectroscopy showed the presence of zinc, oxygen and carbon elements, which indicates the success of inserting the plant extract compounds between the layers of zinc oxide and then forming a new hybrid nanocomposite. This hybrid nanocomposite showed higher inhibitory activity than the crude extract and close to the effectiveness of the antibiotic amphotericin, and the sensitive species were more sensitive to the nanoextract, as the average diameters of inhibition by etching method were 18.33, 21.67, 21, 20, 22, 16 mm and the lowest inhibitory concentration. The sensitive species had about 6.25, 6.25, 3.125, 3.125, 3.125, and 6.25 $\mu\text{g/ml}$ each, respectively, while the LCC values were 12.5, 12.5, 6.25, 6.25, 6.25. 12.5 $\mu\text{g/ml}$ compared to the resistant species.



University of Kerbala

Study of the inhibitory activity of leave extract of *Salvia officinalis* L. and its nanoparticle against Candidiasis of children in Kerbala city

A Thesis

submitted to The Council of the College of Education for Pure Sciences - University of Kerbala, as a partial fulfilment of the requirement for the degree of doctor philosophy in .Biology -Fungi

written by

Maysaa Taqi Abdul-Hassan Al-Khazali

Supervised by

Dr. Ban Musa Hassan

Dr. Salam Ahmed Abed Ibrahim

2022

1444