Preparation of Nanohybrid antifungal from Clotrimazole and determination its inhibitory efficiency against some *Candida* spp. Isolates

تحضير مضاد فطري نانوي هجين من المضاد كلوتريمازول وتحديد كفائته التثبيطية ضد بعض عزلات خميرة *Candida* spp.

زهراء شاكر محمود علي عبد الكاظم الغانمي
جامعة كربلاء / كلية العلوم /قسم علوم الحياة

بحث مستل

الخلاصة :

تم تحضير مركب نانوي هجين Mg/Al-Clo-LDH باستخدام طريقة Sol-Gel للتبادل الايوني بين المضاد الفطري Clotrimazole (Clo) و الهيدروكسيد ثنائي الطبقة Bilayers hydroxide (Mg/Al-LDH) . تم تشخيص المضاد الفطري النانوي الجديد ، اذ كشفت مطيافية الاشعة تحت الحمراء عن ظهور مجاميع جديدة في طيف المضاد Mg/Al-Clo-LDH مما يشير الى تكون مضاد فطري جديد كما اوضحت تقنية حيود الاشعة السينية (X-Ray Diffraction, XRD) ظهور مستويات حيود جديدة في طيف المضاد Mg/Al-Clo-LDH مقارنة بطيف حيود الهيدروكسيد ثنائي الطبقة. واثبت فحص المجهر الالكتروني الماسح (Scanning Electron Microscope ,SEM) عن ظهور تغيرات في سطح المضاد النانوي كما اثبتت صورتي مجهر القوة الذري (Atomic Force Microscope ,AFM) الثنائية والثلاثية الابعاد ، الحصول على مركب ضمن الابعاد والمقاسات النانوية .

درست الفعالية المضادة للإحياء المجهرية للمضاد النانوي قيد الدراسة ضد 16 عزلة من خميرة *Candida* واوضحت النتائج ان اعلى فعالية تثبيطية كانت ضد العزلة 23 *Candida tropicalis* بمعدل تثبيط مقداره 20.63 ملم.

الكلمات المفتاحية : المضاد النانوي الهجين ،كلوتريمازول ، هيدروكسيد ثنائي الطبقة ، الفعاليات البايولوجية.

Abstract:

A nanohybrid antifungal Mg/Al-Clo-LDH was prepared using sol-gel ion exchange method between the antifungal Clotrimazole (Clo) and Bilayers hydroxide (Mg/Al-LDH). The new nanoantifungal was identified. FT-IR spectroscopy revealed the appearance of new groups in the Mg/Al-Clo-LDH spectrum which indicates the formation of new compound. The X-Ray Diffraction (XRD) spectrum revealed the appearance of new diffraction planes in the nanohybrid antifungal spectrum in compare with the spectrum of Bilayers hydroxide. Scanning Electron Microscope (SEM) showed the presence of some changes in the Mg/Al-Clo-LDH surface. The two and three dimensional image of the above compound in atomic force microscope confirmed the formation of new antifungal with nanodimensions. The antimicrobial activity of the nanohybrid antifungal was studied against 16 isolates of *Candida* spp. . Results showed that highest inhibition was obtained against isolate *Candida albicans* 23 with avarege inhibition zone of 20.63mm .

Key words: Nanohybrid, Bilayers hydroxide, Clotrimazole, Biological activities.

المقدمة:

يعد جنس الـ *Candida* من الخمائر الشبيهة بالفطريات (yeast like fungi) وتمثل جزءًا من الفلورا الطبيعية المتواجدة في الفم والجلد والقناة المعوية والمهبل و بامكانها أن تسبب العديد من الإصابات للإنسان [1] .

وتميزت خميرة *C. albicans* بكونها أكثر أنواع جنس الـ *Candida* شهرة بسبب قابليتها على إحداث الإصابة بداء المبيضات (Candidiasis) في الإنسان.

إن تزايد معدلات الإصابة بخميرة *C. albicans* في السنوات الأخيرة فضلاً عن زيادة مقاومتها لبعض المضادات الفطرية التقليدية يحتم القيام بدراسات عاجلة للحد من هذا النوع من الفطريات الإنتهازية [2,3] .

تتوفر حاليا ثلاثة أصناف من مضادات الفطريات المتميزة بفعاليتها التثبيطية ضد خميرة *Candida* spp. تشتمل تلك المضادات على مجاميع Polyenes و Azoles و Echinocandins [4] . و تميز الـ Clotrimazole من بين المضادات

الفطرية العائدة لمجموعة الـ Azole بكونه مضاد فطري واسع الطيف ذو كفاءة عالية في تثبيط الفطريات الجلدية و الفطريات ثنائية الشكل و الخمائر و البكتريا [5] . ويتصف هذا المضاد بكونه مسحوقاً بلوريا عديم الرائحة ذو لون أصفر باهت (pale yellow) يمتلك الصيغة الجزيئية $C_{22}H_{17}ClN_2$ و يبلغ وزنه الجزيئي 344.8 غم/مول .وهو يذوب في كل من الكحول و Polyethylene glycol 400 إلا أنه جزيئة كارهة للماء لذلك يكون ذوبانه جزئياً في الماء [6,7] .

دخلت التقنية النانوية في السنوات الأخيرة بشكل واسع في المجالين الطبي و الصيدلاني و يعتقد أنها ستلعب في المستقبل القريب دوراً حاسماً في تشخيص الأمراض و علاجها فضلاً عن الوقاية منها [8] ، و قد نالت المضادات الفطرية نصيبها من تطبيقات هذه التقنية عبر تحضير مضادات نانوية ذات فعالية تثبيطية عالية .

و بالنظر الى الأهمية العلاجية للكلوتريمازول تهدف هذه الدراسة الى تحضير مضاد فطري نانوي هجين بإستخدام الكلوتريمازول .

