



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

دراسة تأثير مستخلص نبات القرنفل على بكتيريا

Pseudomonas aeruginosa

بحث تقدمت به الطالبة (حنين قحطان موسى)

إلى مجلس كلية العلوم – قسم علوم الحياة وهو جزء من متطلبات

نيل شهادة البكالوريوس – كلية العلوم/علوم الحياة

بإشراف

أ.د. سبيوف خومان فرمان الرماحي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ (11)



إلى رسول الانسانية وخاتم الرسل محمد (صلى الله عليه واله
وسلم)

إلى الطينة البيضاء والمغرس المبارك آل بيت الرسالة الطيبين
الطاهرين.

إلى من قيل فيهم وبالوالدين إحسانا

إلى الحنان الدافئ الذي يجري في عروقي

أبي وأمي

إلى من أشم فيها رائحة أمي إلى من قاسمني هموم الحياة
أختي التي لم تلدها أمي (هبة براهيم)

إلى رياحين عمري وسندي في الحياة ... أخوتي

إلى من كان كريماً بدمه من أجل العراق ... أبطال الحشد الغيارى

الاستاذة والفقيرة مادة شريفة

الحمد لله رب العالمين بتتابع النعم

أنهي دراستي هذه بوافر الشكر لعمادة كلية العلوم
ورئاسة قسم علوم الحياة لما وفرتة من متطلبات علمية طيلة
سنتين دراستي

كما أود أن أتقدم بعميق شكري وتقديري إلى استاذتي
الفاضلة الدكتورة (سيوفه الرماحي) لما قدمته من مشورة
علمية طيلة فترة البحث

الفهرس

الصفحة	العنوان
2	الآية
3	الاهداء
4	الشكر والتقدير
5	الفهرس
6	المقدمة
7	المواد وطرائق العمل
10	النتائج والمناقشة
13	Nomenclature and Discovery أتمسه والاكتشاف
14	General characteristics الصفات العامة
14	Microscopic characteristic اولاً: الصفات المجهرية
14	Cultural characteristics ثانياً الصفات الزراعية
15	Biochemical characteristics ثالثاً: الصفات الكيموحيوية
16	p. aeruginosa إمراضيه بكتريا
16	pathogenicity of p. aeruginosa عوامل الضرورة
18	p. awruginosa الامراض المتسببة عن بكتريا
20	Epidemlology of p. aeruginosa الوبائية
22	Genome of p. aeruginosa جينوم البكتريا
23	Antibiotic Resistance المقاومة للمضادات الحيوية
24	المصادر

المقدمة

القرنفل هو براعم الإزهار المجففة لشجرة القرنفل وهو من أقدم التوابل

مكوناته الرئيسية: زيت القرنفل الطيار مضاد قوي للجراثيم، الاوجينول

(Eugenol) نسبته 79-85% أكبر واهم مركبات الزيت الطيار وهو مخدر قوي ومطير، لذلك فهو مفيد في تسكين الم الأسنان أما الاستيل اوجينول الموجود في الزيت الطيار أيضا فقد تبين انو مضاد قوي للتشنج العضلات. (Barnes,et al.,2002)

يستعمل القرنفل كذلك لتخفيف السعال ولتنبيه الجهاز الهضمي ويستعمل بكثرة في طب الأسنان كمسكن موضعي يدخل في تحضير المضمضة المستعملة في علاج جروح وقروح اللثة ويمكن استعماله كعلاج لقروح الجلد ورمل العين (الجنجل) كما يستعمل بصورة واسعة كغسول أو تعقيم للفم من الميكروبات والمادة الفعالة فيه هي phenol ether (Bisset,1994)

كذلك أثبتت الدراسة التي أجراها Lee وجماعته (2000) بان المواد الفعالة في القرنفل تمتلك فعالية ضد الأكسدة مما يؤدي إلى احتفاظ الجسم بمستويات عالية من الأحماض الدهنية ويعد من المواد الآمنة الاستخدام وذو تأثيرات جانبية نادرة.

المواد وطرائق العمل

1- تحضير المستخلص الكحولي

تم تحضير المستخلص الكحولي للقرنفل حسب الطريقة الواردة في (Harbone,1984) وذلك بإضافة 100 مل من الكحول الايثيلي تركيز 70% إلى 10 غم من مسحوق القرنفل في وعاء محكم وبعد الإذابة رشح المحلول ثم ركز باستخدام جهاز المبخر الدوار وحضرت التراكيز اللازمة (5%، 10%، 15%، 20%، 25%، 30%) لحين الاستعمال.

