دراسة الفعالية التثبيطية لبعض المستخلصات العضوية لنبات سرطان الثيل تجاه بكتريا الزوائف الزنجارية والمكورات العنقودية الذهبية خارج الجسم الحي

رنا طالب محسن
كلية الطب / جامعة الانبار

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة لتقيم الفعالية التثبيطية لمستخلصات المذيبات العضوية لنبات *Euphorbia prostrate* تجاه نمو بكتريا الزوائف الزنجارية والمكورات العنقودية الذهبية ومقارنتها ببعض المضادات الحيوية وكانت نتائج الاختبار للمستخلص الكحولي عالية الكفاءة في تثبيط نمو بكتريا المكورات العنقودية الذهبية وبتركيز 50mg/ml أما بكتريا *pseudomonas aeruginosa* فبدأ التثبيط عند التركيز 70mg/ml .

كما بينت النتائج إن مستخلص الهكسان لم يؤثر في إي من جنسي البكتريا ،من جانب أخر كان لمستخلص خلات الاثيل تأثيرا تثبيطاً في بكتريا *Staphylococcus aureus* بتركيز 70mg/ml وفي بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ضمن تركيز 90mg/ml .

وعند مقارنة فعالية المستخلصات العضوية الثلاثة في تثبيط نمو بكتريا الاختبار مع المضادات الحيوية ،وجد تماثل في درجة التثبيط مع المضادات أو تفوقاً على البعض الأخر.

Studying the effect of organic solvent extracts for *Euphorbia prostrata* against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro

Rana Talib AL-Ani,
Medicine College / AL_Anbar Univ.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the biological activity of organic solvent extracts of *Euphorbia prostrate* on growth inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* and compare them with several antibiotics. The results of testing alcohol extracts showed high efficiency in inhibition of growth of *S. aureus* in concentration of 50mg/ml , but for *P. aeruginosa* , growth inhibition began at 70mg/ml. Results also showed that hexane extract had no effect on both bacteria. on the other hand, Ethyl acetate extract had inhibitive effects on *S. aureus* at 70mg/ml and on *P. aeruginosa* at 90mg/ml. When the activity of the three organic extracts on inhibition of test bacteria were compared with several antibiotics, identity of inhibition degree was found between them and even superiority on some others

المقدمة

يعود نبات سرطان الثيل (*E .prostrata*) الى عائلة أم الحليب Euphorbiaceae التي تمتاز بإنتاجها لعصير حليبي Milk work في العراق يتواجد هذا النبات من الجنوب حتى الشمال ،خاصة في الحدائق العامة و في الثيل والإعشاب وغيرها ، كذلك يتواجد في المناطق الاستوائية الحارة ،ويتصف هذا الجنس بامتلاكه أوراقا صغيرة وساقا خشبيا (1). تكون اغلب أنواع *Eaphorbia spp.* سمية لذلك استخدمت في العلاجات الطبية حيث ان جنس *E. resinifera* دواء يسمى Euphorbium والذي يستعمل كمطهر شديد الفعالية لقدرته على قتل الميكروبات الملوثة .إما جنس *E. neriifolia* فيمتاز بسميته العالية وتزداد هذه السمية بزيادة الغليان لذلك تم استخدام المادة الحليبية لعلاج الروماتزم والضعف العام وألام الأسنان ،وقد كان الشعب الصيني يستخدم المادة الحليبية لعلاج الإمراض أعلاه (3,2)، إما الجنس *E .antiquorurn* فقد تم استخدامه منذ القدم في حفظ اللحوم وذلك بتغطيسها في المستخلص المائي الحار للنبات حيث إن سميته تزداد ضد الميكروبات الملوثة للحوم.

وعلى أساس الفعالية العالية لهذا النبات فقد درس تأثير مستخلصه المذاب ضمن مذيبات عضوية تجاه نوعي من البكتريا :

المكورات العنقودية الذهبية*Staphylococcus aureus* :