المواد وطرائق العمل :

تحضير المضاد الفطري النانوي الهجين من طبقات المغنيسيوم / الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد ($Mg/Al-NO_3$ LDH) مع المضاد الفطري بطريقة Sol-Gel للتبادل الأيوني :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل [9] مع بعض التحوير في تحضير المضاد الفطري النانوي الهجين وذلك بإضافة 50 مل من المضاد الفطري (الكلوتريمازول) قطرة فقطرة الى محلول الطبقات الثنائية الهيدروكسيد (الناتج عن اذابة 1 غم من راسب الطبقات ثنائية الهيدروكسيد في 50 مل من الماء المقطر المزال منه الايونات) وحرك المزيج مغناطيسيا بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم وضع المزيج في الحاضنة الهزازة عند درجة حرارة 37 ^{o} م لمدة 18 ساعة ثم وضع في الحاضنة عند درجة حرارة 40 ^{o} م لمدة 24 ساعة اعقبه فصل الراسب بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 5000 دورة / دقيقة لمدة 20 دقيقة ومن ثم غسل بالماء المقطر المزال منه الايونات مرات عدة وبعدها جفف الراسب عند درجة 40 ^{o} م وتم طحنة بالهاون الخزفي واخيرا خزنه ، وقد أعطي المضاد الفطري النانوي المحضر الرمز Mg/Al-Clo-LDH .

تشخيص المضاد الفطري النانوي الهجين :

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

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

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

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

تم تشخيص المضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH باستخدام طيف حيود الاشعة السينية والذي يوضح الاختلاف في سمك الطبقة قبل عملية الاقحام وبعدها للمضاد الفطري Mg/Al-Clo-LDH وذلك باستخدام قانون براك $n\lambda = 2dSin\Theta$ لاستخراج قيمة سمك الطبقة (d) قبل عملية الاقحام وبعدها.

3- الفحص باستخدام المجهر الالكتروني الماسح (SEM)

تم فحص المضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH بالمجهر الالكتروني الماسح لغرض معرفة شكل السطح للمضاد قيد الدراسة.

4- الفحص باستخدام مجهر القوة الذرية (AFM)

استخدم مجهر القوة الذرية في فحص المضاد الفطري النانوي Mg/Al-Clo-LDH وقياس اقطار وحجوم وتجمعات الجزيئات النانوية ، اذ تم ارسال النموذج الى د. عبد الكريم السامرائي / كلية العلوم / جامعة بغداد لغرض فحصه . وتم استخراج معامل البلورية (Crystallinity Index) بالاستعانة بالمعادلة التالية [10] .

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

اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH و الكلوتريمازول الحر ضد الخميرة *Candida* spp. :

تم الحصول على 16 عزلة من خميرة *Candida* spp. من كلية العلوم /جامعة بابل اشتملت تلك العزلات على 12 عزلة *C. albicans* التي تحمل الأرقام (5 ، 9 ، 10 ، 12 ، 13 ، 17 ، 18 ، 19 ، 20 ، 21 ، 22 و 23) وعزلتين *C. tropicalis* التي تحمل الأرقام (4 و 8) و عزلة واحدة *C. parapsilosis* التي تحمل الرقم (6) و عزلة واحدة *C. krusie* التي تحمل الرقم(7) .

تم اختبار الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH و الكلوتريمازل الحر ضد عزلات الخميرة أعلاه وفق طريقة الانتشار في الاكار بوساطة الحفر [11] كما تم تحديد معدل التثبيط الادنى للمضاد النانوي ضد الخميرة قيد الدراسة و ذلك بإستخدام تراكيز من المضاد بلغت (0.01-5) ملغم/مل .

النتائج والمناقشة :

تشخيص المضاد النانوي الهجين

1- التشخيص باستخدام طيف الاشعة تحت الحمراء

أ - طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الفطري كلوتريمازول

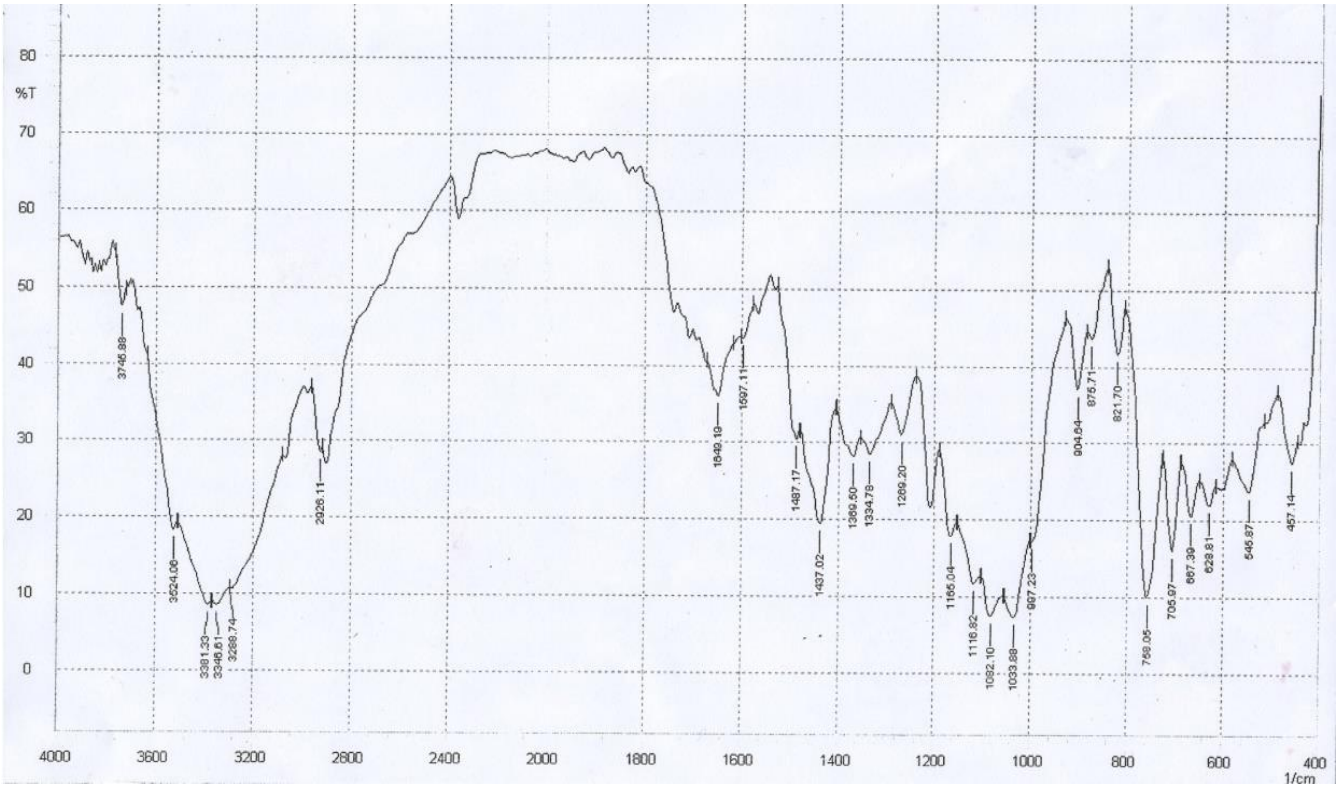
يلاحظ من الشكل **1** ظهور الحزمتين (3745 و 3524) سم $^{-1}$ واللتان تعودان الى مط مجموعة هيدروكسيل العائدة للماء ، أما الحزمة عند التردد بحدود 3100 سم $^{-1}$ فتشير الى مط C-H العائدة لجموعة الأميدازول ، في حين تعود الحزمة عند التردد 2926 سم $^{-1}$ الى مط مجموعة C-H الخاصة بالبنزين . ويعزى ظهور الحزمة عند التردد 1082 سم $^{-1}$ الى مط C-Cl ، أما الحزم الواقعة بين (875–667) سم $^{-1}$ فتشير الى إنحناء C-H الأروماتية خارج المستوي لكل من البنزين و الأميدازول [12] .

