دراسة التأثير التثبيطي لقشور ثمار الرمان ومادة التانين في بعض انماط السالمونيلا المعزولة من حالات الاسهال في مدينة الموصل

خضر داؤد سليمان* صبا مؤيد سليمان الحليم

*قسم علوم الحياة – كلية التربية

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2003/2/25 تاريخ القبول 2004/7/28

ABSTRACT

The present investigation included isolation and diagnosis of the micro-organism *Salmonella* from diarrhoeal cases. Specimens were collected from (300) patients during the period July 2000- March 2001.

The following serotypes *S. typhimurium* (55%), *S. typhi* (20 %) , *S. hato* (15 %) and *S. anatum* (10 %) were isolated. The infection was concentrated in age –classes ranging from (2-5) years which reached (35%) and was followed by the class ranging from (6-12) months which showed (25%).

The aqueous and alcoholic extracts of pomegranate shells showed high inhibitory effect on the selected serotypes of *Salmonella.* The minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous extract of pomegranate shells against the serotype *S. typhi* was (0.1) mg/cm^3 and *S. typhimurium* (0.5) mg/cm^3 and (0.5) mg/cm^3 ; (0.0625) mg/cm^3 for alcoholic extract of pomegranate shells and (0.125) ; (0.25) mg/ cm^3 for taninis.

الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل جرثومة *Salmonella* من المرضى المصابين بالاسهال وتشخيصها ، اذ بلغ عدد عينات المرضى (300) مريض مصاب بالاسهال وبفئات عمرية مختلفة وللفترة من شهر تموز 2000 ولغاية شهر اذار 2001.

تمكنت الدراسة من عزل الانماط المصلية الاتية:

S. typhimurium وبنسبة 55% يليها النمط المصلي *S.typhi* بنسبة (20%) وشكلت الانماط المصلية الاخرى *Salmonella hato* و *Salmonella anatum* نسبة (15%) و

(10%) على التوالي ، كما تركزت الاصابة في الفئات العمرية التي تتراوح بين (2-5) سنوات بنسبة (35%) تلتها الفئة العمرية بين (6-12) شهر وبنسبة (25%).

وقد اظهر المستخلص المائي والكحولي لقشور ثمار الرمان تاثيراً تثبيطياً عالياً في الانماط المنتخبة لجرثومة السالمونيلا اذ كان التركيز الادنى المثبط Minimum Inhibitory Concentration للمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان في الانماط S.typhi و S. typhimurium مساوياً لـ (1.0) و (0.5) ملغم /سم^3 على التوالي وللمستخلص الكحولي (0.5) و (0.0625) ملغم / سم^3 وللتانينات (0.125) و (0.25) ملغم / سم^3.

المقدمة

يعد مرض الاسهال من المشاكل الصحية المهمة ، اذ يعد من المسببات الرئيسية للوفيات ، ويحدث الاسهال نتيجة عرقلة في حركة السوائل والايونات خلال القناة الهضمية والناجمة عن الحركة الدودية غير الطبيعية للقناة الهضمية والتي تساعد الجراثيم على النمو في الامعاء الدقيقة (1).

ويعد الاسهال الخمجي Infections Diarrhoea من المشاكل الصحية المهمة الرئيسة في الدول النامية ، اذ قدرت حالات الاصابة بالاسهال بحوالي بليون حالة مرضية ، ووجدت أعلى معدلات الوفيات في الاطفال وسجلت 3.3 مليون حالة وفاة سنوياً في الدول النامية (2 ، 3) .

وتعد الجراثيم من اهم مسببات الاسهال الخمجي ومنها جرثومة السالمونيلا اذ تكون الانماط المصلية *Salmonella typhi* و *Salmonella typhimurium* و *Salmonella agona* و *Salmonella enteritides* من اكثر الانماط المصلية شيوعاً وارتباطاً بحالات الاسهال (4).

وهناك العديد من الجراثيم المسببة لهذا المرض مثل *E. coli* بمختلف انواعها و *Shigella* و *Compylobacter jejuni* و *Vibrio cholerae* (5).

فالجراثيم كانت ولاتزال من اهم اسباب الامراض البشرية والحيوانية والنباتية وقد ظهر الامل في معالجة الاصابات الناتجة عن الجراثيم بعد اكتشاف البنسلين والعديد من المضادات ولكن بمرور الزمن لوحظ تناقص في فعالية هذه المضادات (6 ، 7) ، لذا تهدف الدراسة الحالية الى الاهتمام بالنباتات الطبية واستخدامها كبديل عن الادوية.

مواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية:-

جمعت 300 عينة براز مأخوذة من الاشخاص المصابين بالاسهال وبأعمار مختلفة ومن كلا الجنسين والذين راجعوا العيادة الاستشارية في مستشفى الرازي العام التعليمي والعيادة الاستشارية في مستشفى الخنساء للولادة والاطفال وللفترة من اوائل شهر تموز 2000 ولغاية شهر اذار 2001 ، حيث نقل ما يقارب (1) غم من البراز الى قناني حاوية على وسط مرق السلنايت Selenite F Broth والذي حضن في درجة (37)° م لمدة (24) ساعة بعدها تم اجراء الاختبارات الشكلية والكيمياحياتية على جميع العزلات وحسب ماورد في (8 و9).

كما تم فحص العزلات الجرثومية التي تم عزلها من عينات البراز مصلياً باستخدام طريقة التلازن على الشريحة الزجاجية Slid Agglutination وباستخدام المصول المتعددة التكافؤ (Poly valent sera O and H). ارسلت العزلات الموجبة من هذا الفحص الى المركز الوطني للسالمونيلا في بغداد لمعرفة الانواع المصلية للعزلات.

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية Antibiotic Sensitivity Test:-

تم اجراء اختبار الحساسية لـ (8) انواع من المضادات الحيوية وكما جاء في توصيات منظمة الصحة العالمية (10) وهي Ampicillin (10µg) و Cephalexine (30µg) و Gentamicin (10µg) و Tetracycline (30µg) و Chloramphenicol (30µg) و Naldix Acid (30µg) و Co-trimoxazole (25µg) و Ciprofloxacin (5µg) والمجهزة من شركة Oxoid ومعمل ادوية سامراء .

