دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية على نمو بكتريا الزوائف الزنجارية (*Pseudomonas aeruginosa*) المرضية والرمية (البرية) وعلى إنتاجها لصبغة البايوسيانين

لهيب رجب حماد
كلية الطب البيطري/ جامعة الفلوجة

الخلاصة

تم دراسة الفعالية التثبيطية للمستخلصات الكحولية لنباتات الثوم، القرنفل، بذور القطن، بذور الخروع وقلف وورق اليوكالبتوس كمضادات بكتيرية تجاه نمو عزلات بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ذات مصدرين مختلفين ودرست فعالية مستخلصات هذه النباتات تجاه إنتاج صبغة البايوسيانين (الخضراء – المزرقة) وكانت عدد العزلات البكتيرية 20 عزلت من مسحات سريرية لإصابات الجروح والحروق من (مختبرات مستشفى بغداد التعليمي) وكانت نسبة بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* فيها 79%، وكذلك عزلت من عينات التربة والمياه والتي أظهرت نسبة وجود هذه البكتيريا 18%، وقد اعتبرت هذه رمية (برية) شخصت اعتمادا على الصفات المظهرية والمزرعية والكيميوحياتية لهذه البكتيريا. وبعد معاملتها بالمستخلصات النباتية السابقة أظهرت النتائج تأثيرا تثبيطا متفاوتا على البكتيريا لكلا المصدرين فكانت هناك مقاومة واضحة للعزلات المرضية اكثر من العزلات الرمية مما يدل على زيادة ضراوتها ومقاومتها للمادة الفعالة لهذه المستخلصات. وبعد مقارنة هذه النتائج مع نتائج اختبار الحساسية للمضادات الحياتية التي استخدمت ضد هذه البكتيريا من كلا المصدرين وهي (الاموكسيلين، السيقوتاكسيم، الرافامبسين، الجنتامايسين والتوبرامايسين) فقد أظهرت العزلات المرضية مقاومة واضحة لهذه المضادات عدا مضادي الجنتامايسين والرافامبسين اللذين كانت حساسة لهما في حين أظهرت العزلات البرية حساسية تجاه مضادات الجنتامايسين، الرافامبسين والتوبرامايسين ومقاومة لمضادي الاموكسيلين والسيقوتاكسيم. أما نتائج تأثير المستخلصات النباتية على إنتاج صبغة البايوسيانين Pyocyanin فقد أظهرت انخفاض في إنتاج هذه الصبغة لكلا المصدرين وذلك من خلال تغير وانخفاضا لون الوسط الزرعي بعد إضافة المستخلص النباتي إليه.

Study of some plant extracts' effect on the growth of *pseudomono asaeruginosa* bacteria (pathogenic and wild) and its production of pyocyanin pigment

L. R. Hamad
College of Veterinary Medicine/ University of Fallujah

Abstract

In this study, alcoholic extracts of (*Allium sativum, Eugenia caryophyllus, Gossypium herbaceum, Ricinus communis and Eucalyptus globulus*) were used as antibacterial against *Pseudomonas aeruginosa*, which isolated from different sources. Their effects on pyocyanin pigment production were studied. A total of 20 of *P. aeruginosa* were used. Ten pathogenic isolates 79% were collected from different human clinical cases (burns and wounds) at Baghdad teaching hospital. Meanwhile, ten wild isolates 18% were collected from soil and water samples and considered as saprophytic bacteria. All of these 20 isolates were identified based on their morphological, cultural and biochemical characteristics. After treating with mentioned extracts, the obtained results showed spectrum anti-bacterial activity according to tested

isolates of *P. aeruginosa*. The wild-type isolates were found to be the most sensitive bacteria as indicated by the zone of inhibition. While the pathogenic-type isolates were the less sensitive. By comparing these results with the results obtained by using standard antibiotics (Cefotaxime, Amoxicillin, Tobramycin, Rifampcin and Gentamycin), the pathogenic isolates were found to be resistance to all antibiotics tested except Gentamycin and Rifampcin. Meanwhile, the wild-type were susceptible to Gentamycin, Rifampcin and Tobramycin, but resistant only to Amoxicillin, and Cefotaxime. On the other hand, the effective of extracts on pyocyanin pigmentation was clear by decrease the concentration and colour for the two type's isolates.

