Evaluation of the activity of alcoholic extract against *Hibiscus sabdariffa L.* against biofilm formation of *Candida albicans*

تقييم فاعلية المستخلص الكحولي لنبات الكجرات *Hibiscus sabdariffa L* على تثبيط انتاج الغشاء الحيوي لخميرة *Candida albicans*

سراب فاضل حسين
انتظار جبار محمد العيداني
ايسر عاشور خلف
حيدر محمد علي
جامعة كربلاء - كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

الخلاصة

تم تسليط الضوء في الدراسة الحالية على معرفة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لأوراق الكاس لنبات الكجرات ضد خميرة *C.ablicans* المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان للفترة الزمنية من 2017/12/1 لغاية 2018/2/27.

وقد اختبرت تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لنبات الكجرات على خميرة *C.ablicans* بطريقة الانتشار بالحفر وطريقة Microdilution Method لمعرفة MIC ثم اتبعت طريقة Microtiter Plate (MTP) لتنمية الغشاء الحيوي ودراسة تأثير المستخلص عليه بينت النتائج بان التراكيز (50 , 100 , 150) ملغم / مل اعطت معدلات الاقطار التثبيطية (30, 27,23) ملم على الترتيب. وان قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص ضد خلايا الخميرة هي 25 ملغم / مل ،واستخدمت التراكيز(50,25,12.5) لدراسة فاعلية المستخلص على الغشاء الحيوي، واظهرت النتائج التأثير المثبط للمستخلص على الغشاء الحيوي. نستنتج من الدراسة الحالية الكفاءة العالية للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات في تأثيره على الغشاء الحيوي لخميرة *C.albicnas* ،مما يدل على إمكانية استخدامه كعلاج للمصابين بمرض داء المبيضات Candidiasis.

Summary:

In the current study , it was highlighted to find out the inhibitory effect of the alcoholic extract of *Hibiscus sabdariffa* against *Candida albicans* isolated from mouth area and around teeth through the period from 2017/12/1 until 2018/2/27 . Different concentration of alcoholic extract of *Hibiscus sabdariffa* were tested on the yeast *C.albicans* by well diffusion method and microdilution method . The results showed that concentrations (50 , 100 , 150) mg/ ml of the crude extract gave inhibition zone diameter rates (23 , 27 , 30) mm respectively, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was (25) mg/ml against the yeast cells. Concentrations (12.5 , 25 , 50) mg/ ml were used to study the activity of the extract on biofilm, The results showed the inhibitory effect of the extract on biofilm . From the current study , we concluded that, the high efficiency of alcoholic extract of *Hibiscus sabdariffa* against the yeast *C.albicans,* suggesting the possibility of its use as a treatment for patients with Candidiasis .

المقدمة Introduction

تعد الفطريات من الكائنات الحية حقيقية النواة اذ يوجد حوالي 50000 نوع من الفطريات تعيش في الطبيعة منها 80نوعا من الاعفان والخمائر تسبب امراضا للإنسان والحيوان على حد سواء [1] وتعرف هذه الامراض بالاخماج الفطرية Mycosis والتي تُصيب عادةً الأشخـاص الضعاف مناعيا [2]. تعد خميرة *C.albicans* من الخمائر التي تتواجد بصورة طبيعية على الجلد و الاغشية المخاطية في الافراد الاصحاء [3].كما وتتواجد بشكل طبيعي في تجويف الفم في العديد من الاشخاص الاصحاء (healthy individuals) ولكن بأعداد قليلة ، فضلا عن تواجده في المهبل والقناة التنفسية وغيرها[4]، وعلى الرغم من ذلك فان لهذه الفطريات الانتهازية Oppertunistic fungi القدرة على

ان تسبب ما يعرف بداء المبيضات Candidiasis [5]. و بالإمكان أن يتطور داء المبيضات من اصابة سطحية Superficial infection لا في الاصحاء الى اصابة تهدد حياة الافراد الذين يعانون من كبح في الجهاز المناعي immunocompromised [3]. و مما أسهم في إمراضيه خميرة *C.albicans* هو امتلاكها لمختلف عوامل الضراوة Virulence factors والتي تشمل التشكل Morphogenesis وتكوين انبوب الانبات germination tube ،واختراق سطح الخلية Penteration ، والالتصاق Adhesion وتكوين الاغشية الحيوية Biofilm Formation بالإضافة إلى افراز الانزيمات المحللة مائيًا Hydrolytic enzymes [6]