2- تحضير المزروع البكتيري

شخصت بكتريا الاختبار أوليا في المستشفى التعليمي في الديوانية وأجريت الفحوصات البايوكيميائية لـ *P.aeruginosa* استنادا إلى (Collee,etal.,1996;Macfaddin,1979)، للتأكد من عزلة الاختبار. ثم لقت أنابيب زجاجية ومعقمة حاوية على الوسط أزرعي Brain-Heart Infusion Broth بـ 0.1 مل من العالق البكتيري وحضنت بدرجة حرارة 37م ولمدة 24 ساعة. بعدها عدل التركيز المعقم بواسطة Normal slaine للحصول على عكارة مساوية لأنبوب ماكفرلاند رقم 0.5 المستخدمة في قياس الكثافة البكتريا والتي تساوي 1.5×10^8 (Collee,et al.,1996)

3- اختبار حساسية بكتريا *P.aeruginosa* لمستخلص القرنفل

أ - طريقة الانتشار بالأكار

اتبعت طريقة الانتشار بالأكار في الحفر (wells)(Egroove,1985) في هذا الاختبار وذلك من خلال تهيئة أطباق حاوية على وسط Muller Hinton Agar لقتح أولا بعالق بكتريا *P.aeruginosa* وبمعدل 0.1مل/ طبق ونشرت على سطح الوسط، بعد ذلك عملت حفر بقطر 5ملم في كل طبق ثم أضيف 0.2 مل من المستخلص وبواقع ثلاث مكررات إضافة إلى السيطرة ثم تركت في الثلاجة مدة 30 دقيقة لانتشار محاليل المستخلص ثم حضنت بدرجة 37م لمدة 24 ساعة. قرئت النتيجة على أساس قياس قطر التثبيط Inhibition zone بواسطة المسطرة (Saxena ,et al.,1995)

ب - تحديد قيمة MIC

لتحديد قيمة MIC لمستخلص القرنفل الكحولي اتبعت طريقة العكارة وذلك بمزج 2 غم من مسحوق القرنفل إلى 10 مل من وسط Brain Heart Infusion Broth المعقم، ثم حضرت التخفيف اللازمة، (5,10,20,40,80,160) ملغم/ مل بالإضافة إلى وسط السيطرة لقتح الأنابيب جميعا بـ 0.1 مل من العالق البكتيري المقارن بأنبوبة ماكفر لاند

وحضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة 24 ساعة، تقرا النتيجة عمى أساس
وجود أو عدم وجود نمو في الأنابيب لتحديد قيمة MIC (NCCI,1984)

النتائج والمناقشة

1- تم إجراء الفحوصات التأكيدية على بكتريا الاختبار والتي تضمنت أشكال الخلايا البكتيرية ومظهر المستعمرات ومن خلال إجراء الفحوصات البايوكيميائية (جدول 1) بالمقارنة بالنتائج القياسية المذكورة من قبل (Collee , et al.,1996) وجد بأنها بكتريا *P.aeruginosa*

جدول (1)

الاختبارات التشخيصية للبكتريا *p.aeruginosa*.

النتيجة	الاختبار	ت
-	صبغة كرام	1
-	انتاج الاندول	2
-	فحص فوكس بروسكار	3
+	انتاج انزيم الكاتليز Catalase	4
-	أنتاج إنزيم تحلل اليوريا urease	5
+	أنتاج إنزيم الاوكسيديز oxidase	6
+	الحركة	7
+	تخمير سكر الكلوكوز	8
-	تخمير سكر السكروز	9
-	تخمير سكر اللاكتوز	10
+	تخمير سكر المالتوز	11
+	تخمير سكر الفركتوز	12
-	تخمير سكر المانيتول	13
+	أنتاج Lecithinase	14
+	استهلاك السترات	15
-	تكوين السبور	16

2- اختبار حساسية بكتريا *P.aeruginosa* لتراكيز مختلفة من مستخلص القرنفل:

يتضح من الجدول (2) بان البكتريا *P.aeruginosa* أبدت حساسية لمستخلص القرنفل بالتركيز 10% حيث بلغ قطر التثبيط 4.1 ملم وازداد هذا القطر بزيادة التركيز فعند التركيز 30% أصبح قطر التثبيط 30 ملم وهذا يتفق مع ما اشار إليه (Taylor, et al., 1996) بأنه كلما يزداد التركيز تزداد نسبة التثبيط ويعزى ذلك إلى ازدياد المواد الفعالة بزيادة تركيز المستخلص.