المقدمة

تعد بكتريا *P. aeruginosa* بكتريا رمية انتهازية مرضية عزلت من عدة مصادر منها سريرية من مسحات الإصابات المتقيحة للجروح والحروق والتهابات المسالك البولية والرئة وخاصة الأشخاص المصابين بالتليف الكيسي إضافة إلى التهابات أغشية أجزاء أخرى مختلفة من الجسم الحي (1) ويكمن خطرها في هذه الحالات من خشية وصلوها إلى الجهاز الدموي وبالتالي إلى الوفاة كما في 60% من حالات التسمم بهذه البكتريا(2). أما المصادر الأخرى لهذه البكتريا فهي بيئية لكونها بكتريا واسعة الانتشار توجد في التربة والمياه وعلى السطوح الخارجية للنباتات والحيوانات(3) وبالتالي تعتبر هذه العزلات البكتيرية من هذه المصادر برية. بصورة عامة تتميز بكتريا *P. aeruginosa* بمقاومتها للعديد من المضادات الحيوية المختلفة لوجود آليات مقاومة متعددة تمتلكها هذه البكتريا منها ما هي إفرازية مثل إنتاج الأنزيمات والصبغات (صبغة البابوسيانين) ومنها ما هي وراثية كامتلاكها للبلازميدات إضافة اللي قدرتها على التكيف في بيئتها في تكوين آليات مقاومة المضادات الحيوية(4). إضافة إلى ما كانت تسببه المضادات الحيوية من إضعاف للجهاز المناعي لجسم المريض، فقد بدا العمل على الكشف عن استخدام المستخلصات النباتية كأدوات دفاعية أو علاجية في العديد من الدراسات(5) وإدخالها بصورة مباشرة أو غير مباشرة في تحضير المواد الدوائية(6) ومن هذه النباتات الطبية المستخدمة منذ القدم في علاج بعض الأمراض هي (الثوم *Allium sativum*، القرنفل *Eugenia caryophyllus*، بذور القطن *Gossypium herbaceum*، بذور الخروع *Ricinus communis*، ورق وقلف اليوكالبتوس *Eucalyptus globules*).

المواد وطرائق العمل

أولا: عزلات بكتريا *P. aeruginosa*: وهي بكتريا هوائية إجبارية متحركة عصوية سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ وغير منتجة لغاز H_2S وذات استجابة موجبة لاختباري الاوكسيديز والكتاليز (7، 8) ويمكن تميز وجودها من انبعاث رائحة عفنه مميزة لها Musty odour(9). أما اهم الصفات التفريقية لهذه البكتريا هي إنتاجها لصبغة البابوسيانين الخضراء– المزرقة التي تساعدها في البقاء في بيئتها لكونها من عوامل الضراوة لها فهي مادة قاتلة للبكتريا والفطريات الأخرى الموجودة في محيطها(10).

أ. **العزلات المرضية:** تم الحصول على 10 عزلات مرضية لبكتريا *P. aeruginosa* معزولة من مسحات إصابات الجروح والحروق ومشخصة من مستشفى بغداد التعليمي وتم التأكيد على تشخيصها بالفحوصات البايوكيمياوية(11). ومن ثم نميت على أوساط الأكار المغذي السائل وحفظت في وسط المغذي السائل مع الكليسيرين بتركيز 20% بدرجة الانجماد.