ب - طيف الأشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم \ الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد:

يتضح من الشكل **2** أن طبقات المغنيسيوم\ الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد أظهرت العديد من الحزم المميزة عند ترددات معينة ، فالحزمة عند التردد 3472 سم $^{-1}$ تعود الى إهتزاز المط لرابطة O-H وهي حزمة مستعرضة لوجود تداخل من أنواع مختلفة من الهيدروكسيل مثل هيدروكسيل الطبقة الثنائية و هيدروكسيل الماء الممتز فيزيائياً [13,14] ، أما الحزمة المميزة عند 1380 سم $^{-1}$ فتعزى الى مجموعة النترات (NO_3) الموجودة بين الطبقات [15,16] بينما تعود الحزم الواقعة بين (400-600) سم $^{-1}$ الى إهتزاز رابطة Mg-O و Al-O [17] .

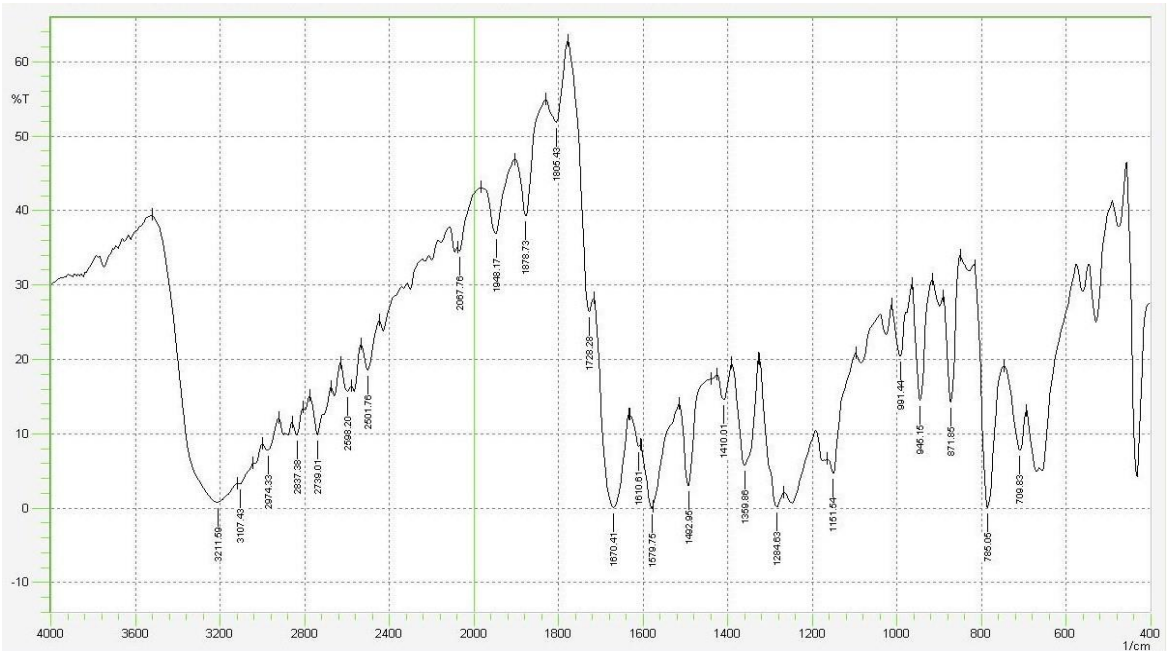
جـ - طيف الاشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين (Mg/Al-Clo-LDH)

من ملاحظة الشكل **3** يتضح أن المركب النانوي الهجين يظهر العديد من الحزم المميزة الجديدة التي تدل على نجاح إقحام المضاد كلوتريمازول بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد . إن ظهور الحزمة عند التردد 3107 سم $^{-1}$ يعزى الى مط C-H الأروماتي ، كما يعزى ظهور الحزمة عند التردد 1670 سم $^{-1}$ الى اهتزاز مط C=N و قد حصل فيه إزاحة نحو التردد الأعلى ،وأن ظهور الحزمة عند التردد 1492 سم $^{-1}$ يشير الى مط C=C و البنزين و الذي يعرف بالمط الهيكلي ، و أهم ما يميزطيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد الهجين قيد الدراسة هو إختفاء حزمة مط مجموعة النترات (NO_3) الموجودة أساساً بطيف طبقات ثنائية الهيدروكسيد . تشير الحزمة عند التردد 1151 سم $^{-1}$ الى مط C-Cl وقد حصل فيه إزاحة نحو التردد الأعلى ، أما ظهور الحزم عند التردد (709 – 871) سم $^{-1}$ فيشير الى إهتزاز إنحناء C-H الأروماتية خارج المستوي [12] .