جدول (2)

معدل أقطار التثبيط لنمو بكتريا *p.aeruginosa* مقداراً بـ ملم.

تركيز المستخلص الكحولي	5%	10%	15%	20%	25%	30%
Test (العالق البكتيري)	0	4.1	8.1	10	19	30
Control (السيطرة)	—	—	—	—	—	—

- يدل على عدم وجود تثبيط

3- تحديد قيمة MIC للمستخلص الكحولي للقرنفل:

في جدول (3) تم تحديد قيمة Minimum Inhibition Concentration (MIC) لمستخلص القرنفل الكحولي لنمو البكتريا إذ بلغ 40 ملغم/مل، كذلك إن قيمة MIC تزداد مع زيادة تركيز المستخلص حيث أبدت البكتريا مقاومة للتراكيز الواطئة (العمار، 2001)

جدول (3)

لمستخلص القرنفل الكحولي نمو بكتريا MIC قيم ال

P.aeruginosa

تركيز المستخلص الكحولي	5 ملغم/مل	10 ملغم/مل	15 ملغم/مل	20 ملغم/مل	25 ملغم/مل	30 ملغم/مل
Test (العالق البكتيري)	+ev	+ev	+ev	- ev	- ev	- ev
Control (السيطرة)	+	+	+	+	+	+

أتمسه والاكتشاف Nomenclature and Discovery

عرفت بكتريا الزائفة الزنجارية مثل باقي الاجناس البكتيرية التي عاشت مئات السنين الماضية حيث صنفت في نهاية القرن التاسع عشر و حددت من قبل العالم والتر ميغولا watter Migule وكلمة pseudo باليونانية تعني ((كاذبه)) و monad تعني الكائن الدقيق الأحادي الخلية وقد استخدمت هذه المصطلحات في وقت مبكر من تاريخ علم الاحياء المجهرية وذلك للإشارة الى الكائنات أحادية الخلية singlecell وهو ما يعني وحدة كاذبة (palleroni2010) واكتشفت البكتريا بعد ان عزلت اول مره من مزرعة نقيه عام 1872 من قبل العلم Schoroeter من مصادر بيئية مختلفة كما اخلقت العديد من التسميات على هذه البكتريا في بداية اكتشافها، منها عصيات بايوسيانيس Bacterinm pyocyaneus او زوائف بايوسيانيا pyocyaneus . p (Holt et at. 1994) سميت بعد ذلك بالزوائف الزنجارية pseudomonas aeruginosa ثم صارت هذه التسمية الاسم العلمي للبكتريا Tzouchas 2014.

General characteristics

الصفات العامة

اولاً: الصفات المجهرية Microscopic characteristics

الزائفة الزنجارية هي عصيات سالبة لصبغة غرام هوائية اجباريه تنتمي للعائلة البكتيرية pseudomonadaceae وتظهر بشكل منفرد او ثنائي او بشكل سلاسل قصيرة قد تكون مستقيمة او منحنية تبلغ 1.5 - 3.0 مايكرومتر طولاً وقطرها حوالي 0.7 - 0.5 مايكرومتر وتتحرك البكتيريا بواسطة اسواط قطبية (Lewenza , et , at . filiatrula).

ثانيا الصفات الزراعية Cultural characteristics

تمتاز بكتريا *p. aeruginosa* لعدم قدرتها على تخمر سكر اللاكتوز ونتيجة لذلك تظهر مستعمراتها شاحبة اللون على وسط اكاد الماكونكي Barou, and finegoldr ولكن ان تنمو البكتريا في ظروف لا هوائية إذا أضيفت النترات للوسط الزراعي النامية عليه بسبب قدرتها على استخدام الاوكسجين الموجود في النترات كما تتغير البكتريا بافرازها العديد من الصبغات منها صبغة البايوسيانين pyocyanin الزرقاء وصبغة البايوفيريدين pyoverdin الصفراء وصبغة البايوروبين pyorubin الحمراء وصبغة البايوميلاينين poyomelanin السوداء.