اجري هذا الاختبار على وسط اكار مولر-هنتون واتبعت طريقة Bauer وجماعته المحورة (11).

تحضير المستخلصات النباتية:-

جمعت ثمار الرمان من الاسواق المحلية ونظفت ثم غسلت بالماء المقطر وبعد الحصول على القشور جففت في الظل.

تحضير المستخلصات المائية:-

تم تحضير المستخلصات المائية لقشور ثمار الرمان وذلك بمزج (40) غم من النموذج النباتي مع (160) سم^3 من الماء المقطر وسحق النموذج باستخدام جهاز Blendor

وحسب ماورد في طريقة الباحث Riose وجماعته (12) وتم تعقيم هذا المستخلص بعد الحصول عليه باستخدام المرشحات الغشائية membrane filter 0.22µg.

تحضير المستخلصات الكحولية:-

اتبعت طريقة Grand وجماعته (13) المحورة عن الطريقة الاساسية للباحث Verpoorte وجماعته (14) في تحضير المستخلصات الكحولية حيث سحق (20) غم من النبات في (200) سم^3 من الكحول الاثيلي وبتركيز (95%) وبعد الحصول على المستخلص عقم بطريقة البسترة بدرجة (62)°م لمدة 10 دقائق.

استخلاص المركبات الفعالة من قشور ثمار الرمان والكشف عنها:-

تم استخلاص التانينات من قشور ثمار الرمان باستعمال جهاز الاستخلاص المستمر Soxhlet (15) وباستخدام الماء المقطر كمذيب وبمعدل (8) ساعات.

وقد اجريت عدة كشوفات كيميائية لاثبات نقاوة التانينات ومنها مدى ذوبانها في الماء، الايثانول ، الاسيتون ، والايثر والكلوروفورم وثنائي كبريتيدات الكاربون والبنزين ومدى تفاعلها مع محلول كلوريد الحديديك والاملاح المعدنية كخلات الرصاص وخلات النحاس ومحلول ثنائي كرومات البوتاسيوم (16).

وتم الكشف عن التانين المفصول من قشور ثمار الرمان باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC) (17) واستعملت في هذه التقنية الصفائح الرقيقة المغطاة بهلام السيلكا (Silica gel) المجهزة من شركة Merck لقد اعتمدت هذه التقنية لقياس سرعة الجريان للتانينات حيث تم قياس المسافة التي قطعتها العينة من نقطة البداية الى النقطة التي توقفت عندها وتم قياس سرعة الجريان Rf باستخدام المعادلة التالية (18)

$$\text{معدل سرعة الجريان (Rf) للعينة} = \frac{\text{المسافة التي يقطعها المذيب من نقطة البداية}}{\text{المسافة التي يقطعها المذاب من نقطة البداية}}$$

اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية والمكونات الفعالة:-

تم الاختبار بالاعتماد على طريقة (11) حيث تم تحضير اقراص من ورق الترشيح (Whatmann No.1) المشبعة بتراكيز مختلفة من المستخلصات (200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 ، 3.125) ملغم/سم^3 وذلك باضافة (0.1) سم^3 من كل تركيز من المستخلص الى قنينة حاوية على (10) اقراص معقمة (19) تم تثبيت الاقراص بوساطة ملقط معقم وحضنت بدرجة حرارة (37)°م ولمدة (14-16) ساعة. استخدمت طريقة (6) لبيان

الحساسية للمستخلصات المستخدمة التي تعتمد على حزام التثبيط واستخدمت المضادات الحيوية من نوع Chloramphenicol وTetracycline وNaldix acid وCiprofloxacin والتي اظهرت حساسيتها ضد الانماط المنتخبة كعينة سيطرة موجبة للجراثيم.

طريقة تحديد التركيز الادنى المثبط

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

حدد هذا التركيز باستخدام اختبار العكارة ، حيث حضرت التخافيف التالية من كل مستخلص (200، 100، 50، 25، 12.5، 6.25، 3.125) ملغم / سم^3 ، ثم اضيف (0.1) سم^3 من كل تخفيف من تخافيف المستخلص النباتي الى انابيب اختبار تحتوي (9.8) سم^3 من المرق المغذي المعقم ، ثم لقحت هذه الانابيب بـ (0.1) سم^3 من المعلق الجرثومي وبتركيز (10^8) خلية/سم^3 وبمعدل ثلاث مكررات لكل تركيز. حضنت الانابيب بدرجة حرارة (37)م ولمدة (14-16) ساعة بعدها تم قياس العكارة باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer من نوع (CECIL CE1021, 1000 SERIES) وعند الطول الموجي (595) نانوميتر ، وحدد التركيز الادنى المثبط الذي هو اعلى تخفيف للمستخلص الذي يمنع نمو الجراثيم بالمقارنة مع عينة السيطرة ، التي تتكون من (9.8) سم ^{3} من وسط المرق المغذي الملقح بـ (0.1) سم3 من المعلق الجرثومي المخفف و (0.1) سم3 من المذيب المستخدم لاذابة المستخلص النباتي المراد دراسته (20).

النتائج

لقد كانت نتائج الاختبارات الشكلية والكيمياحياتية والتي اجريت على العزلات الجرثومية مطابقة لما ورد في انظمة التشخيص المعتمدة (21).

لقد تم عزل (20) عزلة سالمونيلا أي بنسبة (6.6%) وتم تحديد 4 انماط مصلية الجدول (1).وكان النمط المصلي *S. typhimurium* اكثرها شيوعا وبنسبة (55%). واظهرت النتائج وجود نسبة عالية من حالات الاصابة بالسالمونيلا ممن تتراوح اعمارهم بين (2-5) سنوات ، اذ شكلت نسبة (35%) تلتها الفئة العمرية بين (6-12) شهراً وبنسبة (25%) ثم الفئة العمرية (1-2) سنة وبنسبة (20%) ، وشكلت الفئة العمرية 12 سنة فما فوق نسبة (10%) الجدول (2).

لقد ظهر من تحليل النتائج ارتفاع عدد الذكور المصابين بالسالمونيلا مقارنة بعدد الاناث بنسبة مئوية قدرها 65% و 35% على التوالي الجدول (3).