يبلغ قطر الخلية حوالي 1µm تتجمع بهيأة عناقيد grape like مستعمراتها بعد الحضن الهوائي تكون دائرية ناعمة مرتفعة ولماعة ، اما في الظروف اللاهوائية الاختيارية ،درجة الحرارة المثلى للنمو هي 37^0C و7.6-7.4=ph (5,4) . تمتلك بكتريا المكورات العنقودية عوامل ضراوة تساعدها في أحاث الامراضية وتتضمن protein-A الذي يرتبط تساهمياً بطبقة ببتيدوكلايكان. بعض العزلات تحتوي على كبسولة والتي تتكون من glucosaminuronic acid وتفقد هذه الكبسولة خلال الزرع .تمتلك المكورات العنقودية الذهبية القدرة على أنتاج أنزيمات Proteinase Hyaleurondase , Nuclease , phosphatase ,Fibrinolysin coagulase(6). وتعد بكتريا *S. aureus* من الأحياء المجهرية ذات الأهمية الطبية والصحية وذلك لقدراتها على إنتاج العديد من عوامل الضراوة والتي تمكنها من اختراق الجسم والقدرة على توليد خمج infection ومقاومة العديد من المضادات (7).

بكتريا الزوائف الزنجارية *pseudomonas aeruginosa*

بكتريا عصوية سالبة لصبغة غرام ،هوائية إجبارية منتجة للصبغات مثل البايوسيانين (pyocyanin) والفلورسين (8).هذه البكتريا رمية التغذية ولا تحتاج لمواد غذائية معقدة وتستطيع التكاثر في البيئات الرطبة فضلا على كونها من المسببات للاخماج الثانوية secondary infection في المرضى الراقدين في المستشفيات مما أعطى لها أهمية في الدراسات البكتريولوجية حيث يتعرض هؤلاء المرضى الى العمليات الجراحية وعمليات نقل الدم وبعض الحالات التي تستوجب ثقب القصبة الهواية وغيرها من الحالات التي تسهل عملية دخول البكتريا الى جسم المريض ومن ثم حدوث خمج (11,10,9) .

المواد و طرق العمل

1-جمع عينات نبات *Euphorbia prostrata*

جمعت العينات النباتية قيد الدراسة من مناطق مختلفة في محافظتي الانبار والموصل ونقلت إلى المختبر ونظفت من الشوائب ثم غسلت وتركت حتى تجف وأجريت عليها عملية التقليب المستمر لمنع حدوث التعفن وبعدها طحنت العينة بواسطة طاحونة كهربائية للحصول على مسحوق الذي وضع في أكياس نايلون جافة وحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال وتم تشخيص النبات عن طريق معشب كلية العلوم –جامعة الموصل. وتم الحصول على العزلات البكتيرية من مختبر الصحة المركزي بعد التأكد منها وتم إجراء اختبارات تشخيصية للتأكد من أجناسها.

2- تحضير المزروع البكتيري

لغرض تحضير العالق البكتيري تم تنشيط البكتريا بعمل مستنبت جديد على وسط الأكار المغذي وحضنت لمدة 18–24 ساعة بدرجة 37^0C بعدها نقلت 3–4 مستعمرات الى انابيب اختبار تحتوي 4مل من المرق المغذي Nutrient broth وحضنت لمدة 4–5 ساعات بدرجة 37^0C بعدها تم معادلة العالق البكتيري بواسطة المحلول الملحي الفسيولوجي Normal Saline (يحضر بإذابة 0.85غم من كلوريد الصوديوم في 100مل من الماء المقطر) للحصول على عكورة مساوية لعكورة انبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 المستعملة في اجراء اختبار الحساسية .

3-إدامة المزروع النقي

اديمت المزارع البكتيرية بعمل مستنبت جديد Sub culturing كل 4–6 أسابيع على وسط الأكار المغذي وحضن بدرجة حرارة 37^0C لمدة 24 ساعة حفظت العزلات في الثلاجة بدرجة 4^0C ولغرض الحفظ الطويل الأمد ينقل النمو البكتيري بعمر 24-18 ساعة إلى وسط مرق نقيع المخ والقلب Brain heart infusion broth ويضاف 5% من الكليسرول ويحفظ بدرجة $20C^0$ - .

4-تحضير مستخلصات المذيبات العضوية

تم تحضير مستخلص المذيبات العضوية لمسحوق نبات *Euphorbia prostrata* الجاف بحسب طريقة (12) .حيث تم اختبار ثلاثة مذيبات عضوية مختلفة القطبية وهي الكحول الأثيلي (Ethyl Alcohol) كمذيب قطبي وخلات الأثيل(Ethyl acetate) كمذيب متوسط القطبية والهكسان(n-Hexane) كمذيب لا قطبي (13) ،أخذت 10 غم من مسحوق المادة الجافة للنبات وتم استخلاص المواد منها بصورة متتابعة بجهاز الاستخلاص (Soxhelt) بواسطة 200مل من كل مذيب ولمدة 24 ساعة بعد ذلك تم تركيز المادة المستخلصة بالمبخر الدوار بدرجة حرارة $40-45^0C$ ومن ثم جففت بواسطة oven وبدرجة حرارة 40^0C لغرض تحضير التراكيز المستعملة في التجربة ولغرض اختبار الفعالية التثبيطية لمستخلص المذيبات العضوية تجاه بكتريا الاختبار تم تحضير محلول خزين Stock Solution لمستخلص المذيبات العضوية (14)