يعرف الغشاء الحيوي بأنه شكل ثلاثي الابعاد يتكون من تجمعات من الخلايا و الخيوط الحقيقية والكاذبة Hyphae and Pseudohyphae الذي يكون مغلفا بمادة خارج خلوية Extra Cellular Matrix (ECM) تفرزها خلايا خميرة *C.albicans* وتتكون (ECM) من سكريات متعددة Polysaccharides وبروتينات Proteins و DNA وغيرها من المكونات اللازمة لحصول الالتصاق [8][7] ، بين [9] بأن الغشاء الحيوي Biofilm من عوامل الضراوة الرئيسية في خميرة *C.albicans* الذي يعد سببا لمقاومة الخميرة للمضادات الفطرية

يُعد نبات الكجرات(*Hibiscus sabdariffa* L.) من النباتات الطبية التي تنتمي الى نباتات العائلة الخبازية (Malvaceae) [10]. و هو نبات شجيري قائم يصل ارتفاعه إلى مترين ، الجذر منه يكون وتدي ، الأزهار تكون إبطيه اما الأوراق العليا تكون مفصصه ، [11]، الاوراق الكاسية (calyxes) لنبات الكجرات من الاجزاء المهمة والغنية بالمواد الكيميائية (المواد الفعالة) اذ تحتوي على ماء، بروتينات، دهون، كاربوهيدرات، الياف fibres، , Carotene Niacin ,Riboflavin, Thiamine ، فيتامين(C) ascorbic acid وعناصر معدنية مثل الكالسيوم Ca ، الفسفورP والحديد Fe [12]. لقد اجريت العديد من الدراسات التي تشير الى فعالية مستخلصات نبات الكجرات تجاه نمو بعض الفطريات والبكتريا، ومنها دراسة [13] فقد وجد ان مستخلص الكحولي لنبات الكجرات ثبط نمو الفطرين *A. flavus* و *A. parasiticus* .

في الدراسة الحالية استخدم المستخلص الكحولي لنبات الكجرات بهدف تقدير فعاليته على الغشاء الحيوي لخميرة *C. albicans*

طرائق العمل Materials and Methods

1- جمع العينات :

تم جمع 120 عينة من منطقة الفم وما حول الاسنان من المرضى في مستشفى الحسين في محافظة كربلاء للفترة الزمنية

من 2017/12/1 لغاية 2018/2/27 بواسطه مسحات قطنية Sterile Swabs ، ثم نقلت العينات الى المختبر لغرض اجراء التجارب عليها .

2- العزل والتشخيص Isolation and identification :

تم تنمية العينات في اطباق بتري حاوية على وسط السابرويد دكستروز اكارSabrouid Dextrose Agar (SDA) درجة حرارة 37 مْ ولمدة 48 ساعة [14] . شُخصت عزلات *C.albicans* بالاعتماد على ما جاء في [15] من خلال ملاحظة الصفات المظهرية للمستعمرات ، الفحص المجهري للخلايا والتلون بصبغة غرام ، اختبار تكوين الانبوب الجرثومي ، تكوين الابواغ الكلاميدية واستخدام Api20c system (BioMerix ,France) في تشخيص الاختبارات الكيموحيوية .

3- اختبار قدرة خميرة *C.albcians* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة احمر الكونغو Congo Red Agar (CRA)

تم استخدم اختبار(CRA) لغرض الكشف عن قدرة خميرة *C.albicans* على تكوين الغشاء الحيوي Biofilm . وحضر وسط (CRA) من اذابة نقيع القلب والدماغ BHIB 37 غم ، سكروز Sucrose 50 غم ، آكار - آكار Agar – Agar 10 غم في ماء مقطر Distilled Water 900 مل . وتم تحضير صبغة احمر الكونغو بإذابة 8 غم من مسحوق الصبغة في 100 مل ماء مقطر وعقمت بصورة منفصلة عن الوسط . حيث تم تخطيط مستعمرات الخميرة على وسط CRA ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة [16] .

