Antifungal Activity Evalution of *Punica granatum L.* Extract against *Candida albicans*

تقييم الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة *Candida albicans*

أيسر عاشور خلف أ.م.د.هيام عبد الرضا العواد
قسم علوم الحياة ،كلية التربية للعلوم الصرفة ،جامعة كربلاء ،كربلاء-العراق

بحث مستـــل

الخلاصة:
تم تسليط الضوء في الدراسة الحالية على معرفة التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي لقشور الرمان Ethanolic Peels (EPGP) *Punica granatum* ضد خميرة *C.ablicans* المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان للفترة الزمنية من الاول لشهر تشرين الاول للعام 2015 ولغاية الاول من شهر حزيران للعام2016 .وقد اختبرت تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (EPGP) على خميرة *C.ablicans* بطريقة الانتشار بالحفر وطريقة Microdilution Method .بينت النتائج بان التراكيز (12.5, , 25 , 50 , 100 , 150) ملغم / مل اعطت معدلات الاقطار التثبيطية , 22) (9 , 13.97 , 15.5 , 19.33 على الترتيب . وان قيمة التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص ضد خلال الخميرة هي 12.5 ملغم / مل، نستنتج من الدراسة الحالية الكفاءة العالية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان في تأثيره على خلايا خميرة *C.albicnas* ،مما يدل عل إمكانية استخدامه كعلاج للمصابين بمرض داء المبيضات Candidiasis .
الكلمات المفتاحية :الرمان ،الفعالية التثبيطية، *C.albicnas*

Summary:
In the current study , it was highlighted to find out the inhibitory effect of the alcoholic extract of pomegranate peels against *Candida albicans* isolated from mouth area and around teeth through the period from the first of October of 2015 until the first of June of 2016. Different concentration of alcoholic extract of pomegranate peels were tested on the Yeast *C.albicans* by well diffusion method and microdilution method . The results showed that concentration(150 , 100 , 50 , 25 , 12.5) mg/ ml of the crude extract gave inhibition zone diameter rates(22 , 19.33 , 15.5 , 13.97 , 9) respectively, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was (12.5) mg/ml against the yeast cells. From the current study , we concluded that, the high efficiency of alcoholic extract of Pomegranate against the yeast *C.albicans*, suggesting the possibility of its use as a treatment for patients with Candidiasis .
Key words:*Punica granatum L.*,Antifungal activity,*Candida albicans*

المقدمة :

استخدم الرمان *Punica granatum L.* الذي ينتمي إلى عائلة Punicaceae على مدى قرون لمعالجة مختلف الامراض في الهند واسيا حيث عُرف بفعاليته الحيوية كمضاد اكسدة Antioxidant ، ومضاد للسرطان Anticarcinogenic ، ومضاد للالتهابات Antiinflamation، ومضاد للبكتريا Antibacterial، ومضاد للفطريات Antifungal.(2,1) وذلك لأحتواء الرمان على العديد من المركبات الفعالة (التانينات Tannins، الفينولات Phenols ، الفلويدات Alkalaids، الفلافونات Flavonoids ، gallic acids ، Ellagic acids)، واظهرت هذه المركبات فاعليتها كمضادات للبكتريا ومضادات اكسدة.(6,5,4,3)

وتمثل قشور الرمان (PGP) 50% من الوزن الكلي لفاكهة الرمان فقد استخدم هذا الجزء غير الصالح للأكل من فاكهة الرمان على نطاق واسع في الطب الشعبي Folk Medicine (7)، لاحتواءه على الكثير من المواد الفعالة التي لها دور مضاد للبكتريا وللفطريات . (8) .

عرف الرمان بفعاليته العالية كمضاد للجراثيم، فقد بين(9) امتلاك مركب قشور الرمان Punicalagin فعالية مضادة ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Psedoumonas aeruginosa* ، وقد بين (10) بأن مستخلص قشور الرمان يمتلك فعالية عالية ضد العديد من بكتريا التيفوئيد *Salmonella typhi* .