أ.مستخلص الكحول الأثيلي :اخذ 1غم من المستخلص الجاف وأذيب في 2 مل من الكحول الأثيلي 99% ومن ثم أكمل الحجم الى 10مل بواسطة الماء المقطر ،اما بالنسبة للسيطرة فيتكون من 2 مل كحول اثيلي واكمل الحجم بالماء المقطر الى 10 مل.

ب.مستخلص الهكسان : اخذ 1غم من المستخلص الجاف وأذيب في 1مل هكسان ومن ثم أذيب في 1مل كحول اثيلي 99% و أكمل الحجم بالماء المقطر الى 10مل وأنبوب السيطرة تكون من 1مل هكسان مع 1مل كحول اثيلي وقد أكمل الحجم بالماء المقطر الى 10مل

ج. مستخلص خلات الاثيل: اخذ 1غم من المستخلص الجاف وأذيب في 1مل خلات الاثيل ومن ثم اذيب في 1مل كحول اثيلي 99% و أكمل الحجم بالماء المقطر الى 10مل والسيطرة شملت 1مل خلات الاثيل مع 1مل كحول اثيلي 99% واكمل الحجم الى 10مل.

5-اختبار الفعالية التضادية للمستخلصات النباتية خارج الجسم الحي

اتبعت طريق الانتشار في الأكار Agar diffusion method بواسطة الحفر wells **(15)** في اختبار حساسية البكتريا للمستخلصات النباتية وتتضمنت الطريقة عمل 4 مل حفر بابعاد متساوية في وسط مولر هينتون الصلب Muller Hinton agar وبقطر 8mm بواسطة الثاقب الفيليني cork borer لأحتواء محاليل النباتات بمقدار 0.4 مل لكل حفرة بعد نشر 0.1 مل من العالق البكتيري على الوسط ومن ثم تتركت الأطباق في الثلاجة لمدة 24ساعة لأنتشار محاليل النباتات في الوسط الزرعي (16) ثم حضنت بدرجة 37^0C مدة 24-18 ساعة ، وقرأت النتيجة بقياس قطر منطقة التثبيط Inhibition Zone (17).

6-تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى minimal inhibitiory concentration (MIC)

طبقت لهذا الغرض طريقة تخفيف الأكار بالطبق Agar dilution method (Nccls ,1993) حيث تم مزج 2مل من كل تركيز للمستخلص النباتي مع 18 مل من وسط Muller Hinton الذائب في درجة حرارة 50^0C بالاضافة لطبق السيطرة الذي لايحتوي على المستخلص .ثم زرع العالق البكتيري المقارن بعكورة انبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 بواسطة مسحة قطنية Cotton Swab على الأوساط الحاوية على تراكيز المستخلص بالاضافة الى وسط السيطرة ،تركت الطباق بضع دقائق لتجف ثم حضنت بالظروف الأعتيادية.

7- محلول ماكفرلاند (انبوبة رقم 0.5) Macfarland Standard Solution :

ويتكون من :

-محلول A :وفيه تم إذابة 1.75غم من كلوريد الباريوم $BaCl_2 . H_2O$ في 100 مل من الماء المقطر

-محلول B: حُضر بإضافة 1مل من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 الى 100مل من الماء المقطر

عند الاستعمال أضيف 0.5 مل من المحلول -A- إلى 99.5 مل من محلول -B- واستعمل المحلول للمقارنة في إعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية مقداره 1.5×10^8 خلية/مل وذلك عند إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية والمستخلصات النباتية وفي تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلصات النباتية (19).

8-اختبار حساسية البكتريا للمضادات الحيوية:

استعملت مجموعة من المضادات الحيوية المجهزة من شركة Oxoid جدول (1) واتبعت طريقة انتشار المضاد على الأكار (17) حيث تم زرع وسط مولر هينتون الصلب بالمعلق البكتيري المقارن بأنبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 وتركت الأطباق مدة ربع ساعة حتى تجف بعدها وضعت أقراص المضادات الحيوية على الوسط الصلب ثم حضنت في الحاضنة بدرجة 37^0C ولمدة 24-18ساعة ،ثم قورنت النتائج مع نتائج المستخلصات النباتية ، تم استخدام مجموعة من المضادات الحيوية كما في الجدول (1) .