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

الشكل (2) : طيف الاشعة تحت الحمراء لطبقات المغنيسيوم\ الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد

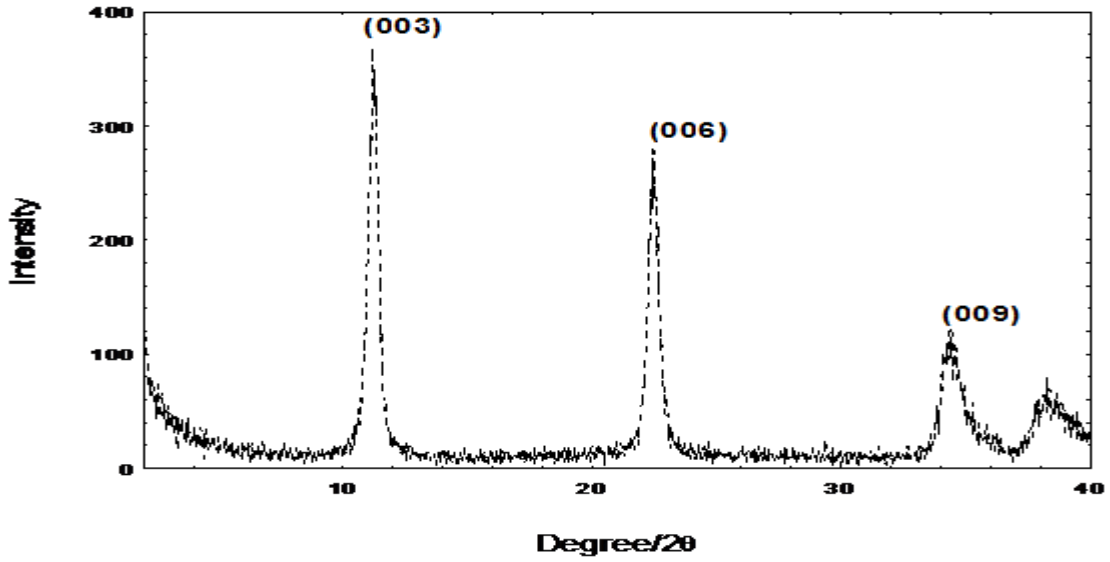


الشكل (3): طيف الأشعة تحت الحمراء للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH

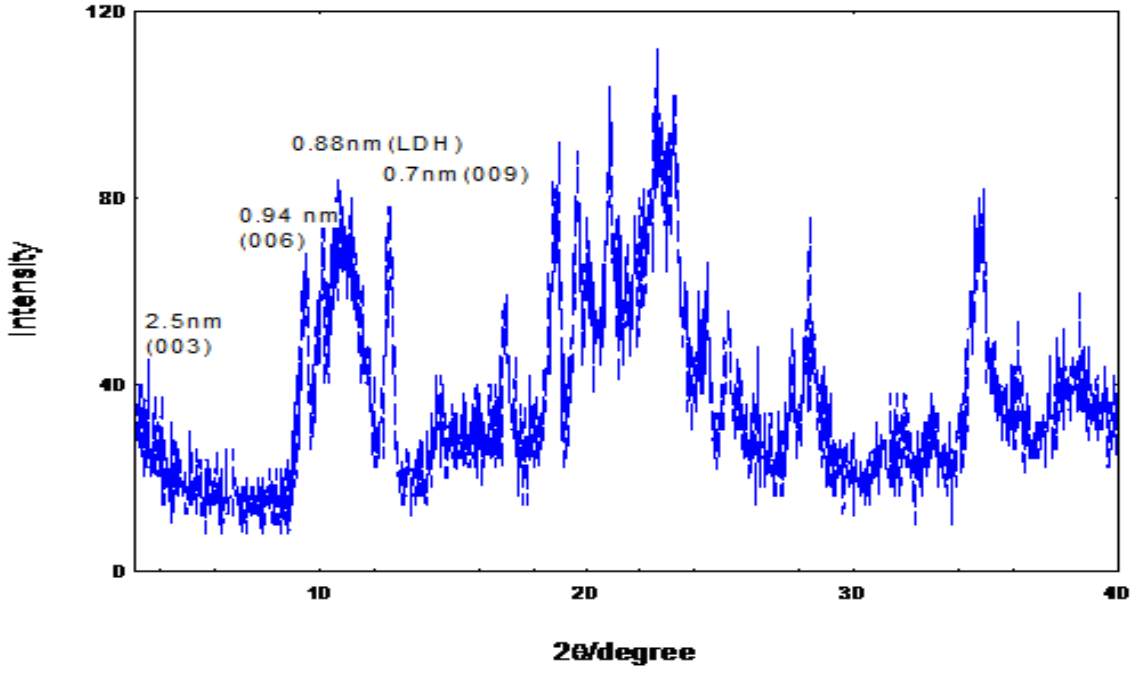
2- التشخيص باستخدام طيف حيود الاشعة السينية

تم دراسة طيف حيود الأشعة السينية للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH فضلاً عن طبقات المغنيسيوم\الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد ($Mg/Al-NO_3$-LDH) لمعرفة الإختلاف في سمك الطبقة قبل عملية إقحام المضاد الفطري الكلوتريمازول بين طبقات المغنيسيوم\الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيد.

يوضح الشكل **4** طيف حيود الاشعة السينية لطبقة المغنيسيوم/ الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد (Mg/Al-NO_3-LDH) اذ تلاحظ المستويات البلورية (003) و (006) و (009). يظهر المستوى (003) عند الزاوية 10.47° وبمسافة بلورية تساوي 0.84nmاما المستوى (006) فيظهر عند الزاوية 22.03° وبمسافة بلورية تساوي 0.41nm بينما يظهر المستوى (009) عند الزاوية 34.44° وبمسافة بلورية تساوي 0.26nm . و من خلال ملاحظة طيف حيود الأشعة السينية للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH يظهر حيود للمستوي (003) بمسافة بلورية 2.5 nm ، كما يظهر حيود للمستوي (006) بمسافة بلورية 0.94nm فضلاً عن ظهور المستوي(009) بمسافة بلورية مقدارها 0.7nm كما هو موضح في الشكل **5** .