استخدم (11) المستخلص الايثانولي ضد بكتريا *E.* coli، وتوصل (12) إلى نتائج جيدة عند اختبار فعالية مستخلص الرمان للسيطرة على قابلية مختلف الجراثيم الموجودة في التجويف الفمي على الالتصاق ، حيث بينوا فعاليته العالية ضد التصاقية بكتريا

Streptococcus mutans ، *Streptococcus mitis* ، *Streptococci* strains وخميرة *C.albicans* . و اشار (13) الى فعالية الرمان كمضاد للفطريات Antifungal في دراسته على الفطر *Candida albicans*.

تعد خميرة *C.albicans* من الكائنات الدقيقة التي تتواجد بصورة طبيعية على الجلد و الاغشية المخاطية في الافراد الاصحاء (14) . و على الرغم من ذلك فان لهذه الفطريات الانتهازيةOpportunistic fung ، القدرة على ان تسبب ما يعرف بداء المبيضات (Candidiasis) لما يقرب 30-50 % من الاشخاص الاصحاء بالعالم (16,15)و بالامكان ان يتطور داء المبيضات من اصابة سطحية (Superficial infection) في الاصحاء الى اصابة تهدد حياة الافراد كما في الاشخاص قليلي المناعة(immunocompromised).(14) .

في الدراسة الحالية استخدم المستخلص الكحولي Ethanolic Extract لقشور الرمان Peel PGP *P.granatum* بهدف تقدير فعاليته على خلايا خميرة *C.albicans*.

طرائق العمل

جمع العينات : تم جمع 62 عينة من منطقة الفم وما حول الاسنان من المرضى في مستشفى المسيب العام – محافظة بابل-مختبر الاحياء المجهرية للفترة الزمنية من الاول لشهر تشرين الاول للعام 2015 ولغاية الاول من شهر حزيران للعام2016 بواسطة مسحات قطنية معقمة Sterile Swabs . وشخصت31 عزلة من خميرة *C.albicans* ،وتم اختيار 3عزلات من الخميرة بهدف اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان.

تحضير المستخلص الكحولي لقشور الرمان

جمعت قشور الرمان *Pomagranate Peels* بعد فصلها من فاكهة الرمان وغسلت وجففت بدرجة حرارة الغرفة (25 مْ) ثم طحنت بالطاحونة الكهربائية . واستخدم جهاز الساكسوليت (Soxhlet Apparatues) للحصول على المستخلص الكحولي (الايثانولي) لقشور الرمان حيث وضع 50 غم من باودر قشور الرمان في غرفة thimble الخاصة بجهاز الساكسوليت (randome وشغل الجهاز بدرجة حرارة لا تتجاوز 40 مْ ، وانتهت عملية الاستخلاص عندما اصبح لون المذيب لا لون له Colorless عند خروجه من Thimble واستغرقت عملية الاستخلاص لما يقرب اربع ساعات .وجفف المستخلص بشكل باودر وذلك باستخدام جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator بدرجة حرارة لا تتجاوز 40 مْ ، وحفظ المستخلص المركز(الباودر) في اكياس بولي اثيلين بدرجة 4 مْ لحين تحضير تراكيز مختلفة منه .تم تحضير تراكيز المستخلص الكحولي لقشور الرمان وذلك بوزن 1.5 غم من مسحوق المستخلص المحضر مسبقًا (باودر قشور الرمان) واضيف له 10 مل من كحول الاثيل بتركيز %) (70 للحصول على المحلول الخزين (Stock Solution) بتركيز 150 ملغم / مل ،ومنه(المحلول الخزين)حضرت التراكيز(150,100,50,25,12.5)ملغم/مل لاختبار الفعالية التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (18,17)

تم اختبار حساسية خميرة *C.albicans* للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) باستخدام طريقة الانتشار بالحفر Well diffusion method كما في الخطوات التالية:

1-اللقاح الفطري Fungal inocula

مزجت عدد من مستعمرات خميرة *C.albicans* مع 5 مل من المحلول الفسيولوجي وتم مطابقة عكورة العالق مع عكورة محلول مكفرلاند القياسي (0.5) .

2- غطست ماسحات قطنية معقمة في العالق الفطري ثم خطط سطح الآكار (مولر هنتون MH + 2 % كلوكوز + 0.5 غم / لتر صبغة ازرق اليمثلين) بالعالق وتركت الاطباق لمدة 15 دقيقة لامتصاص المزيج من قبل الآكار .

3- تم عمل عدد من الحفر في كل طبق بقطر (6 mm) بواسطة ثاقب فليني معقم .