اما فيما يتعلق باختبار الحساسية للمضادات الحيوية فقد اظهرت جميع الانماط حساسية عالية للمضادات الحيوية Ciprofloxacin و Chloramphenicol و Naldixa acid و Tetracycline في حين اظهرت جميع الانماط المصلية مقاومة للمضادين الحيويين Ampicillin و Co-trimoxazole ، واظهرت (85%) من الانماط مقاومتها للمضاد الحيوي Cephalexin و (95%) مقاومة للـ Gentamicin.

لقد اظهر المستخلص المائي لقشور ثمار الرمان فعالية مؤثرة في النمط *S.typhi* مقارنة بعينة السيطرة Tetracycline وتاثيرا معتدلا مقارنة مع المضادين الحيويين Naidix acid و Chloramphenicol وتاثير ضعيفا مقارنة مع المضاد الحيوي Ciprofloxacin اما بالنسبة للنمط *S. typhimurium* فقد كان تاثير المستخلص مقاربا للمضاد الحيوي Nalidix acid ومعتدلا مقارنة مع عينات السيطرة Tetracycline و Chloramphenicol وتاثيرا ضعيفا مقارنة مع المضاد Ciprofloxacin.

لقد اعتمد في تحديد تاثير المستخلصات النباتية حسب ماورد في (10) فاذا كان قطر دائرة التثبيط اكبر من قطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة فهو تثبيط عالي اما اذا كان مساويا قطر دائرة التثبيط لمضاد المقارنة فهو تثبيط جيد واذا كان اقل بحوالي (6-12) ملم فان التأثير معتدل.

وكان للمستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان فعالية تثبيطية عالية جدا في النمط *S. typhi* مقارنة بعينة السيطرة Tetracycline وفعالية عالية مقارنة بكلا المضادين Nalidix acid و Chloramphenicol وتأثيرا معتدلا بالمقارنة مع المضاد Ciprofloxacin وكما موضح في الصورة (1). اما بالنسبة للنمط *S.typhimurium* فقد اظهر المستخلص الكحولي فعالية عالية جدا مقارنة مع عينات السيطرة Naldix acid و , Tetracycline و Chloramphenicol وتاثيرا مساويا مقارنة مع المضاد Ciprofloxacin وكما موضح في الصورة (2a).

كما اظهرت التانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان تاثيرا تثبيطيا عاليا جدا في النمط *S.typhi* مقارنة مع عينات السيطرة Naldix acid و Tetracycline و Chloramphenicol وتاثيراً مقارباً مقارنة بالمضاد الحيوي Ciprofloxacin وكما موضح في الصورة (3) .اما بالنسبة للنمط المصلي *S. typhimurium* فقد كان للتانينات فعالية عالية جداً مقارنة مع عينات السيطرة Naldix acid و Tetracycline وفعالية مؤثرة

ومقاربة مقارنة مع المضادين Chloramphenicol و Ciprofloxacin وكما موضح في الصورة (2b).

وقد تبين ان التركيز الادنى المثبط للمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان في النمط *S.typhi* كان مساوياً تقريبا لـ (1) ملغم / سم^3 وكان الـ (MIC) للنمط المصلي *S. typhimurium* مساويا تقريبا لـ (0.5) ملغم /سم^3 وكما مبين في الشكل (1) بينما كان للمستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان تاثيراً قوياً على الانماط *S.typhi* و *S. typhimurium* فكان الـ (MIC) مساويا لـ (0.5) ملغم /سم^3 و (0.0625) ملغم/سم^3 على التوالي كما موضح في الشكل (2).

اما التانينات فقد كان الـ (MIC) للنمط *S. typhi* مساويا لـ (0.125) ملغم /سم^3 و (0.25) ملغم /سم^3 للنمط *S. typhimurium* وكما موضح في الشكل (3).

كما تم الكشف عن التانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان اذ اثبتت قابليتها على الذوبان في الماء والكحول والاسيتون وعدم ذوبانها في الايثر والكلوروفورم وثنائي كبريتيد الكاربون والبنزين كما اثبتت المادة المعزولة قابليتها على التفاعل مع كلوريد الحديديك وتكوين راسب اسود مزرق وتفاعلها مع محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم وخلات الرصاص وتكوين راسب قهوائي كما اظهرت نتائج الكشف عن التانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان باستخدام تقنية كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة بظهور بقعة بلون بني وكانت قيمة الـ (Rf) لها مساوية لـ (0.85) وهي مماثلة لـ Rf العينة القياسية للتانينات وكما موضح في الصورة (4).

الجدول (1) اعداد الانماط المصلية والصيغ المستضدية لجرثومة السالمونيلا ونسبها المئوية.