ب. **العزلات البرية:** تم عزل 10 عزلات بكتيرية لهذا الجنس من عينات التربة والمياه فقد جمعت 27 عينة تربة و18 عينة مياه وكانت عدد العزلات البكتيرية للزوائف الزنجارية من هذه المصادر(4، 6) عزلات على

الترتيب. حيث أخذت العينات وزرعت منها المسحات على أوساط تفريقية (وسط الماكونكي والدم) الصلبة ومن ثم أجريت عليها الفحوصات البايوكيمياوية التأكيدية الخاصة بالسيدوموناس(12). تم الحصول على 10 عزلات بكتيرية منها، ومن ثم نميت على وسط الأكار المغذي السائل وحفظت في وسط الأكار المغذي السائل مع الكليسرين ذي تركيز 20% بدرجة الانجماد لحين الاستخدام.

ثانياً: الاستخلاص: استعمل كحول الإيثانول بتركيز 95% في عمليات الاستخلاص المختلفة للحصول على مكونات النباتات المستخدمة في الدراسة (بذور الخروع، الثوم، القرنفل، بذور القطن، ورق اليوكالبتوس وقلف اليوكالبتوس) التي جمعت وجففت ثم سحقت وطحنت وحفظت في حاويات معقمة في المجمدة لحين الاستخلاص.

أ. **طريقة الاستخلاص:** تم وزن 20 غم من المسحوق الجاف للنباتات المستخدمة وأضيف إلى 150 مل من الكحول الاثيلي ذي التركيز 95% ثم ترك المزيج على جهاز التحريك لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة. بعدها فصل المزيج باستخدام جهاز الطرد المركزي 300 دورة/ دقيقة لمدة 15 دقيقة ثم اخذ الراشح وجفف في جفن خزفية باستخدام الفرن الكهربائي عند درجة 40 م^{o} ثم جمع الناتج وحفظ لغرض الاستخدام لاحقا(13).

ب. **تحضير محلول المستخلص الكحولي:** وزن 1 غم من المستخلص الأولي الجاف وأذيب في 10 مل من كحول الإيثانول بتركيز 95% وبذلك اصبح التركيز النهائي للمستخلص 10ملغم/ مل، ثم وضع على الجهاز المازج لمدة 5 دقائق وبعد ذلك عقم بأوراق الترشيح 0.45 µm ثم حفظ في أنابيب معقمة لحين الاستخدام.

ثالثاً: اختبار تأثير المستخلصات النباتية على عزلات بكتريا *P. aeruginosa*: استخدمت طريقة الانتشار في الحفر Agar– well diffusion method في قياس الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية المذكورة مختبريا تجاه نمو عزلات *P. aeruginosa* المرضية والبرية. إذ لقح سطح الأكار المغذي بوساطة مسحة قطنية معقمة، من العالق البكتيري الحاوي على 1.5×10^{8} (وحدة تكوين مستعمرة . مل$^{-1}$) بعد مقارنته مع ثابت العكورة القياسي. ثم عملت ثلاث حفر بقطر 6 ملم على سطح الوسط المزروع بوساطة الثاقب الفليني حيث استخدم 300 مايكروليتر من المستخلص في الحفرة. كما استخدم طبق السيطرة الذي تحوي الحفرة فيه على الإيثانول فقط. حضنت الأطباق الملقحة بدرجة حرارة 37 م^{o} لمدة 24 ساعة. ثم حددت الفعالية بقياس منطقة التثبيط حول الحفر بالملم(14).

رابعاً: اختبار حساسية المضادات الحيوية: تم نشر (100 مايكروليتر) من العالق البكتيري ذي عمر 18 ساعة (15) بعد تخفيفه بالمحلول الملحي الفسلجي ومقارنته مع ثابت العكورة القياسي 1.5×10^{8} وحدة تكوين مستعمرة لكل مل. على وسط المولر هنتون Muller hinton agar بواسطة مسحة قطنية معقمة. وبعد جفاف الطبق وضعت أقراص المضادات الحيوية Cefotaxime, Amoxicillin, Tobramycin, Rifampcin, Gentamycin وحضنت الأطباق بدرجة 37 م^{o} لمدة 24 ساعة. ثم قيست مناطق التثبيط حول الأقراص بوحدة الملم (16).