ثالثاً: الصفات الكيموحيوية Biochemical characteristics

اتصفت البكتريا *p.aeruginosa* بإيجابيتها تجاه كل من اختبار الاوكسيز
والكتاليز وكذلك اختبار الستريت وتميع الجيلاتين وتكون سالبة
الاختبارات: الاندول ، المثيل الاحمر، فوس بروسكاور التغلال مركبات
عديدة بوضعها مصدرا مهما للطاقة مثل المصادر النايتروجينية
والكاربونية.

إمراضيه بكتريا *p. aeruginosa*

عوامل الضرورة *pathogenicity of p. aeruginosa*

تعد بكتريا *pseudomonas aeruginosa* كائنات شائعة في البيئة ويمكن العثور عليها في البواذ والتربة ومياه الصرف الصحي ويمكنها ان تنمو في البيئات المائية وهي مصدر لعدوى المستشفيات Nosocomial infection

ويمكن ان تسبب مضاعفات خطيرة (moreau- marquis . et. At.) بعد الدراسات الكثيرة على هذه البكتريا وجد انها تمتلك العديد من عوامل الضراوة منمها عوامل خلوية الالهاب *pili* والاسواط *flagella* التي تساعدها على الحركة والالتصاق بخلايا المضيف وعوامل افرازية مثل المواد البروتينية تصبغتي الـ *pyocyanin* و *pyoverdin* وذيوانات Exotoxin A التي تعد قاتلة عند حقنها بشكل نقي بالحيوانات المختبرية كما تنتج ذيوانات Exotoxin S التي تقوم بوظيفة الالتصاق ومنع عملية البلعمة في الانسجة المصابة كما تعتبر السكريات المتعددة المخاطية *mucoid exopolysaccharide* من احد عوامل الضراوة لبكتريا *p. aeruginosa* عند مهاجمة البكتريا لجسم الانسان فان مراحل الإصابة تبدأ من خلال وجود مستقبلات تدعى Toll-like receptors (TLRs) موجودة على الخلايا الطلائية وخلايا المناعة الطبيعية وهذه المتقلات وظيفتها استلام اشارات من خارج الخلية وعند ارتباط الخلية بالمستقبل

تحدث استجابة خلوية بعد ذلك يحدث استعمار للبكتريا colonization وبالتالي حدوث الإصابة (et.at. 2009 kobayashi) in fection

الانواع البكتيرية التي لها القدرة على انتاج انزيمات محللة تمكنها من غزو خلايا المضيف وتحطيمها للغلاف الخلوي الخارجي من خلال تحطيم او تحليل الوحدات الترتيبية في الغشاء الخلوي للمضيف والمتمثلة بالدهون المسفرة والبروتينات Teanpaisan et ومن هذه الانزيمات الانزيم الحال للشحوم Lipase الذي يعمل على تحطيم طبقة الدهون الموجودة في الجدار الخلوي للمضيف مما يساعد البكتريا على الانتحار داخل جسم الكائن الحي وانزيم الليسينينيز Lecithinase الذي يكمن دورة في تحطيم طبقة Lecithin في الغشاء الخلوي للمضيف

اما انزيم البروتيز protease فانه يلعب دور مؤثر فاعل في اختراق الأنسجة وامراضية البكتريا (Clark , 2006) واخيرا انزيم الكتاليد Catalase ودورة في حماية الخلية البكتيرية من التأثير السمي لبيروكسيد الهيدروجين H2O2 الناتج من الفعاليات الايضية للبكتريا

الامراض المتسببة عن بكتريا p. awruginosa

Diseases caused by p. aeruginosa

تعد بكتريا p. awruginosa الممرض الانتهازي السائد للانسان وعلى نحو متزايد حيث وجد انها مسؤولة عن حوالي 16% من حالات الالتهاب الرئوي في المستشفيات (Wiblin , 1997) و12% من التهابات المسالك البولية UTI المكتسبة من المستشفيات (Pollack , 1995) و10% من التهابات مجرى الدم و8% من اصابات الجروح