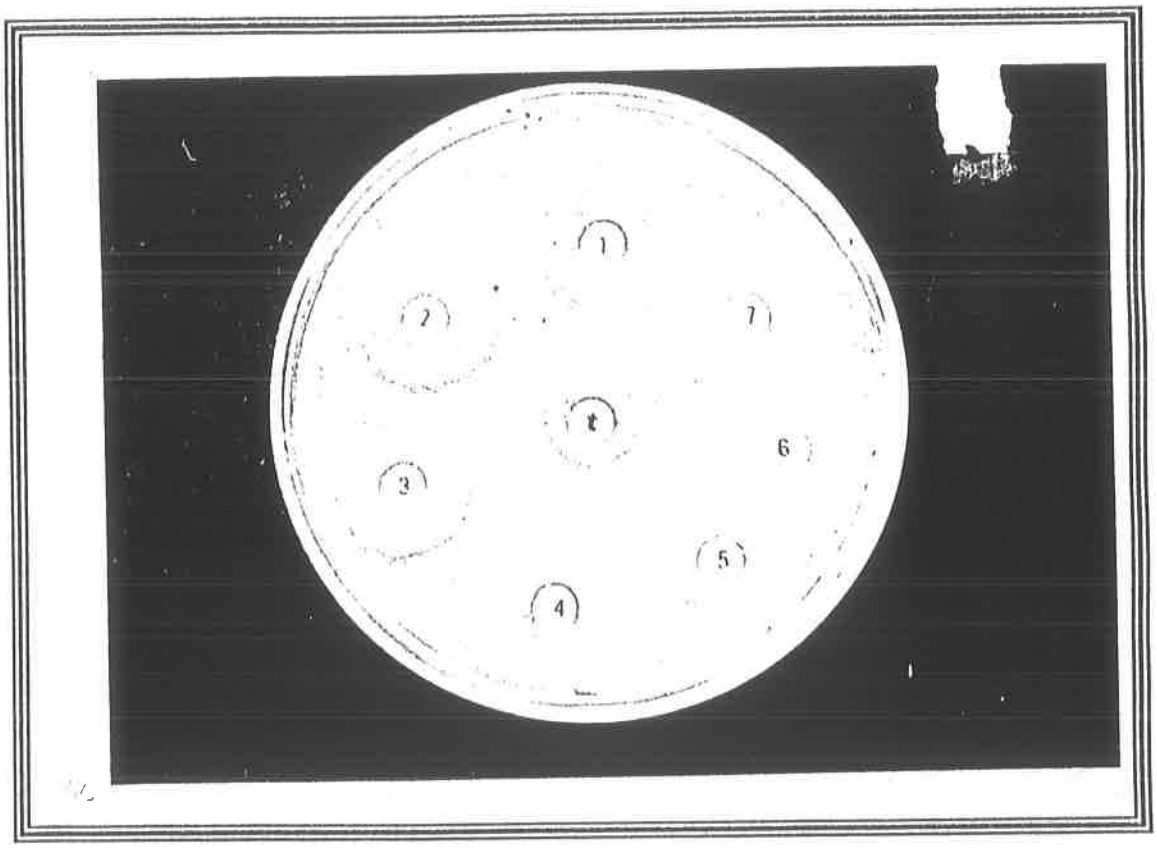
ت	النمط المصلي	المجموعة المصلية	الصيغ المستضدية	العدد	النسبة المئوية
1	*S. Typhimurium*	B	1,4,[5],12I1,2	1	%55
2	*S. typhi*	D	9,12,[vi]d	4	%20
3	*S. hato*	E	4,[5],12,g,m,s	3	%15
4	*S. anatum*	E_1	3,10[15][15,34]e,h1,6	2	%10

الجدول (2) توزيع الفئات العمرية وعلاقتها بالاصابة بجرثومة السالمونيلا.

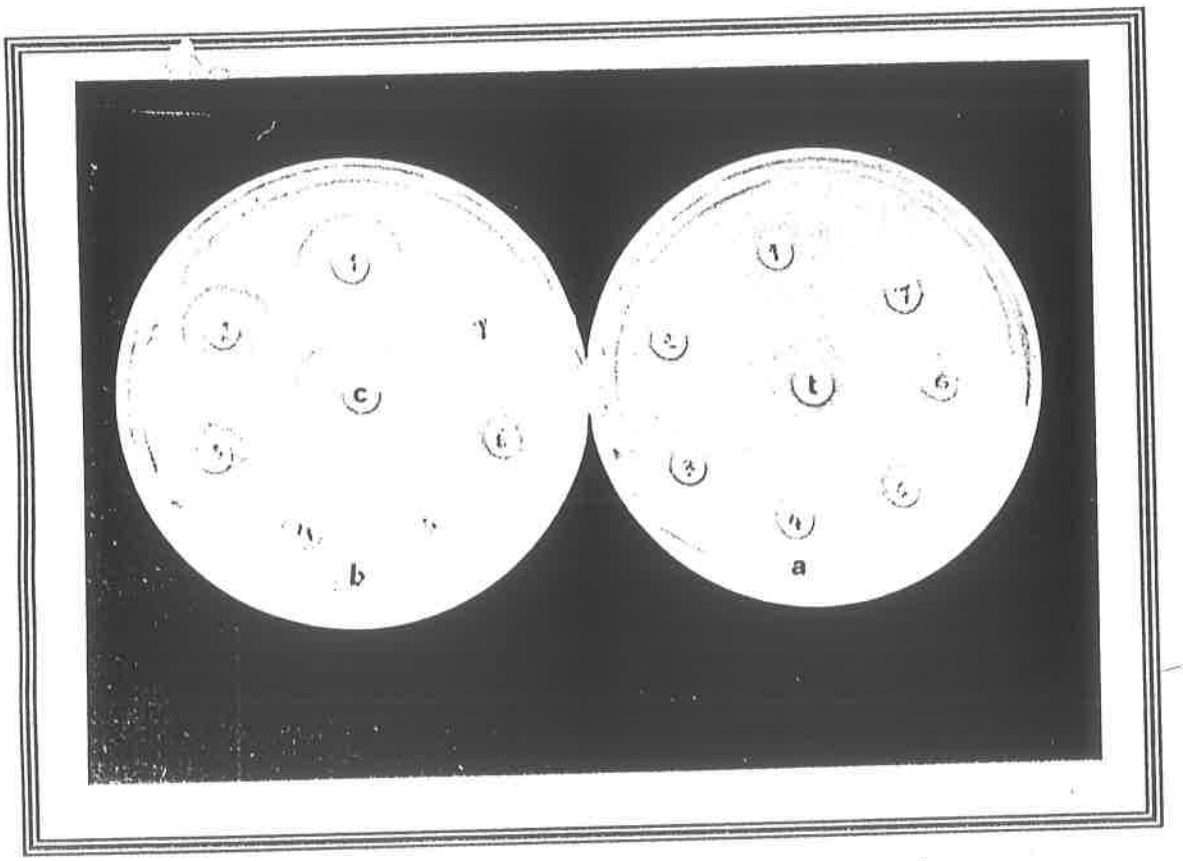
الفئات العمرية	العدد الكلي للحالات %	عدد الحالات الموجبة %
اقل من شهر–6 أشهر	25 (%8.3)	1 (%5)
6–12 شهر	69 (%23)	5 (%25)
1–2 سنة	73 (%24.3)	4 (%20)
2–5 سنة	67 (%22.3)	7 (%35)
5–12 سنة	16 (%5.3)	1 (%5)
12 سنة فما فوق	50 (%16.6)	2 (%10)
المجموع	300	20 (%6.6)

الجدول (3) توزيع الاصابة بالسالمونيلا تبعا لجنس المريض.