خامساً: اختبار تأثير المستخلصات النباتية على إنتاج صبغة البايوسيانين: استخدم في هذا الاختبار وسط السائل المغذي Nutrient broth فقد حضر مكررين من هذا الوسط لكل عزلة بكتيرية من كلا المصدرين احد المكررين كان عاديا والثاني يحتوي على تركيز قليل من المستخلص للنباتات المستخدمة في الدراسة. حيث وزن 10 غم من المسحوق الجاف للنبات المستخدم وعلى غرار الفقرة (أ– ثانيا) وبصورة مباشرة أضيف إلى محتويات الوسط الزرعي ثم لقحت جميع المكررات للأوساط الزرعية بالعزلات البكتيرية للمصدرين وحضنت لمدة 24 ساعة في درجة حرارة 37 م^{o} وبعدها لوحظ تغير لون الوسطان الزرعيان لكل عزلة ومقارنة اختلاف إنتاج صيغة البايوسيانين لكلا الوسطين العادي والآخر الحاوي على المستخلص النباتي.

النتائج والمناقشة

1. **التأثير التثبيطي للمستخلصات النباتية على نمو بكتريا *P. aeruginosa***: أظهرت عزلات بكتريا *P. aeruginosa* المدروسة تباينا واضحا في استجابتها لتأثير المواد الفعالة للمستخلصات النباتية المستخدمة تبعا لمصدرها إضافة إلى اختلاف التأثير التثبيطي لهذه المستخلصات وفقا لاختلاف نوعها. حيث أظهرت الدراسة ان معاملة 10عزلات برية من بكتريا *P. aeruginosa* قد أظهرت أقطار تثبيطية أكبر من العزلات العشر الأخرى المرضية لهذه البكتريا بصورة عامة. فكانت استجابة العزلات البرية لكل من مستخلص القرنفل ورق اليوكالبتوس واضحة حيث أكبر أقطار تثبيطية لها بلغت 33،31 ملم على التوالي في حين كانت الأقطار التثبيطية لهذين المستخلصين على العزلات المرضية 18،26 ملم على التوالي. أما تأثير مستخلص الثوم وقلف اليوكالبتوس على عزلات كلا المصدرين فكانت متشابهة حيث بلغ قطر منطقة التثبيط لكلا المستخلصين 31 ملم في حين كانت الأقطار التثبيطية لهذين المستخلصين ضد العزلات المرضية متقاربة حيث كانت 18،20 ملم على التوالي. وبلغت اكبر أقطار تثبيطية لمستخلص الخروع وبذور القطن للعزلات البرية 12،23 ملم على التوالي بالمقابل كانت العزلات المرضية مقاومة لمستخلص الخروع وذات أقطار تثبيطية تصل إلى 18 ملم تجاه مستخلص بذور القطن (جدول1). من ذلك يمكن الاستنتاج بان العزلات البرية كانت اكثر تأثرا بالمواد الفعالة للمستخلصات النباتية عن مثيلتها المرضية مما يظهر للأخيرة ضراوة اكبر لمقاومتها لتأثير المستخلصات النباتية المستخدمة وهذه النباتات عرفت بفعاليتها التثبيطية على البكتريا وخاصة *P.aeruginosa* كما في دراسة(15) ومنها تأثير مستخلص القرنفل عليها وهذا ما أشار إليه (16) وكذلك (17) في احتواء هذه النباتات على فينولات مضادة للبكتريا(18). وكذلك الحال في مستخلص اليوكالبتوس الذي اكد فعاليته(19). كما يعد مستخلص أوراق اليوكالبتوس ذو تأثير فعال ضد بكتريا *P.aeruginosa* (20). الذي يشترك معه مستخلص الثوم على هذه البكتريا(21). وعلى الأنواع الأخرى من البكتريا والفطريات. وبالتالي يمكن الجزم بان للمستخلصات النباتية تأثير فعال على تثبيط عدد من البكتريا المختلفة(22). لذلك تدل النتائج المستحصلة في هذه الدراسة على تطور آليات مقاومة مختلفة لبكتريا *P. aeruginosa* المرضية تتيح لها فرصة مقاومة بعض المواد الفعالة للمستخلصات النباتية المستخدمة وهذه الآليات سبق ولوحظ تطورها من نتائج فرط استخدام المضادات الحيوية للمرضى وسوء استخدامها Antibiotic Misuse على عكس ما لوحظ في استجابة العزلات البرية لهذه المستخلصات (جدول 2).
2. **اختبار تأثير المضادات الحيوية على نمو العزلات البكتيرية:** استخدمت خمسة أنواع من المضادات الحيوية وهي الجنتامايسين والرافامبسين والتوبرامايسين والاموكسيلين والسيفوتاكسيم ضد نمو عزلات بكتريا السيدوموناس اريوجينوسا لكلا المصدرين البرية والمرضية. اتبعت طريقة أقراص المضادات الحيوية بأقطار 6.3 ملم. دلت النتائج عن وجود مقاومة واضحة من قبل العزلات المرضية للمضادات الحيوية المستخدمة ما عدى مضادي الجنتامايسين والتوبرامايسين اللذين أعطت العزلات المرضية حساسية تجاهها. أما العزلات البرية فكانت هناك حساسية واضحة تجاه مضادات التوبرامايسين والجنتامايسين والرافاميسين وبشكل اقل تجاه مضادات الاموكسلين ومقاومة لمضاد السيفوتاكسيم. تشير هذه النتائج إلى مدى التقارب في استجابة العزلات البكتيرية لكلا المصدرين للعوامل الفعالة أو القاتلة سواء للمضادات الحيوية أو المستخلصات النباتية وقد يعود ذلك إلى إنتاج البكتريا لأنزيمات محورة أو بسبب تقليل حاجز النفاذية(23) أو قد يعود إلى الاستخدام الواسع والعشوائي للمضادات الحيوية(24) والذي بات مشكلة صحية عالمية مما يدعم ضرورة إجراء فحص الحساسية للمضاد قبل الاستخدام(25).