4- وضع في كل حفرة 50 مايكروليتر من كل التراكيز المختلفة (12.5, 25,50, 100, 150) ملغم / مل واستخدم المذيب (كحول الاثيل 70 %) ليمثل سيطرة سالبة Negative Control ، في حين استخدم المضاد الفطري النيستاتين (Nystatin (Nys 100,000 وحدة دولية (IU) كسيطرة موجبة Positive Control .

5- بعد مدة حضانة 48 ساعة وبدرجة حرارة 37 مْ قرأت اقطار المناطق التثبيطية Diameter of Inhibition Zones (DIZ) (19) .

وتم تحديد التركيز المثبط الادنى(MIC)بطريقة Microdilution methodالمعتمدة من قبل (20)، كما في الخطوات التالية :

1- حضر العالق الفطري لخميرة *C.albicans* باستخدام وسط RPMI – 1640 media وتم مطابقة عكورة العالق مع عكورة محلول مكفرلاند القياسي (0.5) والتي تعادل (1.5×10^6) خلية / مل .

2- استعملت 8 انابيب رقمت من 1- 8 واضيف اليها 1 مل من وسط RPMI- 1640 .

3- لتحضير المحلول الخزين Stock Solution من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) أُذيب 1.5 غم منه في 10 مل من كحول الاثيل بتركيز(70 %) للحصول على تركيز نهائي 150ملغم / مل ثم حضرت سلسلة من التخافيف النصفية(3.12,6.25,12.5,25,50,100,150) ملغم / مل للمستخلص الكحولي باستخدام الوسط RPMI- 1640 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 وأخر 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 (.Nys) 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 والذي يمثل أقل تركيز من المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) لم يلاحظ فيه نموًا لخميرة *C.albicans* مرئيًا .

النتائج والمناقشة

طريقة الانتشار بالحفز Well Diffusion Method

يوضح الجدول (1) معدلات الاقطار التثبيطية Inhibition Zone Diameters (IZD) مقاسة بوحدات (mm) المليمتر للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة *C.albicans* ، كما بينت النتائج بأن معدلات المناطق التثبيطية تراوحت ما بين (9 – 22) مليمتر مما يدل على انخفاض معنوي $P\leq 0.05$ في اعداد خلايا خميرة *C.*albicans مقارنة بالسيطرة (النيستاتين وكحول الاثيل) وهذا يدل على أن جميع عزلات خميرة *C.albicans* حساسة للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) .

جدول (1) معدلات الاقطار التثبيطية (IZD) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة *C.albicans* بطريقة الانتشار بالحفر .

التراكيز بوحدات ملغم / مل	معدلات الاقطار التثبيطية (mm)
150	22
100	19.33
50	15.5
25	13.97
12.5	9
Control $^{-}$ **(** Nys .**)**	8.67
Control $^{+}$ **(** Chol **)**	5.33

قيمة.L.S.D(0.5)=1.9271

.Nys : المضاد الفطري النيستاتين Nystatin 100.000 وحدة دولية .

Cohol : كحول الاثيل بتركيز 70 % .

اعطت التراكيز (12.5, , 25 , 50 , 100 , 150) ملغم / مل معدلات الاقطار التثبيطية(22,19.33,15.5,13.97,9) على الترتيب .

ونستنتج من ذلك بأنه كلما زاد تركيز المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) كلما كبر قطر المنطقة التثبيطية ، مما يدل على التأثير الطردي الفعال للمستخلص الكحولي لقشور الرمان كمثبط لخميرة *C.albicans* ، وهذه النتائج تتفق مع نتائج (21) في الحصول على اقطار تبثيطية بمعدل (16 , 19 , 21 , 25 , 28) مليمتر للتراكيز (1% , 3% , 5 % , 7 % , 9%) على التوالي أي كلما زاد التركيز زاد معدل الاقطار التثبيطية، كما اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع النتائج التي توصل إليها (22) في أن المستخلص الكحولي لقشور الرمان هو المضاد الفطري الامثل ضد خميرة *C.albicans* ، في حين أن النتائج التي تم التوصل إليها لم تتفق لما توصل إليه (23)حيث بينوا بأنه لا يوجد تأثير مثبط للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة *C.albicans* فقد كانت معدلات الاقطار التثبيطية (6 ,6.5 , 6.5)مليمتر للتراكيز (4 , 8 , 12) ملغم / مل على التوالي وقد عزى ذلك إلى أن التأثير الميكانيكي للتانينات الموجودة في الرمان غير واضحة وأن فعاليتها يمكن أن يكون لها علاقة بسميتها أو قابلية الدواء القابضة أو التركيب الجزيئي لها.