الجنس	العدد الكلي (%)	عدد الحالات الموجبة (%)
اناث	120 (%40)	7 (%35)
ذكور	180 (%60)	13 (%65)
المجموع	300	20 (%6.6)



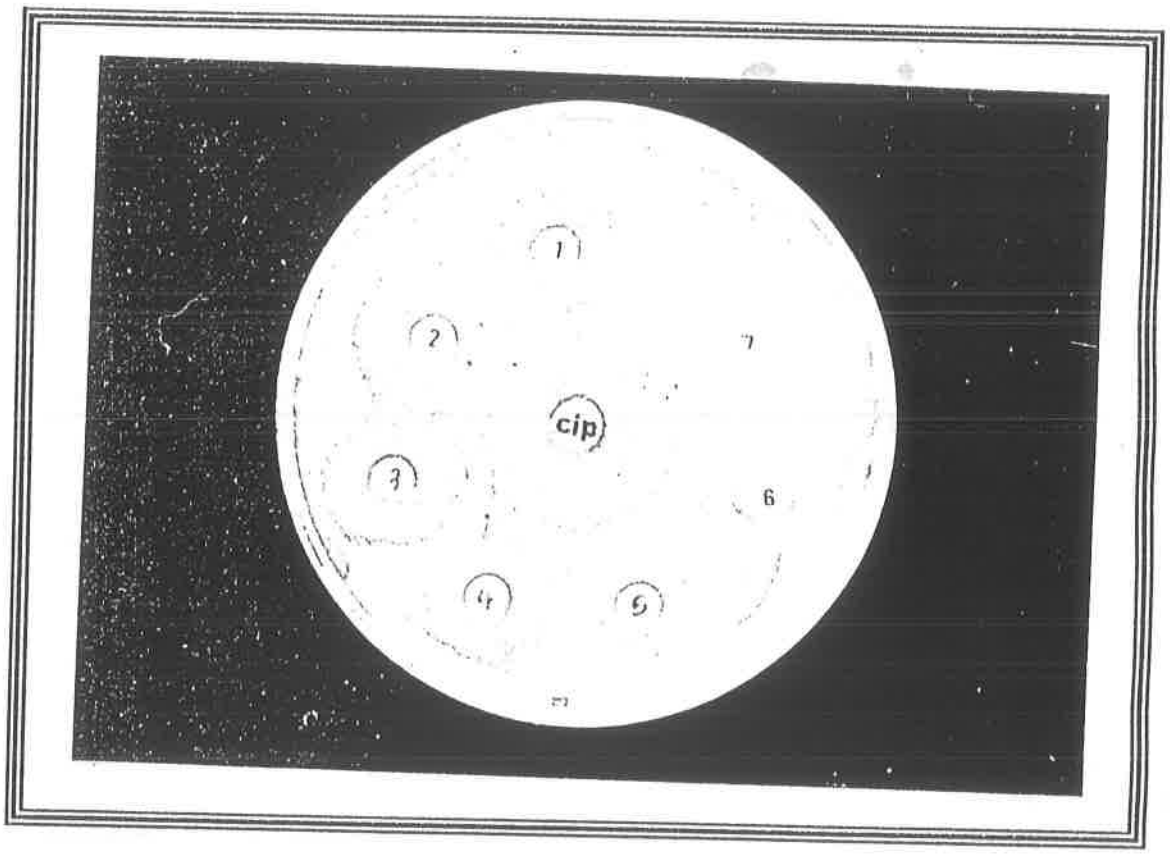
الصورة (1) تأثير المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان بتراكيز مختلفة في النمط المصلي *S. typhi* مقارنة مع عينة السيطرة القياسية 1. Tetracycline (200 ملغم/سم^3) ، 2 (100 ملغم/سم^3) ، 3 (50 ملغم/سم^3) ، 4 (25 ملغم/سم^3) ، 5 (12.5ملغم/سم^3) ، 6 (6.25 ملغم/سم^3) ، 7 (3.125 ملغم/سم^3) .



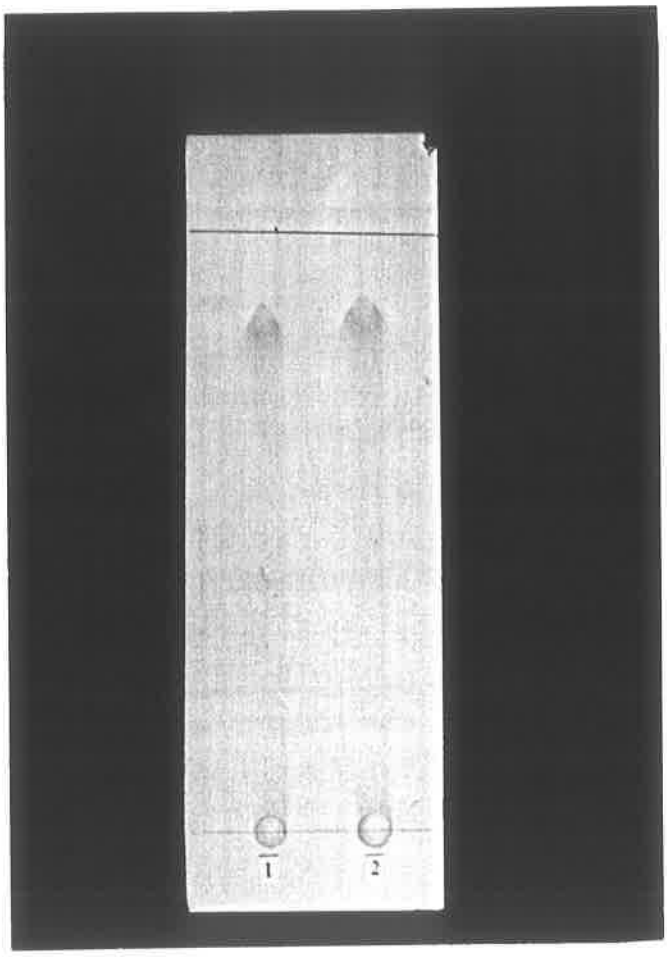
الصورة (2)

a. تأثير المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان بتراكيز مختلفة في النمط *S. typhimurium* مقارنة مع عينة السيطرة القياسية Tetracycline .

b.تأثير التانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان بتراكيز مختلفة في النمط *S. typhimurium* مقارنة مع عينة السيطرة القياسية Chloramphrnicol