3. **تأثير المستخلصات النباتية على إنتاج صبغة البايوسياتين:** زرعت بكتريا *P. aeruginosa* على أوساط زرعية تحتوي على مستخلصات نباتية ذات مواد فعالة التأثير على الأحياء الدقيقة أثرت هذه المواد على إنتاج صبغة البايوسيانين (الخضراء – المزرقة) وبالتالي على لون الصبغة الناتجة من البكتريا لكلا المصدرين (المرضية والبرية) على حد سواء. فقد لوحظ تأثير وجود مستخلص القرنفل واليوكالبتوس على ظهور لون الصبغة بلون اخضر فاتح مصفر في حين أظهر مستخلص بذور الخروع أنتاج غزير أو محفز لصبغة البايوسيانين على عكس بقية المستخلصات الأخرى التي تنتج عن وجودها ظهور الوسط بلون أخضر فاتح جداً. ويمكن تفسير ذلك في آلية دخول المواد الفعالة للمستخلصات النباتية إلى داخل الخلية البكتيرية وبالتالي التأثير على مواقع إنتاج صبغة البايوسيانين لكونها احد مكونات الوسط الغذائي لها كما هي الحال في تأثير وجود المضادات الحيوية الصناعية داخل الخلية البكتيرية ويمكن ان يكون هذا التأثير في مواقع جينية(26) أو في تحديد بعض الآليات في مراحل تصنيع الصبغة(27). وقد يعزى أيضا لجدار البكتريا المكون من Lipopolsaccaride في مقاومة البكتريا للمادة الفعالة للزيت الطيار *Foeniculum vulgarae* عند تركيز 9500 ppm (28). كما لوحظ ان للمستخلص المائي لليوكالبتوس فعالية تثبيطية اعلى من المستخلص الكحولي له على العزلات البكتيرية المقاومة للمضادات الحيوية في حين كان له تأثير مهدئ عند إعطاءه بجرعة 5 غم/ كغم للفئران المختبرية(29).