ان الاصابة ببكتريا p.aeruginosa تكون موضعية وشديدة وذلك بسبب قدرتها على استعمار مواقع تشريحية مختلفة بسبب امتلاكها اليات التصاق فعالة، ومتطلبات تغذية قليلة ومقاومة للمضادات الحيوية كما لها القدرة على غزو انسجة المضيف وتحطيمها واحداث الامراض الجهازية (Zeng , 2004) كما تعد بكتريا p. aeruginosa احد اهم المشاكل التي تواجه المرضى الذين يعانون من نقص المناعة immunocompromised ومستخدمي العدسات اللاصقة patel et. At. 2002 عام 2003 لبحث البكتريا في الولايات المتحدة بانها من الممرضات الاكثر انتشاراً وبنسبة

(18.1%) من عزلات بكتيرية للمرضى المصابين بذات الرئة pneumonia والمسبب المرضي الثاني الاكثر انتشارا وبسببة (16.1 % من عزلات بكتيرية لمرضى المجاري البولية UTI) Tam et.at. (2007).

ثم تزداد نسبة الإصابة بالبكتريا في حالات إصابة الاشخاص بالأورام السرطانية وكذلك بعد عمليات نقل الأعضاء كما ان إصابات الحروق كان لها دور في الامراضية بهذه البكتريا حيث اشارت الدراسات الى ان الإحياء المجهرية تنتهز الفرصة للتضاعف والاستعمار في منطقة الحرق المفتوحة نتيجة لتحطيم حاجز الجلد وتجول منطقة الحرق الى وسط غني وملائم لنمو الجراثيم.

الوبائية Epidemiology of *p. aeruginosa*

ليس غريبا على الاصابات الناتجة من بكتريا الزائفة الزنجارية ان تكون مرتبطة بشكل كبير مع معدلات الهلاك والوفيات نظرا لقدرة البكتريا على التكيف بسهولة للتغيرات التي تحدث في البيئة لتتطور بسرعة المقاومة للمضادات الحياتية ونتاج مجموعة متنوعة من عوامل الضراوة

وتعد بكتريا *p. aeruginosa* واحد من الممرضات الانتهازية opportunistic pathogens التي تمتلك العديد من عوامل الضراوة والمرتبطة مع اصابات المستشفيات nosocomial infection

كما عرفت هذه البكتريا بانها تستطيع النمو والبقاء على قيد الحياة في اي بيئة تقريبا على الرغم من انها تفضل البيئات الرطبة حيث يحدث استعمار لهذه البكتريا في الانسان في منطقة الابطين والاذن اذ ان الرطوبة تمثل عاملا مهما في حدوث الاصابة كما بينت الدراسات ان نسبة انتقال البكتريا بين الاشخاص الاصحاء قليلة نسبيا Pollack et, at , 2000 ان اغلب اصابات بكتريا الزائفة الزنجارية هي منتشرة عالميا وتتميز بانها ذات سمية، كما ان الاصابة النهائية بالبكتريا يمكن تميزها بثلاث مراحل وهي

تبدأ بالالتهاب البكتيري bacterial attachment ثم الاستعمار
Colonization وأخرا الغزو الموضعي للأنسجة Local invasion
وحدوث الإصابة infection تستطيع البكتريا النمو بدرجة حرارة 42م
كما انها قادرة على النمو في الديزل ووقود الطائرات
وكما هو معروف عن الكائنات الدقيقة التي تستخدم الهيدروتاربنونات فأنها
سوف تسبب التآكل الميكروبي microbial Corrosion تميزت البكتريا
بقدرتها على استخدام مجموعة واسعة من المركبات العضوية مصادر
للغذاء مما يعطيها قدرة استثنائية على استعمار بيئات عديدة عند قلة المواد
الغذائية وذلك بعد لحد مظاهر الوبائية للبكتريا.