وتعود كفاءة المستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) التثبيطية لخلايا خميرة *C.albicans* إلى احتواء قشور الرمان على مركبات فعالة عديدة لها دور مضاد للمايكروبات (البكتريا والفطريات) . (8) ، ويمكن أن يكون السبب في التأثير التثبيطي لقشور الرمان إلى احتواءها على مركبات متعدد الفينولات Polyphenols التي من الممكن أن تتداخل مع خلايا خميرة *C.albicans* الا أن التراكيز المطلوبة لأثبات فعاليتها التثبيطية للفطريات داخل الخلايا غير معروفة . (25,24) ، كما أن للفينولات القدرة على اقتناص الايونات المعدنية اللازمة لنمو الفطريات بواسطة Metalloproteases وخاصة ايون الحديد Fe^{+2} . (26) ، بالإضافة إلى قدرتها على تغيير صلابة الغشاء الخلوي لتتمكن هذه الجزئيات من الدخول إلى الطبقة الدهنية الثنائية للجدار الخلوي للفطريات (27) ، وحال دخولها ستسبب تغيرًا في نفاذية الجدار الخلوي للأيونات مؤدية إلى موت الخلية . (25) ، ومن المحتمل أن يكون التأثير التثبيطي للفينولات من خلال امتصاصها بواسطة الغشاء الخلوي ، التفاعل مع الانزيمات والايونات المعدنية . (28) ، كما أن التأثير التثبيطي المستخلص الكحولي لقشور الرمان يمكن أن يعود إلى احتواء القشور على مركبات Punicalains و Ellagitannin حيث اظهرت قدرتها على قنص الحديد المحفز لتفاعلات الأكسدة داخل الخلية المايكروبية(30,29) وللتانينات التي تحتويها قشور الرمان دورًا في ترسيب البروتينات الموجودة في الجدار الخلوي للأنواع المختلفة لخميرة الكانديدا .*Candida spp* ، بالإضافة إلى قدرتها على زعزعة الاستقرار في السايتوبلازم والغشاء البلازمي

وتثبيط الانزيمات الخارج خلوية الضرورية للأيض الخلوي والنقص الحاصل في المواد الغذائية اللازمة لنمو المايكروبات ما هي الا بعض الاليات التي تبين قدرة مركبات التانينات للقضاء على مختلف انواع المسببات المرضية (32,31,22) .

تحديد التركيز المثبط الادنى (MIC) للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (PGP) ضد خميرة *C.albicans*

استخدمت مجموعة التراكيز (150 , 100 , 50 , 25 , 12.5 , 6.25 , 3.123) ملغم / مل لحساب MIC بطريقة Micordilution Methed ، وكان التركيز (12.5) ملغم / مل هو اقل تركيز مثبط لخلايا خميرة *C.albicans .* (جدول2)

جدول (2): التركيز المثبط الادنى MIC للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خميرة *C.albicans*

التركيز ملغم / مل	نتيجة التثبيط
3.125	+
6.25	+
12.5	-
25	-
50	-
100	-
150	-

+ : تعني وجود نمو .

- : تعني عدم وجود نمو .

توافقت هذه النتائج مع (33)حيث سجلوا تركيز مثبط ادنى للمستخلص الكحولي لقشور الرمان (12.5) ملغم / مل، وكذلك توافقت مع(34) , ، اللذين اوضحا بأن نتائج المستخلص النباتي الخام يحتوي على العدد من المركبات الفعالة التي تعمل على تثبيط الفطريات والبكتريا من خلال ميكانيكيات مختلفة ، كما أن النواتج الايضية المختلفة في النبات مثل كاروتينات ، فلافونات ، فيتامينات ، فلويدات ، والصبغات لها تأثير حيوي وربما تمتلك آليات مقاومة مثل تثبيط الفعالية الانزيمية ، تحوير المواقع الفعالة وتقليل تراكم المواد بين الخلوية . (35)