الشكل (4) : طيف حيود الاشعة السينية (XRD) لطبقات المغنيسيوم\الألمنيوم ثنائية الهيدروكسيدMg/Al-NO_3-LDH



الشكل (5) : طيف حيود الأشعة السينية (XRD) للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH

3- الفحص بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM)

تم دراسة السطح الخارجي للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH وكذلك سطح الطبقات ثنائية الهيدروكسيد بإستخدام المجهر الألكتروني الماسح (SEM) .

يبين الشكل **6** صورة المجهر الألكتروني الماسح للطبقات ثنائية الهيدروكسيد إذ يلاحظ فيها وجود تراكيب شبيهة بالصفائح (Plate-like structures) قليلة المسامات ذات أشكال و أحجام غير منتظمة [18] ، في حين أن صورة المجهر الألكتروني الماسح للمضاد الهجين Mg/Al-Clo-LDH فتبين وجود تراكيب ذات مسامية عالية بين الطبقات نتيجة للتجاذب الحاصل بين

المضادات وسطح الطبقات ثنائية الهيدروكسيد مما يدل على نجاح عملية إقحام المضاد بين الطبقات ثنائية الهيدروكسيد كما في الشكل **7** .

تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما حصل عليه [19] إذ أدى إقحام المضاد octyl gallate بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد الى تكوين تراكيب ذات مسامية عالية .

في حين أشار [20] الى أن إقحام المضادات Ampicillin و Streptomycin و Kanamycin في جزيئات الذهب النانوية (Gold nanoparticles) يؤدي الى الحصول على تراكيب مكعبية (Cubic structures) وقضيبية (Rod) و شبيهة بالنجمة (Extended star like structure) ، على التوالي .

4- الفحص بمجهر القوة الذرية (AFM)

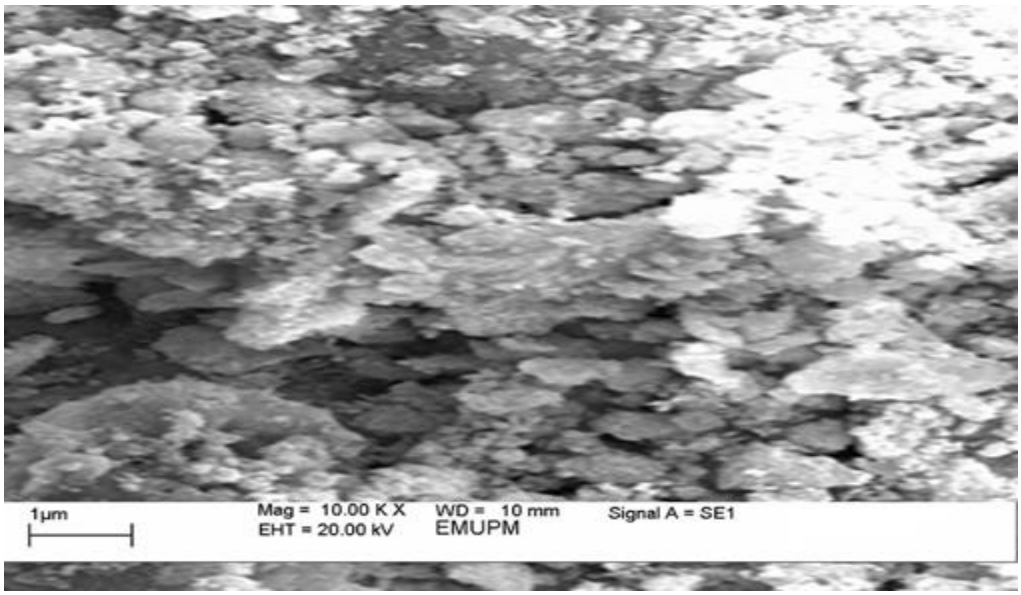
تم دراسة السطح الخارجي للمضاد الفطري النانوي الهجين قيد الدراسة . و يبين الشكل **8a** صورة ثنائية الأبعاد للمضاد الفطري Mg/Al-Clo-LDH تظهر فيها تجمعات جزيئية ذات أشكال شبه كروية .

كما يظهر الشكل **8b** صورة ثلاثية الأبعاد لمقطع من سطح المضاد النانوي الهجين و يلاحظ فيها إرتفاع التجمعات الجزيئية الذي يكون بحدود 1.40 nm مما يشير الى تصنيع مضاد نانوي هجين من المضاد كلوتريمازول الحروطبقات ثنائية الهيدروكسيد .

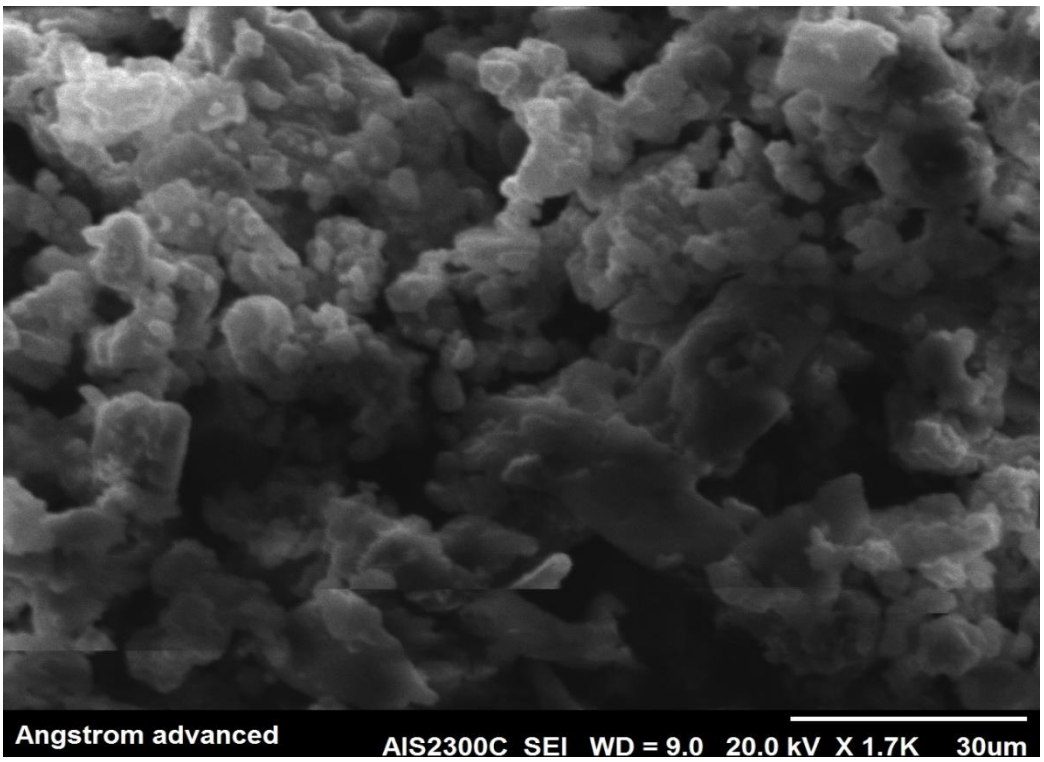
ويتضح من الجدول **1** أن معدل أحجام دقائق (Means of particle size) للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH هي بحدود 86.11nm . و قد أدت عملية تحضير هذا المضاد الهجين الى الحصول على دقائق بأقطار (40 و45 و 50 و 55 و 60 و 65 و 70 و 75 و 80 و 85 و 90 و 95 و100) نانوميتر بنسب (2.98 و6.38 و 2.55 و 3.83 و 7.23 و 6.81 و 5.11 و 7.23 و 8.51 و 6.81 و 4.26 و 1.70) % ، على التوالي .