4 - تحضير المستخلص الكحولي لنبات الكجرات

اتبعت الطريقة [17] في عملية الاستخلاص، إذ طحنت الاوراق الكاسية الجافة باستخدام طاحونة للحصول على مسحوق ، ثم مزج 20 غم من مسحوق الكجرات مع 100 مل من كحول الايثانول 70% وترك المحلول مع التحريك المستمر بواسطة الجهاز الهزاز (Shaker) و بدرجة37 °م و لمدة 24 ساعة ، بعدها تم ترشيح النقيع باستعمال عدة طبقات من الشاش الطبي ثم باستعمال ورق ترشيح من نوع Whatmann No.1، وعرض الراشح الى الانتباذ بقوة 2500 دورة /دقيقة و لمدة 10دقائق بجهاز الطرد المركزي ، بعدها وضع الراشح في أطباق بتري زجاجية نظيفة و

معقمة و وضعت في الحاضنة بدرجة 40°م و لمدة 2-3 أيام حتى جفاف المستخلص ، ثم كشط المستخلص الجاف بوساطة سكينة نظيفة و معقمة و حفظ المسحوق الجاف بعد وزنه في أوعية بلاستيكية نظيفة ومحكمة لحين الاستعمال .
تم تحضير تراكيز المستخلص الكحولي للكجرات وذلك بوزن 1.5 غم من باودر نبات الكجرات المحضر مسبقا واضيف له 10مل من كحول الايثانول تركيز 70% للحصول على المحلول الخزين Stock Solution بتركيز 150ملغم/مل ومنه حضرت باقي التراكيز(100,50,25,12.5) ملغم/مل لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات ضد خميرة *C. albicans* .

5-اختبار حساسية خميرة *C. albicans* للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات

اتبعت طريقة الانتشار في الحفر Well diffusion method لاختبار حساسية الخميرة المدروسة للمستخلص الكحولي للكجرات ، حيث مزجت عدد من مستعمرات الخميرة مع 5مل من المحلول الفسيولوجي ثم غطست ماسحات قطنية معقمة في العالق الفطري ثم خطط على سطح الاكار وتركت الاطباق حتى يتم امتصاص المزيج من قبل الاكار(مولر هنتون MH + 2 % كلوكوز). تم عمل حفر في الاطباق المزروعة بقطر 6 ملم بواسطة ثاقب فلين معقم وتملأ بـ 50 مايكروليتر من كل التراكيز المختلفة (150، 100 ،50) ملغم/مل واستخدم كحول الايثانول كسيطرة سالبة Negative control ، والمضاد الفطري النيستاتين Nystatin كسيطرة موجبة Positive control ، تحضن الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة ، و بعد انتهاء مدة الحضن تقاس اقطار مناطق التثبيط حول الحفر وتسجل النتائج[18] .

6-اختبار التركيز المثبط الادنى (Minimum inhibitory Concentration (MIC

اتبعت طريقه Microdilution method المعتمدة من قبل [19]، كما في الخطوات الاتية :
1- حضر العالق الفطري لخميرة *C.albicans* باستخدام وسط مولر هينتون مضاف اليه الكلوكوز تم مطابقة عكوره العالق مع عكوره محلول مكفرلاند القياسي (0.5) التي تعادل (1.5×10^6) خلية / مل .
2- استعملت 8 انابيب رقمت من 1- 8 واضيف اليها 1 مل من وسط مولر هينتون .
3- حضرت سلسلة التخافيف النصفية من الخزين150ملغم/مل (12.5,25,50,100) ملغم / مل للمستخلص الكحولي باستخدام الوسط وذلك بإضافة 1 مل إلى الانبوب الاول ورج جيدًا ثم نقل 1 مل من الانبوب الاول إلى الانبوب الثاني ورج جيدًا ثم نقل 1 مل من الانبوب الثاني إلى الانبوب الثالث وكررت العملية وصولًا إلى الانبوب رقم 8 إذ رُج وأُزيل منه 1 مل للحصول على حجم نهائي مقداره 1 مل في كل انبوب وغيرت الماصة بين انبوب وآخر لمنع حدوث التلوث
4- تم استخدام صفيحة Microtiter Plate الحاوية على 96 حفرة (96 Wells) .
5- وضع في كل حفرة (150) مايكروليتر من كل من التراكيز التي حضرت مسبقًا .
6- اضيف 50 مايكروليتر من العالق الفطري لكل حفرة ، واستخدم المضاد الفطري النيستاتين بتركيز 100,000 وحدة دولية واستخدم كحول الاثيل (70 %) كسيطرة سالبة .
7- غطيت الصفيحة وحضنت بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة وبعد انتهاء مدة الحضن فحصت جميع حفر الصفيحة بوجود أو عدم وجود العكورة Turbidity .
8- حدد التركيز المثبط الادنى (MIC) بعد الحضن الذي يمثل أقل تركيز من المستخلص الكحولي للكجرات لم يلاحظ فيه نموٌ لخميرة *C.albicans* مرئيً.