إن انخفاض القيمة الخاصة بتركيز (MIC) للمستخلص النباتي يشير إلى مدى الفعالية العالية للمستخلص النباتي ضد خميرة *C.albicans* وهذا ما أكده (36) ، .ان احتواء قشور الرمان على تراكيز عالية من مركبات (Punicalagin بالإضافة إلى التانينات مثل Pedunculagin و Tellimagrandin و Gallagyldilacton و Panicalin) تجعل من الرمان كمضاد فطري فعال ضد انواع خميرة الكانديدا *Candida spp.* ، فقد اظهر المستخلص الايثانولي لقشور الرمان تداخلًا مع تركيب خلية الخميرة مما ادى إلى تغير في الجدار الخلوي الذي اصبح اكثر سمكًا ومشوه مع تغير في الغشاء البلازمي . (13) ، وافترض (37) آليات مختلفة لتوضح فعالية التانينات ضد المايكروبات والتي تضمنت تثبيط الانزيمات ، تقليل من المواد الغذائية والايونات المعدنية اللازمة لنمو المايكروبات وتثبيط عملية الفسفرة التأكسدية وبالتالي تثبيط عمليات الايض الخلوي ، في حين افترض (38) بإمكانية التانينات من تكوين معقدات مع جزيئات اخرى والتي تتضمن الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات والسكريات المتعددة.

الاستنتاجات

من الدراسة الحالية نستنتج بأن المستخلص الكحولي(الايثانولي) لقشور الرمان ذو فعالية عالية وتأثير مثبط عالي ضد خميرة ***C.albicans*** المعزولة من منطقة الفم وما حول الاسنان.

المصادر

1- Das , A. K.; Mandal S. C.; Banerjee , S. K.; Sinha , S.; Das, J.; Saha, B. P. and Pal , M.(1999) studies on antidiarrhoel activity of ***Punica granatum*** seed extract in rats. ***J. Ethenopharmacol .*** 68 :205-208 .

2- Seeram , N. P.; Adams , L. S.; Henning , S. M.; Niu , Y.; Nair, M. G. and Heber , D. (2005). In Vitro antiprolifirative apoptotic and antioxidant activities of Punicalagin , ellagic acid and a total Pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in Pomegranate juice ***. J. Nutr. Biochem.*** 16 : 360 - 367.

3- Abdel Motaal, A. and sheriff, S.(2011) .Anticanser and antioxidant Activities of standardized whole Fruit , Pulp , and Peel Extract of Egyptian Pomegranate ***.Open . Conf . Proc . J****. 2:*41 – 45.

4- Gile , M. L.; Tomas - Barberan , F. A. ; Hess - Pirece , B.; Holcroft , D.M. and Kader,A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and its relationship with phenolic composition and Processing . ***J. Agric. Food. Chem.*** 45 : 4581 - 4589 .

5- Fetrow, C.W. and Avila, J. R.(2000). Medicina Alternitive pava oprofissional.***Guanabara Koogan Rio de Janiro*** . : 590 - 92 .

6- Mansour, E.; Ben Khaled, A.; Lachiheb, B.; Abiod, M.; Bachar, K. H. and Ferchich , A.(2013). Phenolic Compounds , Antioxidant and Antibacterial activities of Peel Extract from Tunisian Pomegranate . ***J. Agr. Sci. Tech.*** 15 : 1393 - 1403.

7- Reddy , M. K.; Gupta , S. K.; Jacob M. R.; Khan , S. I. and Ferreira, D. (2007). Antioxidant , antimalarial and antimicrobial activities of tannin - rich fractions , ellagitannins and Phenolic acids from ***Punica granatume L.*** Plant . ***Med.*** 73 : 461 - 467.

8- Ahmed,N.H. .;Abood,S.A and AL- Janabi,A.A.(2013).Antimicrobil Effect of Pomegranate peel Extract on some pathogenic Microorganisms.*Eng.and Tech.J.*31(3):316-324.

9- Burapadaja , S. and Bunchoo , A.(1995). Antimicrobial activity of tannins from Terminalia citrine . ***Planta . Medica.*** 61 : 365 .

10- Perez , C. and Ansini , C. (1994). In vitro antibacterial activity of Argentine folkmedicinal Plants against ***Balmonella typhi. J. Ethnopharm.*** 44 : 41 - 46.