جدول (1) معدل أقطار منطقة تثبيط المستخلصات النباتية مقاسة بـ(الملم) للعزلات البكتيرية

المستخلصات النباتية العزلات البكتيرية	الثوم	بذور القطن	القرنفل	بذور الخروع	ورق اليوكالبتوس	قلف اليوكالبتوس
P.aeruginos (مرضية)	20	18	26	R	20	18
P.aeruginos (برية)	31	23	33	12	32	31

R: لا يوجد تأثير تثبيطي.

جدول (2) استجابة العزلات البكتيرية المدروسة ضد المضادات الحيوية القياسية

ت	المضاد الحيوي	عزلات *P.aeruginos* (مرضية)	عزلات *P.aeruginos* (البرية)
.1	Tobramycin	S	S
.2	Refampcin	R	S
.3	Gentamycin	S	S
.4	Cefotacim	R	R
.5	Amoxicillin	R	R

R: مقاومة للمضاد الحيوي، S: حساسة للمضاد الحيوي.

جدول (3) تتابع لون الوسط السائل في وجود المستخلصات النباتية المستخدمة ضد العزلات البكتيرية

العزلات البكتيرية	تأثير المستخلصات النباتية على إنتاج صبغة البايوسيانين					
	الثوم	بذور القطن	القرنفل	بذور الخروع	ورق اليوكالبتوس	قلف اليوكالبتوس
P.aeruginosa المرضية	اخضر فاتح جدا	اخضر فاتح جدا	اخضر فاتح	اخضر مزرق	اخضر فاتح مصفر	اخضر فاتح جدا
P.aeruginosa البرية	اخضر فاتح	اخضر فاتح جدا	اخضر فاتح مصفر	اخضر غامق	اخضر فاتح	اصفر
control *P.aeruginosa* السيطرة	لون	اخضر	مزرق	غامق		