جدول 1. المضادات الحيوية المستخدمة

المضاد الحيوي وتركيزه µg/Disc	الرمز	الشركة المجهزة ومنشأها
Cloxacilin (5µg)	OB	Oxoid (England)
Chloramphenicol (30µg)	C	Oxoid (England)
Penicillin (10µg)	P	Oxoid (England)
Gentamycin (100µg)	CAR	Oxoid (England)
Refadin (30µg)	RD	Oxoid (England)
Amoxylin (25µg)	Amo	Oxoid (England)

النتائج والمناقشة

أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها ان الفعالية التضادية وقيمة التركيز المثبط الأدنى تزداد مع زيادة تركيز المستخلص في الوسط وهذا موافق الى ما أشار إليه بعض الدراسات (16،20) ، تباينت فعالية المستخلصات بتباين المذيبات العضوية وتبعا لتغير الجنس البكتيري وكان هذا التغاير كما يلي:

أ-الفعالية التثبيطية لمستخلص Ethyl Alcohol 99% :

كان هذا المستخلص تأثير واضح تجاه بكتريا *S. aureus* أكثر منه تجاه بكتريا *P. aerginosa* حيث تأثرت*S. aureu* ضمن تركيز 50 ملغم /مل بينما *P. aeruginosa* تأثرت ضمن تركيز 70ملغم/مل كما مبين في الجدول رقم (2)

جدول 2. الفعالية البايلوجية لتراكيز مستخلص الكحول الاثيلي لجنسي البكتريا (MIC)

بكتريا الاختبار	التراكيز ملغم/مل									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
S. aureus	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
P. aerginosa	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−

+وجود نمو - تثبيط

ب-فيما يخص مستخلص الهكسان فقد كان من الملاحظ إن هذا المستخلص لم يظهر إي فعل تثبيطي في إي تركيز من التراكيز لكلا الجنسين ، و قد يعود سبب ذلك الى عدم نفاذية غشاء الخلية البكتيرية لهذه المواد أو عدم نجاح المستخلص في التأثير الفعال على الإنزيمات والبروتينات المتواجدة داخل الخلية البكترية والتي تعتبر من المواد الضرورية والفعالة لنمو وتكاثر البكتريا [21،22].فيما اظهرت مستخلصات خلات الاثيل فعلاً تثبيطاً

متبايناً بين الجنسين البكتيريين فقد ظهر الفعل التثبيطي في بكتريا *S. aureus* ضمن تركيز قدره 70ملغم/مل وفي بكتريا *P. aeruginosa* فلقد ظهر ضمن التركيز 90 ملغم/مل فقط كما في الجدول (3).

جدول 3.الفعالية البايلوجية لتراكيز خلات الاثيل لجنسي البكتريا (MIC)

بكتريا الاختبار	التراكيز ملغم/مل									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
S. aureus	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
P. aerginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−

تبين النتائج تبين إن هناك تغايراً واسعاً في تثبيط المستخلصات (للمذيبات العضوية الثلاثة) وأيضا تبايناً بالنسبة لجنسي البكتريا قيد الدراسة جاء هذا موافقاً لما ورد من نتائج (23،24) ، وقد يعود هذا الاختلاف في درجة تأثير أنواع المستخلصات النباتية في الأحياء المجهرية يعود الى عوامل مختلفة أهمها نوع المستخلص النباتي وطريقة الاستخلاص وكذلك نوع المذيب القطبي المستخدم .

يوضح الجدول رقم (4) يوضح نتائج فحص حساسية البكتريا لمجموعة من المضادات الحياتية المستخدمة ضمن هذه التجربة ويتضح إن البكتريا *s. aureus* الموجبة لصبغة كرام كانت أكثر حساسية للمضادات الحياتية مقارنة مع *p. aeruginosa* وقد يعود ذلك إلى الاختلاف في تركيب الغشاء الخلوي في كلا المجموعتين حيث تتصف بكتريا *S. aureas* بأنها نفاذة لمعظم المضادات الحياتية مقارنة بالسالبة لصبغة كرام . (25)