11- Voravu thikunchai , S.; Lortheeranumat , A.; Jeeju , W.; Srivirak , T.; Phongpaichit , S. and Supawita , T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemrrhagic ***Escherichia coli*** 0157 : H 7. ***J. Ethnopharm*** . 94 : 49 - 54.

12- Vascnelos, L.C.; Sampaio, F.C.; Sampaio. M. C.; Pereiramdo,S.; Higino, J. S.and Peixoto, M. H.(2006). Minimum inhibitory concentration of adherence of ***Punica granatum Linn*** (Pomegranate) gel aginst ***S. mutans , S. mitis*** and ***C.albicans. Brazil. Den. J.*** 17 (3) : 223 - 227.

13- Anibal, P.C.; activity Peixoto , I.T.A.; Foglio , M.A. and Hofling , J.F. (2012) . Antifungal activity of the ethanolic extracts of ***Punica granatum L***. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the Cells of ***Candida SPP . Brazil. J microbial*** . 44(3) : 839 – 848 .

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

15- Zuluaga , A.; DeBedout , C. Restrepo . C. A.; Parra , H. H.; Arteaga, M. A. and Restrepo , A. (2012). Suceptibility to fluconazole and voriconazole of ***Candida species*** isolated from intensive care units Patients in Medellin , Colombia (2001 - 2007). ***Rev. Iberoam. Micol.*** (27) : 125 - 9.

16- Coretas, 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.

17- الدعمي ، علاء عبد الحسين كريم (2014) . تنقية وتوصيف حامض الكوجك المنتج من عزلتين محليتين (*Aspergillus flavus*و *Aspergillus fumigates*) اطروحة دكتوراه ، كلية التربية ، جامعة القادسية .

18- Wang , L. ; Weller , C. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants . ***Trends in Food Sci. Technol.*** 17 (6) : 300 - 312.

19- 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 .

20- 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.***

21- Pai , Vasudha , Chanu , T. R.; Chakraborty , R. ; Ragu , B.; Lobo , R. and Ballal , M.(2011). Evaluation of the antimicrobial activity of ***Punica granatum*** Peel against the enteric pathogens: An in vitro study . ***Asian J. Plant Sci. Res.*** 1 (2) :57 - 62.

22- Vasconcelos , L.; Sampaio , M.; Sampaio , F. and Hingino , J.(2003). Use of ***Punica granatum Linn*** as antifnngal agent against candidosis associated with denture stomatitis . ***Mycoses*** . 46 : 192 - 196.

23- Abdollahzadeh , S. ; Mashouf , R. ; Mortazavi , H. ; Moghaddam , M. ; Roozbahani , N. and Vahedi , M. (2011) .***J. Den . Techran University of Med . Sci*** . 8 (1)

24- Havsteen , B. H. (2002). The Biochemistry and medical significance of the flavonoids . ***Pharmacol. Therapeut .*** 96 : 67 – 2002 .

25- Cushnie , T. P. T and Lamb , A. J. (2005) . Review : Antimicrobial activity of flavonoids . Internet .***J. Antimicrobial Agents.*** 26:343-356.

26- Yordanov , M.; Dimitrova , P.; Patkar , S.; Saso , L. and Ivanovska , N.(2008). Inhibition of ***Candida albicans*** extracellular enzyme activity by selected natural substances and their application in ***Candida*** infection . ***Candidian J. Microbiol .*** 54 : 435 – 440 .

27- Saija , A.; Scalese , M.; Lanza , M. ; Marzaullo. D.; Bonina , F, and Castelli , f. (1995). Flavonoids as antioxidant against : importance of their interaction with biomemrbranes . free Radic. ***Biol. Med.*** 19 : 481 - 486.

28- Lamar , A. S.; Fonseca , G.; Fuentes , J. Cozzi , R.; Cundavi , E.; Fiore , M.; Ricody , R.; Perticone , P.; Degrassi , F. and Salvia , R. (2008). Assessment of the genotoxic risk of ***Punica granatum L.*** (Punicaceae) whole fruit extracts . J. Ethnopharmacol . 115: 416-422.

29- Kulkarni , A. P; Mahal , H. S.; Kapoor , S. and Aradhya , S. W. (2007). In Vita studies on the binding , antioxidant and cytotoxic action of punicalagin . ***J. Agricul .*** and ***Food Chemist*** . 55 (4) : 1491 - 1500.