7-تأثير المستخلص الكحولي للكجرات على الغشاء الحيوي للخميرة

اتبعت طريقة (20) لمعرفة تأثير المستخلص على الغشاء الحيوي للخميرة

اولًا : تحضير المزروع لخميرة *C.albicans*

1- تم تلقيح دورق مخروطي حاوي على 25 مل من وسط (Yeast Pepton Dextrose Broth (YPDB بعدد من مستعمرات خميرة *C.albicans*.
2- حضن المزيج في حاضنة هزازة بدرجة حرارة 30 مْ و 180 دورة في الدقيقة ولمدة 18ساعة.
3- اخذ المزروع الذي سبق حضنه ليلة كاملةوعرض للطرد المركزي بسرعة 3000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق .
4- غسلت الخلايا (الراسب Pellet) مرتين بالمحلول الفسيولوجي ثم اضيف 20- 25 مل من وسط RPMI- 1640 إلى (الراسب) المغسول وتم المزج بواسطة جهاز Vortex .
5- من العالق الاخير تم تحضير عالق فطري مخفف يطابق في عكورته عكورة محلول مكفرلاند القياسي 0.5 الذي يعادل (1.5×10^6 CFU / ml) .

ثانيًا : تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP

1- اضيف 100 مايكروليتر من العالق الفطري للخميرة الى الحفر المختارة
2- تغطى الصفيحة بالغطاء الخاص بها وتحاط بالشريط المطاط وتحضن بدرجة حرارة37م° لمدة24 ساعة .
3- تم التخلص من مكونات كل حفرة بواسطة ماصة دقيقة بحذر بحيث لا تلامس ولا تمزق الغشاء الحيوي .
4- تم غسل الصفيحة بإضافة 200 مايكروليتر لكل حفرة من المحلول الملحي الفسيولوجي باستخدام الماصة الدقيقة وذلك للتخلص من الخلايا الطائفة .
5- جففت الصفيحة بقلبها على اوراق التنشيف لغرض اضافة المستخلص الكحولي .

ثالثا: اختبار تأثير المستخلص الكحولي على الغشاء الحيوي

1- حضرت التراكيز(12.5،25،50)ملغم/مل لدراسة تأثيرها على الغشاء الحيوي المحضر مسبقا حيث تم اضافة 50 مايكروليتر من كل من التراكيز السابقة الى كل حفرة بواقع ثلاث مرات لكل تركيز وكانت الحفر تحتوي على وسطRPMI-1640 .
2- غطيت الصفيحة وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة 37م°.
3- غسلت الصفيحة بالمحلول الفسيولوجي وصبغت بصبغة الكريستال البنفسجية بتركيز 1%حيث اضيف 100مايكروليتر لكل حفرة .
4- تم غسل الصبغة وبعد التثبيت تم اضافة كحول الايثانول المطلق الى كل حفرة ووضعت بالحاضنة لمدة 15 دقيقة .
5- تم نقل الكحول الى صفيحة جديدة ووضعت بجهاز ELISA لقراءة النتائج على طول موجي nm550.