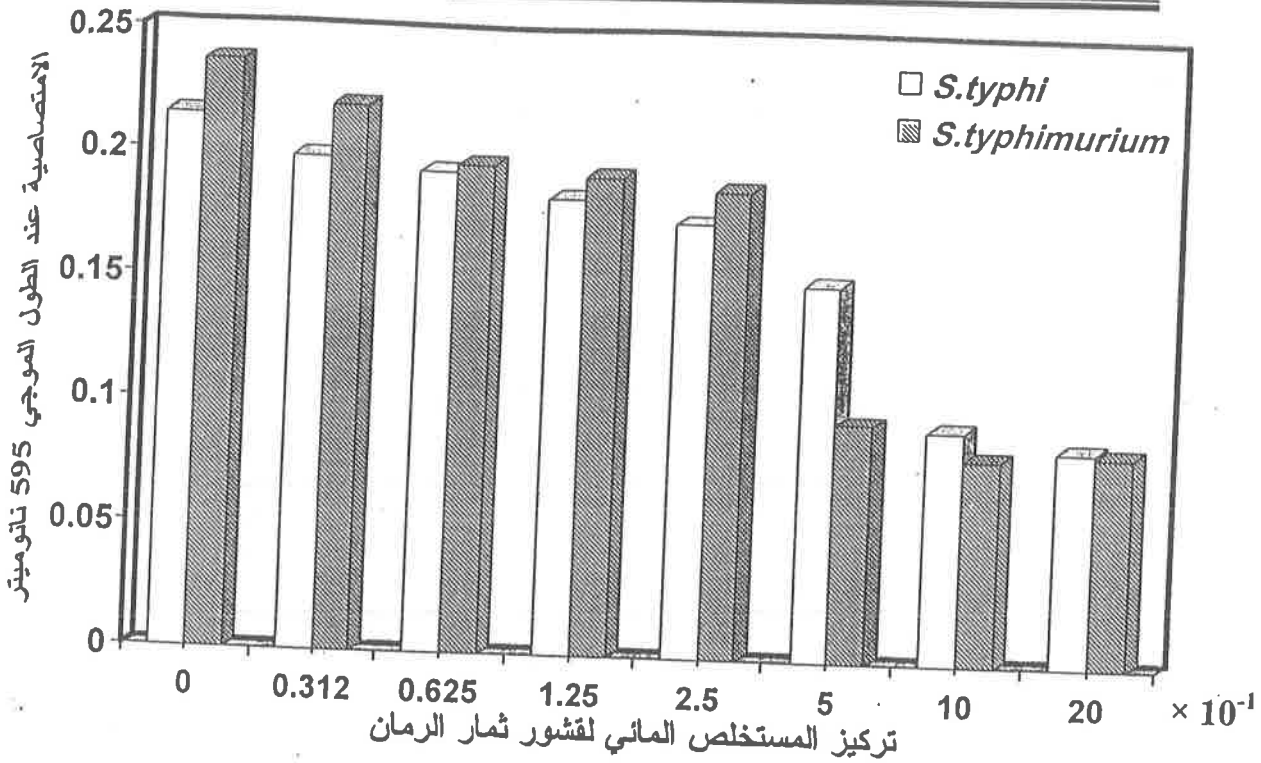
الصورة (3) تأثير التانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان بتراكيز مختلفة في النمط *S. typhi* مقارنة مع عينة السيطرة القياسية Ciprofloxacin



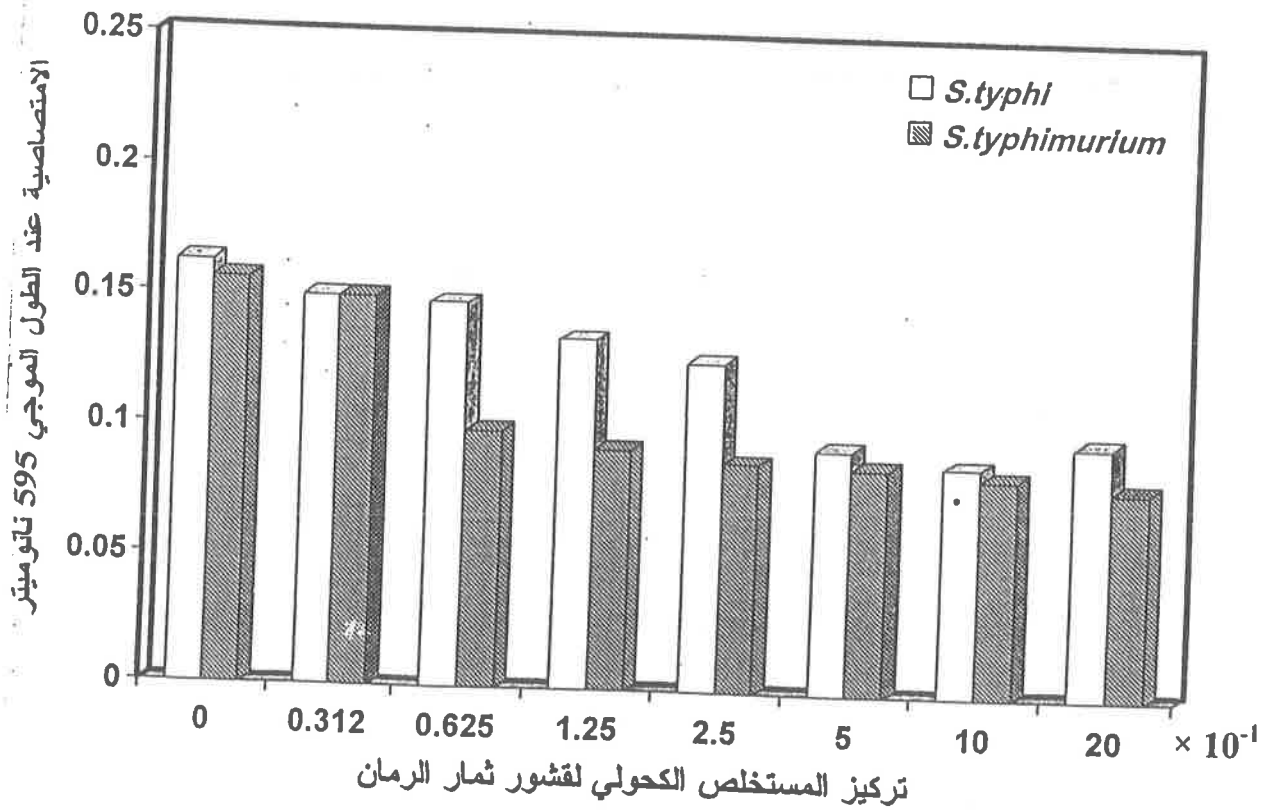
الصورة (4) البقع الظاهرة للتانين المفصول من قشور ثمـــار الرمـــان وعينة النموذج القياسية بوساطة تقنية TLC.