30- Endo , E. H.; Cortez , D. A. G.; Ueda – Nakamura , T.; Nakamura , C.V. and filho , B.P.D. (2010) . Potent Antifungal of Extracts and pure compound Isolated from Pomegranate peels and Synergism with Fluconazole against ***Candida albicans . Res.Microbial .***161(7):534-540.

31- Puupponen - Pimia , R.; Nohynek , L.; Alkomi , H. and oksman Caldontey , K. (2004). Bioactive berry compounds novel tools against human Pathogens . ***Appl. Microbiol. Biotechnol*** . 67 : 8 - 18.

32- Ikigai , H.; Nakae , T.; Hara , Y. and Shimamura , T. (1993). Bactericidal Catechins damage the lipid Bilayer . ***Biochem . Biophsic . Acta .*** 1147 : 132 - 136 .

33- El-Kichaoi , A.; El-Hindi , M.; Mosleh , F. and Elbashiti , T. (2015). The Antimicrobial Effects of the Fruit Extracts of ***Punica granatum*** , Actinidia deliciosa and Citrus maxima on some Human Pathogenic Microorganisms . 3 (2) : 63 - 75 .

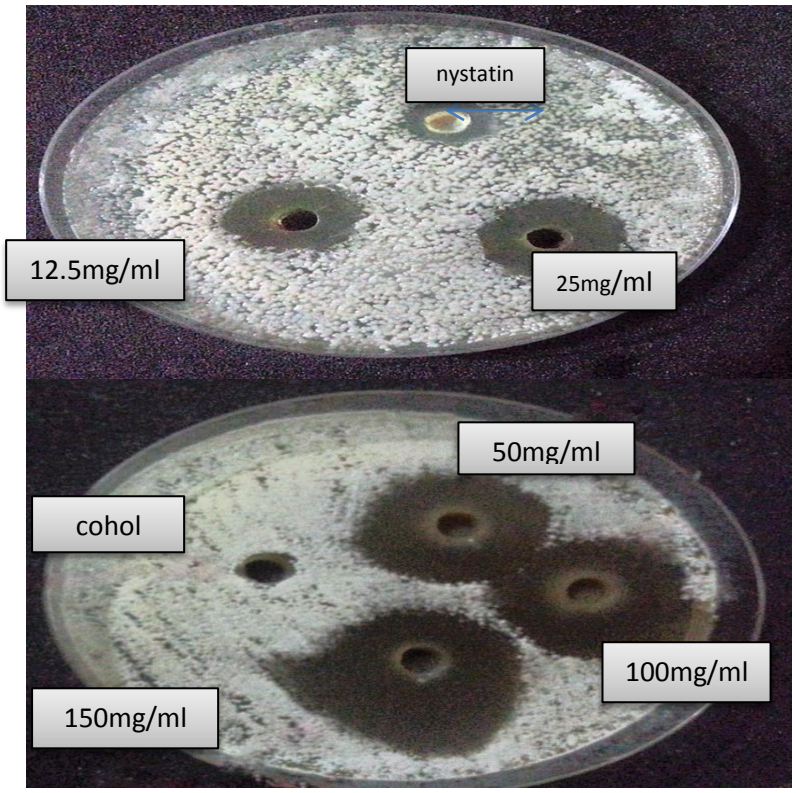
34- Adwan , G. and Mhanna , M. (2008) . Synergistic effects of Plant extracts and antibiotics on ***staphylococcus aureus*** strains isolated from Clinical specimens . Middle - East ***J . Sci*** . *Res.* 3 (3) *:* 134 -139 .

35- Abeysinghe , P.and Weeraddana , D. (2000) . Screening of Petroleum ether , chloroform , E thy lacetate , Ethanol and water Extracts of Medicinal plant . Avicenna marine for Antibacterial Activity against Antibiotic Resistance Bacteria species ***staphylococcus*** and ***Proteus .J. Pharm . Biomed .*****Scill** (18) : 2230 - 7885 .

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

37- Scalbert , A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. ***Chem.*** 30 : 3875 - 3883.

38- Haslam , E. (1996). Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs : possibl models of action . ***J. Nat. Prod.*** 59 : 205 - 215 .



صورة (**1**) الاقطار التثبيطية للمستخلص الكحولي لقشور الرمان ضد خلايا خميرة *C.albicans*