النتائج والمناقشة

العزل والتشخيص Isolation and Identification

استخدم وسط السابرويد دكستروز آكار (SDA) وسطا اوليا لعزل الفطريات حيث يسمح بنمو انواع خميرة الكانديدا *Candida* spp. ويثبط نمو الكثير من انواع البكتريا الموجودة في الفم بسبب انخفاض الاس الهيدروجيني PH وأن إضافة المضادات الحيوية لهذا الوسط يجعله اختياريًا اكثر لنمو الفطريات [21] ، وقد ظهرت مستعمرات خميرة *C.albicans* على وسط (SDA) بشكل مستعمرات دائرية ، بيضاء إلى كريمية اللون مرتفعة عن سطح الآكار لماعة ذات حواف ملساء وهذه الصفات تتوافق مع ما توصل إليه [22]، كما شخصت خميرة *C.albicans* بالاعتماد على مجموعة من الاختبارات البايوكيميائية والفسيولوجية مثل اشكال المستعمرات ولونها ورائحتها واصطباغها بصبغة كَرام وقابليتها على تكوين الانبوب الجرثومي والابواغ الكلاميدية وانتاج انزيم اليوريز.

الكشف عن قدرة خميرة *C.albcians* لإنتاج الغشاء الحيوي بطريقة CRA .

يوضح الجدول رقم (1) أن 37 عزلة بنسبة عزل (57.81%) منتجة للغشاء الحيوي وتضمنت15عزلة (40.54% من خميرة *C.albcians* انتجت (Strong Biofilm) وأن 22 (59.45 %) انتجت (intermediate Biofilm) ، وأن 28 (46.2 %) من بين عزلات خميرة*C. albicans* غير منتجة للغشاء الحيوي [16].

جدول (1) اعداد ونسب تكوين الغشاء الحيوي لخميرة C.albcians بطريقة (CRA)

العزلات	NO: (%)	Biofilm negative no (%)	Biofilm Positive no (%)		
			Strong	Intermediate	Total
C.albcians	(53.3)64	(46.2) 28	(40.54) 15	(59.45)22	(57.81)37

وقد تم التوصل إلى هذه النتائج من خلال شكل مستعمرات خميرة *C.albcians* على وسط (CRA) ،إذ أن الخمائر المكونة للغشاء الحيوي تكون مستعمراتها ذات لون احمر مع وجود هالة سوداء سوداء ، في حين تكون المستعمرات غير منتجة للغشاء الحيوي وردية اللون فاتح وتتوافق هذه النتائج مع ما توصل إليه [23]عند استخدامهم طريقة أحمر الكونغو (CRA) في تكوين الغشاء الحيوي لخميرة *C. albicans* حيث اشاروا إلى أن (52.2 %) من مجموع خميرة *C.albcians* هي غير منتجة للغشاء الحيوي في حين أن (41.8 %) هي منتجة للغشاء الحيوي Intermediate % (9.5 Strong % , 90.5) ، وقد يعزى التغير في لون المستعمرات بهذه الطريقة والذي يحدث في المراحل الاخيرة من مدة الحضن إلى وجود نواتج ايضية ثانوية ، وكذا يوصف استخدام السكروز أو الكلوكوز 5 % بانه عامل اساسي لتحديد

انتاج السكريات الخارجية المتعددة Exopolysaarides باستخدام اوساط غذائية غنية[16] [24]، وقد يكون التغير اللوني سببه ارتباط صبغة الكونغو الاحمر بشكل مباشر بمتعدد سكريات معين مكونة معقدات ملونة [25] .

طريقة الانتشار بالحفر Well Diffusion Method

يوضح الجدول (2) معدلات الاقطار التثبيطية Inhibition Zone Diameters (IZD) مقاسة بوحدات المليمتر (mm) للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات ضد خميرة *C.albicans* ، كما بينت النتائج بأن معدلات المناطق التثبيطية تراوحت ما بين (23–30) مليمتر مما يدل على انخفاض معنوي $P \leq 0.05$ في اعداد خلايا خميرة *C.albicans* مقارنة بالسيطرة الموجبة النيستاتين والسيطرة السالبة كحول الاثيل 70% وهذا يدل على أن جميع عزلات خميرة *C.albicans* حساسة للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات .

جدول (2) معدلات الاقطار التثبيطية للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات ضد خميرة *C.albicans* بطريقة الانتشار بالحفر .