جينوم البكتريا Genome of p. aeruginosa

لجينوم الزدائن الزنجارية القدرة على التكيف بقدرة (5.5-7 mbps) اذ يجعلها قادرة على الاستعمار في مدى واسع من البيئات يمتلك الجينوم العديد من الوظائف التي تم معرفتها منها حدوث تغيرات في المستضدات السطحية وفقدان عوامل الضراوة المرتبطة بالصفات وزيادة مقاومة المضادات وإدخال البلازميدات الوراثية، وكذلك الافراط في انتاج الالجنيت وتعديل مسارات الايض ويحتوي الجينوم العديد من المناطق التي تظهر الليونة تمتلك بكتريا ps.aeruginosa حوالي 5021 جين accessory genome (mathee et. At. 2008) كما تمتلك الجينوم المساعد بكتريا الذي يتكون من مكونات كروموسومية خارجية extrachromosomal components مثل البلازميدات plasmids وكتل من الدنا DNA التي تعد مكملة للكروموسومات في مواقع متغايرة ويشكل الجينوم المساعد حوالي 20% من حجم الجينوم الكلي وهو مسؤول عن التغير في حجم الجينوم والتنوع بين السلالات هذه المكونات قد تكون مكتسبة من أنواع أخرى من البكتريا من خلال استخدام اليات مثل النقل الافقي للجين horizoutal gene transfer ان تركيب الجينوم الفسيفسائي والبلاستيكي mosaic, plastic, form لبكتريا الزائفة الزنجارية سيزيد قدرتها على النحول modify وبالتالي سوف تحدث الإصابة وتجعلها قادرة على التكيف لمدى واسع

المقاومة للمضادات الحيوية Antibiotic Resistance

ان وبائية الامراض المعدية لا تزال مرتفعة لأنه مسببات الامراض قادرة على التغلب على دفاعات الانسان والتكيف مع العلاج لذلك اصبح تطور وانتشار المقاومة للمضادات الحيوية يهدد الصحة العامة ويؤثر بشده على فعالية مضادات الجراثيم المتاحة حاليا، وفي السنوات الأخيرة تم تسجيل زيادة كبيرة في عدد الجراثيم ذات المقاومة المتعددة للمضادات والمعزولة من المجتمع والالتهابات المكتسبة من المستشفيات ونتيجة لذلك نحن نواجه الان احتمال مستقبل بدون مضادات حيوية فعالة ان بكتريا *aeruginosa* تعد احد الأسباب التي تؤدي لأمراض تجرثم الدم *bacteraemia* والالتهاب الرئوي في المرضى الراقدين في المستشفيات بالإضافة الى ذلك تمتاز بكونها ذات مقاومة مثالية للعديد من العوامل المضادة للجراثيم كما يمكنها تطوير مقاومتها بسهولة لجميع المضادات الحياتية من خلال اليات مختلفة حيث امتلكت البكتريا صفة المقاومة الذاتية تجاه العديد من المضادات الحيوية إضافة لقدرتها على اكتساب المقاومة من خلال تكيفها خلال فتره العلاج الطبي لقد أظهرت بيانات أنظمة المراقبة العامة للعدوى المكتسبة زيادة مستمرة في مقاومة بكتريا الزائفة الزنجارية في وحدة العناية المركزة للجيل الثالث للسيفالوسبورينات والكوينولينات والكاربابانيم بمقارنة معدلاتها للعام 2002 ومتوسط معدلات المقاومة للسنوات الخمس الماضية كما أظهرت منظمات مراقبة أخرى.

المصادر

- 1- **Barnes** ,J.; Anderson. J. A. Phillipson. J.D.
;Herb. J. Medicenes Agude for healthe are
proffissionals. Second Edition. London.
Phamaceutical Press-2002.
- 2- **Baron**, S.(1986).Medical Microbiology .2nd.ed
Addison-Wesley publishing Company. Califrnia.
USA.
- 3- **Bisset**, N. G. ed. Harbal Drugs and
phytopharmaccutical Translated from second
Edition Boca Roron CRC press 1994.
- 4- **Brown**, B. A. (1976). Hematology: Principles
and procedures.2nd.ed., Lea and Febiger,
Philadelphia.
- 5- **Collee**, J. G., Fraser, A. G., Marmion, B.P. and
Simmons, A. (1996).Practical Medical Microbiology
.14th ed. Churchill Livingstone, USA.
- 6- **Egroove** N. S. (1985). Antibiotics ascintific
approach. Mirpublishers, Moscow.

7- Harbone, J. B. (1984).Phytochemical method. Aguids to modern techniques of plants analysis. 2ed .ed. London, Newyrk, chapman and hall.

8- Saxena, G.; Farmer, S.; Hancock, R.E.W. and G.H.N.(1995).Antimicrobial compounds Towers, from Abnus rubra. Int. J. of pharm.co.gnosy, 33(1):33-36.

9- Taylor, R. S. L.; Manandhar, N. P.; Hudson, J. B. and Towers, G.H.N. (1996).Antiviral activity of Nepales medicinal plants. J. of Ethnol pharmacology 52:156-163.