لا تتفق نتائج دراستنا الحالية مع ما وجده [21] إذ تم الحصول على دقائق مضادات نانوية هجينة ذات أشكال كروية بمعدل أحجام تتراوح بين (50-76) نانوميتر .

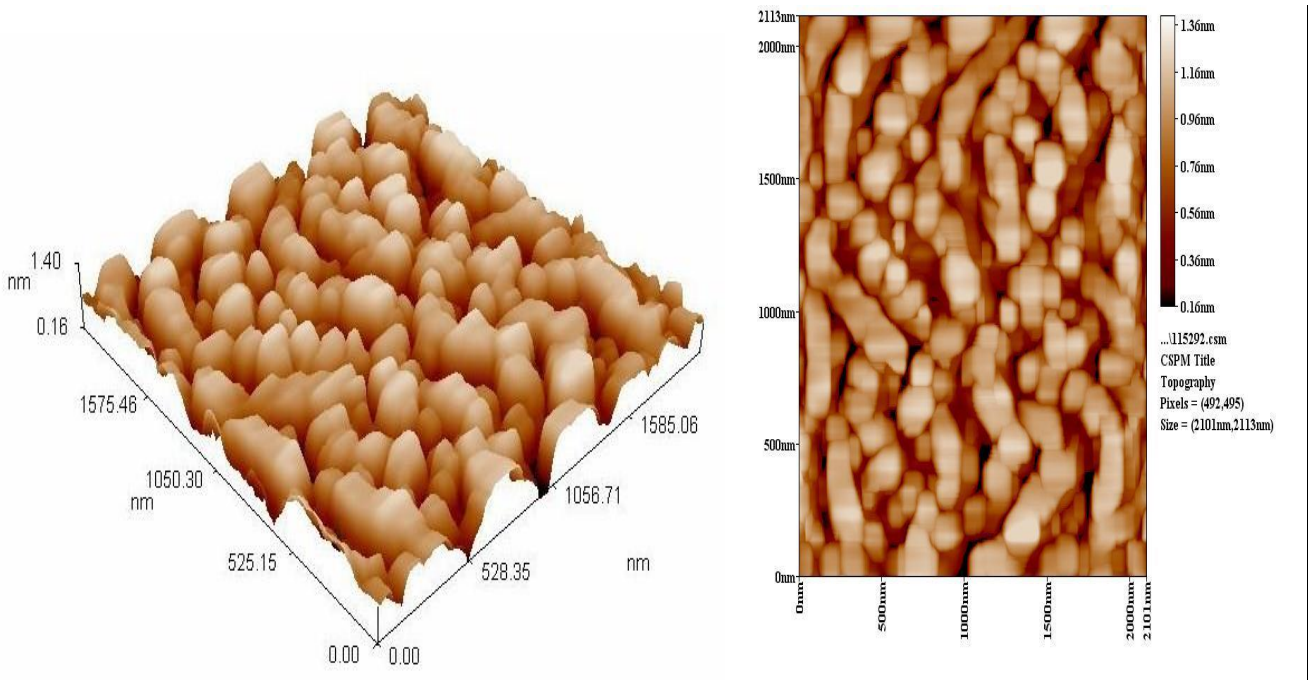
و إعتماداً على البيانات المتحصَل عليها من الجدول **1** وطيف حيود الأشعة السينية **(شكل 5)** فقد تم حساب معامل البلورية (Crystallinity Index) للمضاد قيد الدراسة وإتضح أنه يساوي 12.18 .



الشكل (6) :صورة بالمجهر الالكتروني الماسح (SEM) لطبقات المغنيسيوم/الالمنيوم ثنائية الهيدروكسيد($Mg/Al-NO_3$-LDH)



الشكل (7) : صورة بالمجهر الألكتروني الماسح للمضاد النانوي الهجين Mg-Al-Clo-LDH



(b) **(a)**

الشكل (8) : صورة ثنائية الأبعاد (a) و ثلاثية الأبعاد (b) للمضاد Mg/Al-Clo-LDH بوساطة مجهر القوة الذرية

الجدول (1) : أقطار وحجوم و تجمعات جزيئات المضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH بعد فحصه بمجهر القوة الذرية

Avg. Diameter:86.11 nm

Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)	Diameter(nm)<	Volume (%)	Cumulation(%)
40.00	2.98	2.98	80.00	8.51	50.64	120.00	2.98	80.43
45.00	6.38	9.36	85.00	6.81	57.45	125.00	5.96	86.38
50.00	2.55	11.91	90.00	4.26	61.70	130.00	1.70	88.09
55.00	3.83	15.74	95.00	4.68	66.38	135.00	2.13	90.21
60.00	7.23	22.98	100.00	1.70	68.09	140.00	2.98	93.19
65.00	6.81	29.79	105.00	2.13	70.21	145.00	3.40	96.60
70.00	5.11	34.89	110.00	2.98	73.19	150.00	2.55	99.15
75.00	7.23	42.13	115.00	4.26	77.45	155.00	0.85	100.00

التحليل الدقيق للعناصر :

أوضحت نتائج التحليل الدقيق للعناصر إحتواء المضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH و الكلوتريمازول الحر على نسب من الكاربون و الهيدروجين والنيتروجين بلغت (28.639 و 5.042 و 2.859) % و(51.417 و 5.964 و 2.333) % ،على التوالي . ومن خلال هذه النتائج يتضح أن نسبة الكلوتريمازول المحمل بين طبقات ثنائية الهيدروكسيد بلغت 55.7 % .

الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH ضد عزلات خميرة الـ *Candida* spp.

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمضاد الفطري النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH ضد 16 عزلة من خميرة ال *Candida* منها 9 عزلات معزولة من المهبل وعزلة واحدة من التربة و4 عزلات من البول و واحدة من الجلد فضلاً عن واحدة من الأظفر .

يتضح من الجدول **2** أن الفعل التثبيطي للمضاد قيد الدراسة كان أقوى على خمائر الـ *Candida* غير الـ *C . albicans* (NCAC) و التي إشتملت على الأنواع *C . krusei* و *C . parapsilosis* و *C . tropicalis* ، كما يلاحظ من النتائج أن الفعل التثبيطي للمضاد كان أقوى ضد عزلات *C . albicans* المعزولة من البول و الجلد و الأظافر و كانت العزلتان *C . albicans 22* و *C . albicans 23* هما الأكثر تأثراً إذ بلغت الفعالية التثبيطية 37.5 ملم عند التركيز 5 ملغم/مل .

و تميزت العزلة *C . albicans 17* المعزولة من المهبل بكونها العزلة الوحيدة المقاومة للمضاد عند جميع التراكيز المستخدمة في هذه الدراسة .

و من ملاحظة الجدول **2** يتضح أن للمضاد كلوتريمازول الحر فعلاً تثبيطياً مشابهاً للفعل التثبيطي للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH إذ كان تأثيره أقوى أيضاً على عزلات *C . albicans* المعزولة من البول و الجلد و الأظفر كما كانت العزلة *C . albicans 17* مقاومة لهذا المضاد أيضاً .

تتضح آلية الفعل التثبيطي للكلوتريمازول على الفطريات من خلال تثبيطه لتصنيع الاركوستيرول فضلا عن دوره في جعل غشاء البلازما الفطري ناضحاً [7,22] .

لم تتوفر دراسات سابقة عن الفعل التثبيطي للمضاد النانوي الهجين Mg/Al-Clo-LDH ضد عزلات الخميرة *Candida* spp. ، بيد أنه أشارت العديد من الدراسات الى الفعل التثبيطي للمضاد كلوتريمازول الحر ضد هذه الأنواع من الخمائر فقد أوضحت الدراسة التي قام بها [23] أن للمضاد الفطري كلوتريمازول فعلا تثبيطيا ضد 53 عزلة من عزلات *C . albicans* و عزلتي *C . tropicalis* و عزلتي *C . krusei* .

ووجد [24] أن تركيز المثبط الأدنى للكلوتريمازول هو 8 مايكروغرام/مل ضد عزلة الخميرة *C . albicans* PTCC:5027 و 2 مايكروغرام/مل للـ *C . krusei* .

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي للجدول **2** أن هناك فروقات معنوية ($p<0.05$) بين المضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH والكلوتريمازول الحر حيث تفوق المضاد النانوي قيد الدراسة بمعدل تثبيط 15.08 ملم على المضاد الحر بمعدل تثبيط 13.87 ملم ، كما أظهرت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية ($p<0.05$) بين عزلات الخميرة *Candida sp.* إذ كانت أكثر العزلات تحسساً للمضاد العزلة *C. albicans* 23 بمعدل تثبيط 20.63 ملم و أقلها تحسساً للمضاد العزلة *C. albicans* 17 إذ كانت مقاومة للتأثير التثبيطي للمضادين ، كما بينت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروقات معنوية ($p<0.05$) بين تراكيز المضادات إذ إتضح أن هناك زيادة في معدل التثبيط لكل تركيز ويزداد هذا التثبيط مع زيادة تركيز المضاد الحر و المضاد النانوي و بفروقات معنوية ($p<0.05$) .

الجدول (2):الفعالية التثبيطية للمضاد النانوي Mg/Al-Clo-LDH و المضاد Clo الحر ضد الخميرة *Candida* spp.

معدل تثبيط المركبات	23	22	21	20	19	18	17	13	12	10	9	8	7	6	5	4	العزلات	المركب
	أقطار التثبيط بالملم																التركيز(ملغم/مل)	
15.08 A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	Clo-LDH
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0.1	
	24	20.5	19.5	22	22	10	0	0	21	20	19.5	0	0	16	0	18.5	0.25	
	28.5	23.5	21	24	25	19.5	0	17	25	24	27	10.5	28	24.5	20	25	0.5	
	30	29.5	23.5	30	27.5	23.5	0	24	30	24.5	30.5	20	30	26.5	20.5	27.5	1	
	37.5	37.5	30	33.5	33	31.5	0	27.5	34	29	33	25	34.5	30.5	25	28.5	5	
13.87 B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	Clo
	16.5	18.5	12.5	0	0	0	0	0	21	15.5	0	0	0	14	0	16	0.1	
	20	20.5	20.5	14.5	16	0	0	0	23	24	12.5	0	0	17.5	0	24	0.25	
	27.5	26.5	27	26	25.5	19.5	0	0	25	24.5	18.5	0	0	21.5	0	25	0.5	
	30	29	28.5	29.5	28.5	25.5	0	12.5	26	26	25	13.5	20	22.5	10.5	26	1	
	33.5	30	29.5	30	30	30	0	20.5	32	31.5	26.5	23	28	24.5	19	30	5	
	20.63 a	19.63 b	17.67 d	17.46 d	17.29 d	13.29 f	0.0 j	8.46 h	19.75 b	18.25 c	16.04 e	7.67 i	11.7 g	16.46 e	7.92 hi	19.38 b	معدل تثبيط العزلات	

* العزلات (5 ، 9 ، 10 ، 12 ، 13 ، 17 ، 18 ، 19 ، 20 ، 21 ، 22 و 23) *C. albicans*
العزلتان (4 و 8) *C. tropicalis*
العزلة (6) *C. parapsilosis*
العزلة (7) *C. krusie*
* الحروف الكبيرة المختلفة عموديا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p<0.05$) بين المركبات.
* الحروف الصغيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p<0.05$) بين عزلات الخميرة *Candida* spp.