1.التانين المفصول من قشور ثمار الرمان.

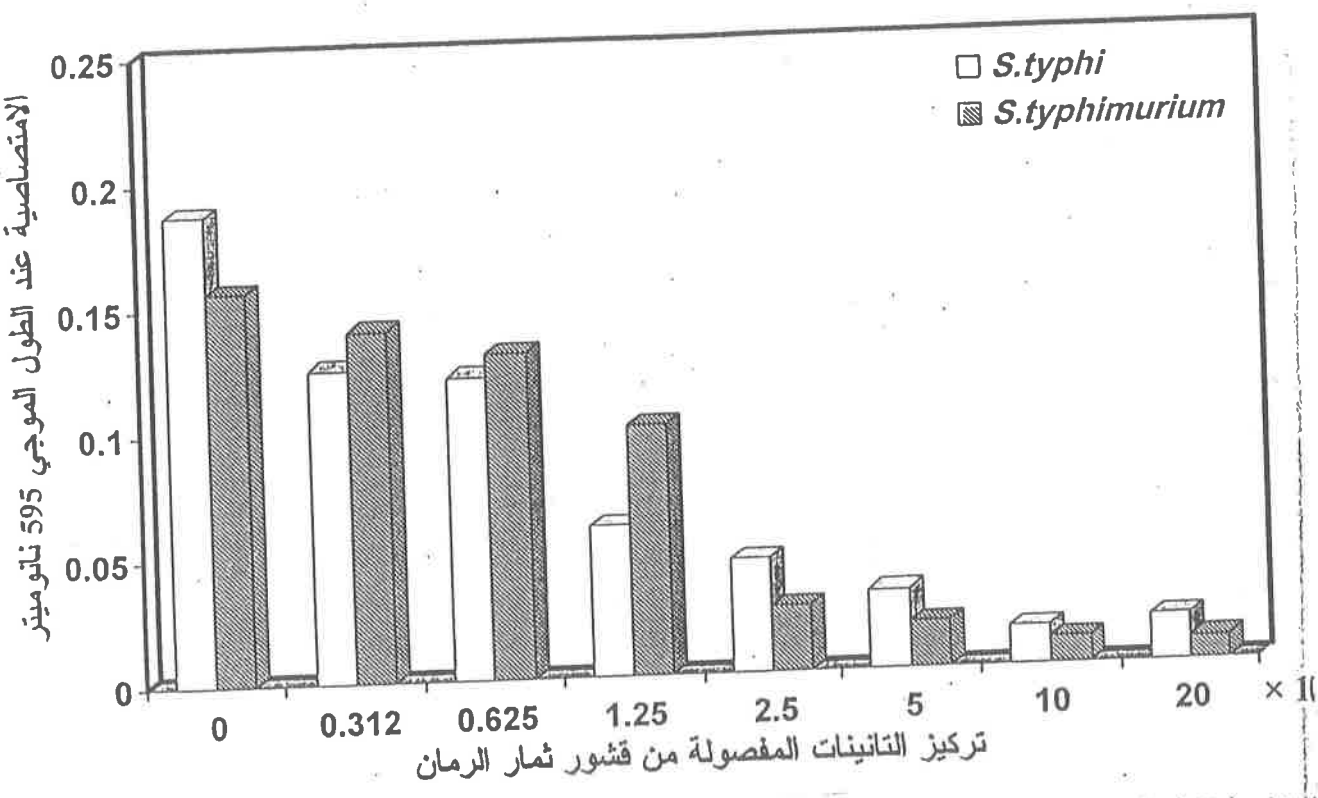
2.عينة النموذج القياسية.



الشكل (1) التركيز الادنى المثبط (MIC) للمستخلص المائي لقشور الرمان في بعض انماط السالمونيلا *S.typhimurium , S.typhi* قيد الدراسة (ملغم / سم^3)



الشكل (2) التركيز الادنى المثبط (MIC) للمستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان في بعض انماط السالمونيلا *S.typhimurium , S.typhi* قيد الدراسة (ملغم / سم^3)



شكل (3) التركيز الادنى المثبط (MIC) للتانينات المفصولة من قشور ثمار الرمان في بعض انماط السالمونيلا *S.typhi* , *S.typhimurium* قيد الدراسة (ملغم / سم^3)

المناقشة

لوحظ من النتائج ارتفاع معدل الاصابة بالسالمونيلا وبنسبة (6.6%) وخصوصا بين الاطفال وقد جاءت هذه النتائج مقاربة مع غالبية البحوث في هذا المجال (22 و 23).

لقد تمكنت الدراسة الحالية من اظهار علاقة جرثومة الـ *Salmonella* بالاسهال وكذلك علاقة عمر المرضى بالاصابة فكانت اعلى نسبة اصابة في الفئة العمرية بين (2-5) سنوات تلتها الفئة العمرية (6-12) شهرا ويعزى ذلك إلى عدة اسباب منها ان البدء بتناول الطعام فضلا عن الرضاعة وحركة الطفل ومستوى النظافة المنزلية تعد من العوامل التي تساعد في زيادة انتشار المرض اما بالنسبة للفئات العمرية الاقل فتكون اقل عرضة للاصابة ويعزى ذلك إلى ان الاطفال حديثي الولادة والى عمر (6) اشهر يكتسبون مناعة من الام تحميهم من الاصابة كما لوحظ ان الفئات العمرية الاكبر تقل فيها الاصابة وقد يرجع ذلك إلى مستوى النظافة من جهة وطبيعة العمل وبيئة السكن من جهة اخرى وهذا ما اشارت اليه دراسات كل من (24 و 25). اظهرت نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحيوية بان الانماط المصلية كانت حساسة تجاه المضادات Chloramphenicol و Naldix acid و Ciprofloxacin و Tetracycline واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما اوضحه (26). كما اظهرت جميع الانماط مقاومتها للمضادين الحيويين Ampicilin و Co-trimoxazole كما لوحظ ان (85%) من الانماط كانت مقاومة للمضاد الحيوي Cephalexin و (95%) منها مقاومة للمضاد Gentamacine وهذا يتفق مع دراسة (27) فالاستخدام العشوائي للمضادات من اهم اسباب زيادة المقاومة وانتشارها بين الانواع الجرثومية المختلفة وتعد المستشفيات من اهم البيئات المسؤولة عن نشوء السلالات المقاومة وتكاثرها بسبب حدوث الطفرات الوراثية (26).