نلاحظ من الجدول رقم (4) مقاومة بكتريا *S. aureus* لبنسلين لأنها قادرة على إنتاج إنزيمات B-Lactamase التي تقوم بتحليل حلقة B-Lactamas في البنسلين ومشتقاته ومن ثم تحويل الأخير الى مركب غير فعال (26) ،اما بكتريا *p. aeruginosa* ، فقد أظهرت مقاومة لمجموعة مضادات البنسلين طبقا لما ورد في (27) ان سبب مقاومة بكتريا *p. aeruginosa* هو التغير الذي يحدث في نفاذية غشاء البكتريا وإنتاج إنزيمات B-Lactamase التي تظهر المقاومة للبنسلين (28) من خلال النتائج السابقة وجدول رقم (4) نلاحظ إن البكتريا السالبة لصبغة كرام *p. aeruginosa* كانت مقاومة لأغلب المضادات الحياتية المستخدمة وهذا مغاير لبكتريا *s. aureus* وقد يفسر ذلك بامتلاك بكتريا *P. aeruginosa* غشاء يمثل حاجزا ذاتيا ويتكون الغشاء من Lipopolysaccharid ترتبط مع بروتينات معقدة تعمل على منع مرور الكثير من المضادات الحياتية إلى داخل الخلية البكتيرية (25،29)، و قد يكون حدوث طفرات وراثية سببا في منع مرور المضادات الحياتية الى داخل الخلية (25،29،30).

جدول 4. يوضح اقطار التثبيط ب(ملم) للمضادات الحيوية المستخدمة ضد جنسي البكتريا

المضادات / البكتريا	OB	C	P	CAR	RD	AMO
S.aureus	19ملم	21 ملم	−	20 ملم	23 ملم	24 ملم
P.aeruginosa	−	−	−	17 ملم	−	−

هناك عوامل عديدة تؤثر في مدى نجاح فحص الحساسية منها كمية ونوع الوسط المستخدم في التجربة ،حيث تم استخدام وسط مولر هينتون الذي يمتاز بكونه بملاءته لنمو البكتريا قيد الدراسة وكذلك قيمة ثابت الأس الهيدروجيني التي يمكن ان تساهم في نجاح عمل المضاد الحيوي (19)، ولابد من الإشارة إلى العوامل الأخرى التي تساهم في إنجاح فحص الحساسية المتمثلة بحجم اللقاح المستعمل وظروف الحضن من حرارة ومن خلال الدراسة الحالية يلاحظ إن البكتريا قد أبدت حساسية واضحة لمجموعة المستخلصات العضوية للنبات وقد تكون اكبر عند مقارنة حساسيتها ببعض المضادات الحياتية ،حيث تأثرت ضمن تركيز 50 ملغم /مل (MIC) المستخلص العضوي (الكحول الاثيلي 99%) لبكتريا *s. aureus* عند تركيز 50 ملغم/مل ،ويمكن تفسير ذلك بكون هذه البكتريا لم تألف هذه المستخلصات من قبل لذلك لم تبدي مقاومة لها ، وهناك تفسير أخر يتمثل في أن للمواد المستخلصة ألفة كيماوية للتفاعل مع مكونات الخلية البكتيرية ولوجود مستلمات على جدار الخلية البكتيرية ونواقل مناسبة لجزيئاتها إلى داخل الخلية من اجل توقف فعل الإنزيمات المساعدة والجزيئات البايلوجية الفعالة لديها (13،14).

المصادر

1. Chakravarty, H.L. (1976). Plant Wealth of Iraq. A Dictionary of Economic Plants. Vol. 1. Botany directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

2. Townsend, C.C. & Evan Guest, (1974). Flora of Iraq. Vol. 3,Ministry of Agriculture of Iraq.

3. الشماع ،علي عبد الحسين ،(1989).العقاقير وكيمياء النباتات الطبية.دار الكتاب للطباعة والنشر– الموصل.

4.Brooks, G.F., Bultel, J.S. and Morse, S.A. (1998). Jawets Melnick &Adelberg's medical Microbiology 21th edition.Appertt and Lange, Ny.

5. Rayan , k. J ,Ray ,C.G,(2004) sherries medical microbiology (4thed.) McGraw Hill.

6. Francois ,p. and Screzel , J.(2008) "Rapid diagnosis and Typing of *Staphylococcus aureus* " . Staphylococcus : Molecular Genetics .Caister Academic Press.

7. Humphreys, H. (1997). *Staphylococcus*. Skin infection; osteomyelitis; food poisoning, foreign body infection, Medical Microbiology 5thEd. Churchil. Livingston.