التراكيز بوحدات ملغم / مل	معدلات الاقطار التثبيطية (mm)
150	30
100	27
50	23
السيطرة الموجبة النيستاتين	8.67
السيطرة السالبة	5.33

اعطت التراكيز (50 , 100 , 150) ملغم / مل معدلات الاقطار التثبيطية (30,27,23) ملم على الترتيب .
ونستنتج من ذلك بأنه كلما زاد تركيز المستخلص الكحولي لنبات الكجرات كلما كبر قطر المنطقة التثبيطية ، مما يدل على التأثير الطردي الفعال للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات كمثبط لخميرة *C.albicans* ،اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه [26] في كفاءة المستخلص الكحولي لنبات الكجرات كمضاد لخميرة الكانديدا.

تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي للكجرات ضد خميرة *C.albicans* استخدمت مجموعة التراكيز (150 , 100 , 50 , 25 , 12.5) ملغم / مل لحساب MIC بطريقة Micordilution Methed ، وكان التركيز (25) ملغم / مل هو اقل تركيز مثبط لخلايا خميرة *C.albicans* جدول (3) .

جدول (3) التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات ضد خميرة *C.albicans*

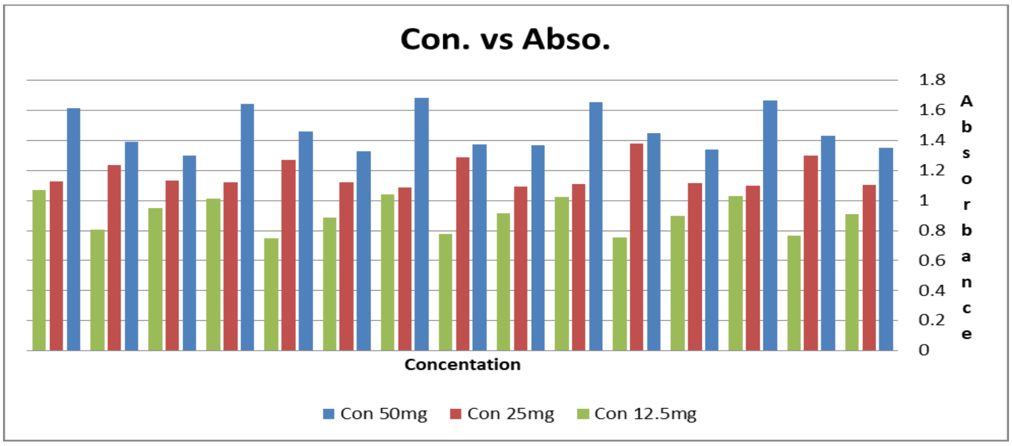
التركيز ملغم / مل	نتيجة التثبيط
12.5	+
25	-
50	-
100	-
150	-

+ : تعني وجود نمو .
- : تعني عدم وجود نمو .

إن انخفاض القيمة الخاصة بتركيز (MIC) للمستخلص النباتي يشير إلى مدى الفعالية العالية للمستخلص النباتي ضد خميرة *C.albicans* وهذا ما أكده [27]. وقد تعود فعالية المستخلص الكحولي لنبات الكجرات ضد خميرة *C.albicans* لاحتوائه على المركبات الفينولية التي تتضمن الفلافونات والسيانديين [28]، كما ان المركبات الفينولية اظهرت قدرتها على تثبيط نشاط الميكروبات ،فقد يكون تأثير المركبات الفينولية المضادة للميكروبات حرمان البروتينات الحية من عنصر الحديد مثل الانزيمات الميكروبية [29][30] . هذه النتائج توافقت وما توصل اليه العديد من الباحثين فقد اكد (31) الى ان المستخلص المائي لنبات الكجرات يمتلك فعالية تثبيطيه تجاه الفطر *C. albicans* حيث بلغت منطقة التثبيط 21 ملم .

تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بواسطة المستخلص الكحولي لنبات الكجرات

اظهرت نتائج الدراسة تأثير المستخلص الكحولي لنبات الكجرات في تثبيط تكوين الغشاء الحيوي من قبل خميرة *C.albicans* بطريقة MTP. حيث ان جميع العزلات المكونة للغشاء الحيوي اظهرت تثبيط تكوينها للغشاء الحيوي بمختلف التراكيز من المستخلص الكحولي لنبات الكجرات كما موضح في الشكل (1) .



شكل (1) تثبيط تكوين الغشاء الحيوي بطريقة MTP لخميرة *C.albicans* بواسطة المستخلص الكحولي لنبات الكجرات

واتفقت نتائج الدراسة في التأثير المثبط للمستخلص النباتي على تكوين الغشاء الحيوي مع الدراسة التي اجراها [26] حيث بينوا بان نبات الكجرات يحتوي على مركبات بوليمرية تسمى proanthocynidin ، فقد اظهرت الدراسات بان مركبات proanthocynidin من مستخلص التوت البري يثبط تكوين الغشاء الحيوي من قبل خميرة *C.albicans* المعزولة من منطقة الفم [20] .

الاستنتاجات

نستنتج من الدراسة الحالية التأثير المثبط للمستخلص الكحولي لنبات الكجرات على خلايا خميرةC.ALBICANS وكما توصلنا الى امكانية منع تكون الغشاء الحيوي بفعل التأثير المثبط للنبات على تكوين الغشاء الحيوي من قبل الخميرة

المصادرReferences

1- Pfaller,M.A. and Diekma,D.J.(2007). Epidemiology of invasive candidiasis : apersistent public health problem .Clin.Microbiol.Rev.20(1):137-63.

2- Tortora,G.J.;Funke,B.R.&Case,Ch.L. (2002).Microbiology AnIntroduction.7th ed., Benjamin Cummings,Sanfrancisco.Boston New york.

3- Francois , L. M.; Dumcan , W. and Bernhard , H.(2013). *Candida albicans* Pathogenicity mechanisms virulance , 4 (2) :119 – 128.

4- Lewis, R. E.; Klepser, M. E. & Pfuller, M. A. (2000). *In vitro* pharmocodynomic characteristics of flucytosine determined by time-kill methods.Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 36:101-105.

5-Coretaset, J.A.; Reyes , P.; Gomez , C.; Buitraga , G. and Leal , A.L.(2011). Fungal blood stream infections in tertiary care hospitals in Collombia . *Rev. Iberoam . Micol.* (88) : 74 - 80.

6- Nicholls , S.; Maccallum , D.; Kaffarnik F.; Selway , L.; Peck , S. and Brown , A. (2011). Activiation of the heat shock transcription of facter HSH is essential for the full virulence of the fungal Pathogen *Candida albicans* . Fungal Genet. Biol. PP : 297 – 305.

7- Seneviratne , C. J.; Jin , L. and Samaranayake , L. P.(2008). Biofilm life style of *Candida m*ini view . Oral Dis. 14 : 582 – 90.

8- Hoyer , L. L.; Green , C. B. ; oh , S. H. and Zhao , X.(2008). Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinine like sequence (ALS) gene family – a sticky Pursuit . Med. Mycol. 46 : 1 – 15.

9- Taff , H. T.; Mitchell , K. F.; Edward , J. A. and Andes , D. R.(2013). Mechanisms of Candida biofilm drug resistance . Future Micobiol. 8 : 1325 – 1337.

10- Ajithadoss, K ; Pandian ,T.T; Rathinkumar,S.S;Edwin,.R; Sekar,T; Sakar P and Munusamy, S.(2006) . Botany Higher Secondary Second Year. 1st Edition. Government of Tamil Nadu Textbook Corporation College Road Chennai.

11-حسين، فوزي طه قطب (1981). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها، دار المريخ للنشر، الرياض . 356 صفحة.

12- Mahadevan , N. ; Shivali and Pradeep, Kamboj (2009). *Hibiscus sadariffa* Linn.- An overview natural product radianc .8 (1) :7.

13- العيداني، انتظار جبار محمد(2014). اختبار كفاءة بعض المستخلصات النباتية وخميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* والظروف الفيزيائية في تثبيط نمو الفطرين *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* الفارزة لسم الافلاB1. رسالة ماجستير، كلية التربية للعلوم الصرفة . جامعة كربلاء.