وقد اشارت الدراسة الحالية ان للمستخلص المائي لقشور ثمار الرمان فعالية عالية وهذا يشير إلى كون المادة الفعالة ذائبة في الماء. اما المستخلص الكحولي لقشور ثمار الرمان فقد اظهر تاثيرا تثبيطيا عاليا في نمو جرثومة السالمونيلا ويعزى سبب ذلك الى طبيعة المادة الفعالة وقوة تاثيرها وعلاقتها بجدار الخلية الجرثومية (28). ومع الاستمرار بتنقية المركبات الفعالة اظهر التانين تاثيرا تثبيطيا عاليا في الانماط *S. typhi* و *S. typhimurium* واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع ما اوضحته دراسة (29) التي اوضحت ان الفعالية التثبيطية لقشور ثمار الرمان تكمن في المحتوى العالي للتانين والذي يعتبر من المواد

القاتلة للاحياء المجهرية ويعود تأثيره الى تكوين اواصر هيدروجينية مع البروتينـــات ممـا يحول دون بنائها (30).

المصادر

1.Branski, D. ; Lerner, A. and Lebenthal, E., Pediater. Gastroenterol., 43(2):307-331(1996).

2.Black, R.E. , Pediater. Infec. Dis. J., 12:751-761(1993).

3.Chavasse, D.C. ; Shier, R.P. ; Murphy, O.A. ; Huttly, S.R. ; Cousens, S.N. and Akhtar, T., Lancet, 353:22-25(1999).

4.Scuderi, G. ; Fantasia, M. and Niglio, T., Europen Journal of Epidemiology,16:377-383(2000).

5.Church, D.L. ; Cadain, C. ; Kabani, A. ; Jadavji,T. and Trevenen, C., Am. J. Clin. Pathol., 103(2):149-153(1995).

6.Prescott, L.M. ; Harley, J.P. and Klein, D.A., "Microbiology". 3rd ed.,W.M.C. Brown. Publishers london, Chicago(1996).

7.Digrak, M. ; Ilcim, A. ; Alma, M.H. and Sėn, S., Tr. J. of Biology, 23:241-248(1999).

8.Cruickshank, R. ; Dugiud, J.P. ; Marmion, B.P. and Swain, R.H.A., "Medical Microbiology". Vol.2. The practice of Microbiology. 12th ed. Churchill Livingstone, Edinburghi (1975).

9.MacFaddin, J.F., "Biochemical test for identification of medical bacteria".2nd ed. Waverly press, Inc., Baltimore (1985).

10.Vandepitte, J. ; Engback, K. ; Piot, P. and Heuk, C., World Health Organisation, Geneva (1991).

11.Bauer, A.W. ; Kirbay, W.A.M. ; Sherris, J.S. and Turk, M., Am. J. clin. Pathol., 45:493-496 (1966).

12.Riose, J.L. ; Recio, M.C. and Villar, A., J. Ethnopharmacol., 21:139-152 (1987).

13.Grand, A. ; Woudergem, P.A. ; Verpoorte, R. and Pousset, J.L., J. Ethnopharmacol., 22:25-31(1988).

14.Verpoorte, R. ; Tginastoi,A. ; Vandoorn, H. and Svendsen, A.B., J. Ethnopharmacol., 5:221-226 (1982).

15.Panshin, A.J. and Harrar, E.S., Forest product, there sources, production and utilization, McGRAW-Hill book company, USA (1962).

16.Shriner, R.L. ; Puson, B.C. and Curtin, D.Y., "Systematic Identification of Organic Compound". 5th ed., John-Wiley and Sons. Inc (1964).

17.مهدي ، حسن عبد علي و صادق حسن الحكيم. "تصنيع الاغذية" كلية الزراعة ، جامعـــة بغداد (1986) .

18.Harbone, J.B., Phytochemical methods Agide to modren technique of plant analysis. Ist. Ed. Printedin Great Britain Cox and Wyman Ltd., London (1973).
19.Waage, S.K. and Hedin, P.A., Phytochemistry, 24:243-245 (1985).

20.النعمان ، اديبة يونس شريف حمو. اطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، العراق (1998).

21.Koneman, E.W. ; Allen, S.D. ; Dowell, V.R. ; Janda, W.M. ; Sommer, H.A. and Winn, W.C., Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology. 4th ed. J. B. Lippinaott Comp., Philadelphia (1997).
22.Al-Falluji, M. ; Salman, M.A. ; Al-Ruznamaji, N. and Sa'eed, J.M., J. Biol. Sci. Res., 18:114-126(1987).
23.Ackers, M.L. ; Puhr, N.D. ; Tauxe, R.V. and Mintz, E.D., JAMA, 283(20):2668-2673(2000).
24.Abbar, F.M. and Suleyman, H.D., The Bulletin of The High Institute of Public Health-Vol XIV(2):73-80 (1984).

25.الجبوري ، هدى صالح خضر. رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة تكريت ، العراق (2001).

26.White, N.J. and Parry, C.M., Current opinion in infectious disease, 9:298-302 (1996).
27.Chinh, N.T. ; Parry, C.M. ; Ly, N.T. ; Ha, H.D. ; Thong, M.Y. ; Diep, T.S. ; Wain, J. ; White, N.J. and Farrar, J., Antimicrobial agents and Chromotherapy, 44(7):1855-1859 (2000).
28.Desta, B., Journal of Ethnopharmacology, 39:129-139 (1993).

29.مصطفى ، ايمان عبد العزيز. رسالة ماجستير،كلية العلوم،جامعة الموصل،العراق(1995).
30.Nychas, G.J.E., Natural antimicrobials from plants. In: Gould, G.W. (ed.) New Methods of Food Preservation. Blackie Academic and Professional., London, PP.58-89 (1995).