5	1	0.5	0.25	0.1	0.01	التركيز
معدل تثبيط التراكيز						المركب
29.38 A	24.84 B	21.41 C	13.31 D	0.75 E	0 F	Clo-LDH
26.13 A	22.06 B	16.66 C	12.03 D	7.13 E	0 F	Clo

* الحروف الكبيرة المختلفة افقيا تشير الى وجود فروقات معنوية ($p<0.05$) بين التراكيز لكل مركب على انفراد

التداخل	التركيز	العزلات	المركبات	العامل
1.898	0.335	0.548	0.194	$LSD_{0.05}$

Refrences:

1- Saunders (2007) . In : Dorland,s Medical Dictionary for Health Consumers.
2- Lai, C.C. ; Tan, C.K. ; Huang, Y.T. ; Shao, P.L. and Hsueh, P.R.(2008). Current challenges in the management of invasive Fungal infections. J Infect Chemother.14:77-85.
3- Cavaleiro, C. ; Pinto, E. ; Goncalves, M.J. and Salgueiro, L.(2006). Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophyte , *Aspergillus* and *Candida* Strains. J Appl Microbiol.100:1333-8.
4- Onyewu, C. and Heitman, J.(2007). Unique applications of novel antifungal drug combinations. Anti-Infective Agents in Medical Chemistry . 6,3-15.
5- Burgess, M.A. and Bodey, G.P.(1972). Chemother;2:423–426.(Cited from Phaechamud &Tuntarawongsa ,2010).
6- Kadavakollu, S. ; Stailey, C. ; Kunapareddy,C. S. and White , S.(2014). Clotrimazole as a Cancer Drug : A Short Review.ISSN :2161-0444 Med chem. Vol 4(11):722-724.
7- Phaechamud, T. and Tutntarawongsa , S. (2010). Clotrimazole Soft Lozenges Fabricated with Melting and Mold Technique .RJPBCS 1(4) .ISSN:0975-8585.
8- Nilesh, J. ; Ruchi, J.; Navneet ,T. ; Brham, P. Gupt; Deepak, K. Jain ; Jeetendra, B. and Surendra,J.(2010).NANOTECHNOLOGY:A SAFE AND EFFECTIVE DRUG DELIVERY SYSTEM.Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. ISSN-0974-2441. Vol. 3, Issue 3.
9- Kolekar , T.V. ; Yadav, H.M. ; Bandgar, S.S. and Deshmukh, P.Y.(2011). Synthesis By Sol-gel Method And Characterization Of Zno Nanoparticles. Indian Streams Research Journal, Vol. I, Issue. I, DOI : 10.9780/22307850.
10- Pine, X.; Medina-Ramirez, R.; Mernaughc, R. and Liu, J. Biointerfaces ، 77:82-89. (2010).
11- Egorove,N.S.(1985).Antibiotics ascientific approach. Mir Publishers, Moscow.
12- Silverstein,R.M.;Webster,F.X. and Kiemle, D.J.(2005). "Spectrometric Identification of organic compounds " 7th Ed. John Wiley & Sons . INC. Printed in the United States of America .
13- Cheng, X. ; Huang, X. ; Wang, X. and Sun, D. (2010). Influence of calcination on the adsorptive removal of phosphate by Zn–Al layered double hydroxides from excess sludge liquor. Journal of Hazardous Materials, 177:516–523.
14- Parida, K.M.; Sahoo, M. and Singha, S. (2010). Synthesis and characterization of a Fe(III)-Schiff base complex in a Zn–Al LDH host for cyclohexane oxidation. Journal of Molecular Catalysis A*: Chemical* 329:7–12.
15- Chai, H.; Xu, X.; Lin, Y.; Evans, D.G. and Li, D. (2009). Synthesis and UV absorption properties of 2,3-dihydroxynaphthalene-6-sulfonate anion-intercalated Zn–Al layered double hydroxides. Polymer Degradation and Stability ,94:744–749.
16-Arizaga, G.G.C. ; Gardolinski, J.E.F.d.C.; Schreiner, W.H. and Wypych, F.(2009). Intercalation of an oxalatooxoniobate complex into layered double hydroxide and layered zinc hydroxide nitrate. Journal of Colloid and Interface Science, 330:352–358.
17- Feng, Y.; Li, D.; Wang, Y.; Evans, D.G.and Duan, X. (2006). Synthesis and characterization of a UV absorbent-intercalated Zn–Al layered double hydroxide. Polymer Degradation and Stability, 91:789–794.

18- Wang, Y. and Zhang, D. (2012) . Synthesis, characterization, and controlled release antibacterial behavior of antibiotic intercalated Mg –Al layered double hydroxides. Materials Research Bulletin, 47 : 3185–3194.

19- Shaheed, S.A. ; Al-Ghanimi, A.A.K. and Bashi, A.M.(2014). Preparation of nanohybrid compound from the food preservative octyl gallate and studying some of its biological activities. MSc.Thesis.

20-Bhattacharya,D.;Saha,B.; Mukherjee,A.; Santra,C.and Karmakar,P.(2012).Gold nanoparticales conjugated antibiotics; stability and functional evaluation. Naosience and nanotechnology,2(2):14-21.

21-Zarina, L.and Nada, A.(2014). Green approach for synthesis of Silver nanoparticles from marine Streptomyces-MS 26 and their antibiotic efficacy, J. Pharm. Sci. & Res. Vol.6(10),321-327.

22- Borgers,M.(1980) .Rev Infec Disease;2:520–534. (Cited from Phaechamud &Tuntarawongsa ,2010).

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

24- Berenji, F. ; Rajabi, O. ; Azish, M. and Minoochehr, N. (2014). Comparing the effect of ozonized olive oil with clotrimazole on three *Candida* species *C . albicans , C . glabrata , C . krusei* . E3 Jornal of Microbiology Research Vol. 2(1).pp.009-013.