8.Volum,R.L.;Jamison,D.G.and Cummins, C.S.(1970). Fairbrother's Text Book of Bcteriology,10th ed. Arnold Hwinman Pulisher. India.

9.Fiorillo,L.,Zucker,M.,Sawyer,D.(2001).the Pseudomonas hot-food syndrome. N. Engl. J. Med., 2:345(5) 335-8.

10.pollak , M., Bennrtt, J.F and Dolin , R.(2000) *Pseudomonas aeruginosa* principles and pardice of infections Diseases .5th ed. New York .Churchill Livingstone , 2310-27.

11. Todar ,k.(2004) .Text Book of Bacteriology .university of Wisconson-Madison , Department of Bacteriology .USA .

12. Ladd ,T,L, Jacobson ,M and Buriff ,C.R(1978).J. Econ-Entomol ,Vol.71,810-813

13. Harbornne ,J.B.(1984).Phytochemical Methods .A Guide to modern techniques of Plants Analysis .2nd-ed, Chapman and Hall ,Lonon,New York .

14. Mitscher ,L. A ; Len ,R, Bathala , M.S. Wu,W.N, Beal ,J.L.and Ehite ,R,(1992) Antimicrobial agents from higher plants -1-Lioydia .Vol 35(2):157-166

15. Egorove ,N.S.(1985).Antibiotics Scientific Approach. Mirpublishers ,Moscow.

16. Hernandes ,M, Lopez ,R, Abanal , R. M,Paris ,V., and Arias ,A,(1994).Antimicrobial activity of *Visnea mocanera* leaf extracts ,J. Ethnopharmacol.41:115-119.

17. Saxena ,G.Faemer ,S,Hancock ,R.E.W .and Towers ,G.H.N.(1995) Chlorochimp aphilin , A new antibiotic from moneses uniflora .J.Nat .Prod ,59:62-65 .

18.*Nccls,*National Committee Clinical Laboratory Standards (1993).Approved standard M7-A3.Methods for dilution on antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically ,Villanova ,Pa.

19. Barry ,A.L(1976) ,The Antimicrobial Susceptibility Tests :Principles and Practices , Lea and febiger-philadelphia.

20. Taylor ,R,S,L,Edel ,f., Manandhar ,N, P. and Towers ,G,H.N(1996)Antimicrobial Activity of southern Nepales medicinal plants , J. Ethan pharmacology 50:97-102.

21. Al-Jasim,H.A. and Barakat, M.M.(1973).Effect of some vegetable extracts on the activity of polygalactuorans .J. Sci. food Agric.24:119-121.

22. Dylan S.M.(2009) Extraction of glycosides ,tannins and study their biological activity of *Cucurbito maxima* ,Degree of Diploma, thesis . Collage of Science University of Al- Anbar.

23. Mahasneh,A.M.;Abas,J.A.and El-oqilah, A.A.(1996).Antimicrobial activity of extract of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain Phototherapy *Res.10:253-257.*

24 النعمان ،أدبية يونس شريف (1998) التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة. لصبغة كرام ،رسالة دكتوراه –كلية العلوم–جامعه الموصل.

25. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adeleberg, E.A., Brooks, G.E., Butel, J.S.and ornson, L.M. (1987). Review of Medical Microbiology 17th ed. Midle east. Edition. Appleton & Lange Norwalk.

26. Goodman, L.S. and Gillman, S. (1985). The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th. ed. Macmillan Publishing Co. Inc. New York, Collier Macmilan Canada Ltd. Toronto, Bailliere Tindall, London.

27. Kemoto, H.; Oguri, T.; Okada, M. (1999). Susceptibilities of bacteria isolated from patients with lower respiratory infectious diseases to antibiotics. Jpn-J. Antibiot., 52(5): 353.

28. Cole, St. and Nicolas, M.H. (1986). B- Lactam resistance mechanism in Gram negative bacteria. Microbiol. Sci. 3(11): 334-338.

29. Moor, R.A.; Bares, N.C. and Hancock, R.E.W. (1986). Interaction of poly cationic antibiotic with *Psendomonas aeruginosa*. Lipopolysaccharide and studies by using dansylpolymyxin,Antimicrob. Agents Chemother. 29(3): 496-500.

30. Gilleland, H.E., Jr. and Murray, R.C.E. (1988). Adaptive alteration in the outer membrane of Gram- negative bacteria during human infection. Car. J. Microbiol. 34: 499- 502.