14- Atlas, R.M. (1995). Principle of Microbiolgy . 1st ed. Mosby year book .Inc. p.888 .

15- Murray , P . R . ; Baron , E . J . ; Pfller , M . A . ; Tenover , F . G . and Yolken . R . H . (1999) Mannal of clinical microbiology . 7 th ed . ASM press . washigton .

16- Freenman , D. J.; Falkiner , F. R and keane , C. T.(1989). New method for detecting slime production by coagulase negative *staphylococci.J.Clin.Pathol* .42(8) : 872 – 874 .

17- عطوان ، زينة وحيد ،فاطمة صيوان ، فردوس نوري جعفر (2005) .اختبار الفعالية الحياتية لمستخلص زهرة العصفر تجاه الجراثيم والفطريات مجلة ابحاث البصرة ، العدد 31، الجزء الثالث 39-47 .

18- AL-mohana, A.; Mahdi, O.and Ali , H.(2008).Antibacterial activity of alcoholic extract of local Propolis against Listeria mono cytogens . *J. Anbar . For Vet . Sci* . 1 : 61 – 67 .

19- National Committee for Clinical Labortary standards . (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed Approved Standard M 27 – A2. NCCLS, *Wayne , PA . USA.*

20- Feldman. M.,Tanabae, S.; Howwll,A. and Grenier,D.(2012) .Cranberry proanthocyanidins inhabit the adherence properties of *Candida albicans* and Cytokine secretion by oral epithelial cells –BMC complement Altern Med,12:6.

21- Marsh , P. D. and Martin , M.(2009). Oral fungal infections . Oral . Microbiol. Churachill Livingstone, Edinburgh , U. K. : 166- 179 .

22-Baveje , C. (2010) . Medical mycology . In : Text book of microbiology for dental students . 3rd ed . *Delhi , Arya Publicat.* :322-323 .

23-Saxena , N.; Maheshwari , D.; Dadhich , D. and Singh , S. (2014). Evluation of Congo Red Ager for detection of biofilm Production By various clinical *Candida* isolates *.J. Evol. Med. Dent. Sci.* 3 (59) : 13234 - 13238.

24- Oliveira , A. and Cunha , M. L.(2010). Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase - negative staphylococci . *BMC. Res. Notes.* 3 : 260.

25-Hassan , A.; Usman , J.; Kaleem , F.; Omair , M.; Khalid , A. and Iqbal , M. (2011). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates . *Braz. J. Infect. Dis* . 15 (4): 305-311.

26- Alshami I.AND Alharbi,A.E.(2014). *Hibiscus sabdariffa* extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of Candida albicans isolated from recurrent urinary tract infections, Asian Pac J Trop Biomed; 4(2): 104-108.

27-Fabry , W.; Okemo , P.O. and Asorg , R.(1998) . Antimicrobial activity of East African medicinal plants . *J. Ethanophavmacol* . 60(1):79-87.

28-Fernández-Arroyo S, Herranz-López M, Beltrán-Debón R, Borrás-Linares I, Barrajón-Catalán E, Joven J, Fernanes-Gutirrez A,Sequra Carretero A. (2012).Bioavailability

study of a polyphenol-enriched extract from Hibiscus sabdariffa in rats and associated antioxidant status. Mol Nutr Food Res . 56: 1590-1595

29-Diarra MS, Block G, Rempel H, Oomah BD, Harrison J, McCallum J, Brouillette E,Gattuso M,Malouin F. (2013) I*n vitro* and *in vivo* antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or icombination with β-lactams against Staphylococcus aureus. BMC Complement Altern Med. 13: 90.

30- Guo M, Perez C, Wei Y, Rapoza E, Su G, Bou-Abdallah F. and Chasteen N D. (2007).Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bioeffects. Dalton Trans. 43: 4951-4961.

31- 15- A. Elmanama, Abdelraouf ; Amany A. Alyazji, Nedaa A. Abu Gheneima (2011) . Antibacterial, Antifungal and *inermis*, *Punica granatum* and *Hibiscus sabdariffa* Synergistic Effect of Lawsonia . Medical Technology Department, Islamic University-Gaza, Palestine . 7:33-41