المصادر

1. الجبوري، محميد مد الله (1990). عالم البكتريا الطبية، مطابع التعليم العالي، جامعة الموصل، العراق.
2. Matsumoto, T.; Tateda, K.; Miyazaki, S.; Furuya, N.; Ohno, A.; Ishii, Y.; Hirakata, Y. & Yamaguchi, K. (1998). Effect of immunisation with Pseudomonas aeruginosa on gut-derived sepsis in mice. J. Med. Microbiol., 47 (4): 295-301.
3. Fyfe, J.; Harris, G. & Govan, J. (1948). Revised pyocianin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Microbiol., 20: 47-50.
4. Hassan, H. M. & Fridovich, I. (1980). Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. J. Bacteriol., 141(1): 156-163.
5. Sanders, C. C. (1992). Beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. Clin. Infect. Dis., 14 (5): 1089-1099.
6. Al- Rawi, A. & Chakaravaty, H. L. (1988). Medical plant of Iraq. 2nd ed., Ministry of agriculture and irrigation, Baghdad, Iraq.
7. Zhang, X. (1998). Regulatory situation of herbal medicine world health organization, Geneva.
8. Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. & Simmons, A. (1990). Mackie and Mccartey practical medical microbiology. 14th ed. Churchill living stone Inc., New York.
9. Greenwood, D.; Slack, R. & Peathere, J. (1998). Medical microbiology. 15th ed., Churchill Livingstone, Inc.
10. Garrity, M. G.; Bell, J. A. & Liburm, T. (2005). Pseudomonas in Bergey's manual of systematic bacteriology. (Breuner, D. J.; Krieg, N. R. & Staley, J. T. (editors). PP. 322-352.
11. Fehri, B.; Aiache, J.; Memmi, A.; Korbi, S. & Lamaison, J. (1994). Hpotension, Hypolgy cemia, Hypouricemia record after repeated administration of aqueous leaf extract of oleaeuropae L. J. Pharm. Belg., 49(2): 101-108.
12. Mahmood, M. J.; Jawad, A. J.; Hussain, A. M.; Al-Omeri, M. & Al-Naib, A. (1989). In vitro antimicrobial activity of *Salsola rosmarinus* and *Adiantum capillusvenris*. Int. J. Crude. Drug. Res., 27: 14-16.
13. Bauer, A. W.; Kirbay, W. A. W.; Sherris, J. S. & Turk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by astanderised single disc method. Am. J. E. (1965). plant Biochemistry. New York, Academic press.
14. Vandepitte, J.; Engback, K.; Piot, P. & Heu, K. C. (1991). Basic Laboratory procedures in clinical Bacteriology. World health Organization, Geneva.
15. Lisin, G.; Safiyev, S. & Craker, L. E. (1999). Antimicrobial activity of some essential oil. II WOCMAP Congress Medicinal and Aromatic Plants, Part 2: Pharmacognosy, Pharmacology, Phytomedicine, Toxicology.
16. Nichollas, C. (2000). Aromatic medicine in the treatment of infections. British J. Phytomedicine, 5 (1): 22- 24.
17. Pauli, A. & Kiubezka, K. H. (1996). Evaluation of inihitory data of essential oil constituents obtained with different microbiological testing methods. Pharmology, University of Baghdad.
18. Tragoolpua, K.; Thirach, P.; Punjaisee, S.; Khamwan, C. & Jatisatiener, C. (2001). Antifungial activity of some medical plant extracts against *candida albicans* and *Cryptococcus Meoformans*. World conference on Medical and Aromatic plant. Budapest. Hungary.
19. Baudoux, D. (2002). Antiviral and antimicrobial properties of essential oil. Complementary Medicine Magazine.
20. Navarro, V.; Villarreal, M.; Rojas, G. & Lozoya, X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plant used in Mexican traditional medicine for the treatment of infection diseases. J. Ethnopharmacol., 53: 143-147.

21. Lee, X. C.; Shin, D. S.; Oh, C. X. & Kimm, K. S. (2001). Antimicrobial activities of alliin-alliinase reaction product and mephylene chloride extract of garlic. Annual Meeting New Orleans.

22. المحنة، إيناس كريم هادي (2002). تأثير مستخلصات بعض النباتات العراقية على الاحياء المجهرية المعزولة من مناطق جسمية مختلفة. رسالة ماجستير، كلية العلوم. الجامعة المستنصرية، العراق.

23. Wilcox, M. H.; Winstantaney, T. G. & Spencer, R. C. (1994). Outer member protein Profiles of xanthomonasmalto philia Isolates displaying temperature.

24. Gopal, R. G. (1998). Risk factors for the spread of Antibiotic- Resistant bacteria. Drugs., 55(3): 323-330.

25. العكيلي، عدنان حنون عباس (2000). دراسة تأثير حامض الخليك وبعض المستخلصات النباتية في محو إصابات الحروق. رسالة ماجستير، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

26. Kong, K. J.; Ayawardena, S. R.; Indulkar, S. D.; Puerto, A.; Koh, C.; Hoiby, N. & Mathee, K. (2005). *Poseudomonas aeruginosa* Amp^R is a global transcriptional factor that Regulates expression of Amp^c and pox B-Lactamase, protases, Quoraum sensing and other virulence factors. J. Antimicrobial. Agents and Chemother., 49(11): 4567- 4575.

27. Portoles, A.; Espinosa, M. & Hidalgo, A. (1971). Pencillin and polymycin effects on the chromogensis of *Pseadomonas aeruginosa* strains of antibiotics. XXIV. (4): 266- 269.

28. مؤيد، هالة؛ عبد الحسين، ثريا وعبد اللطيف، رغد (2011). تأثير الزيت الطيار المستخلص من أوراق نبات اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulenses* في بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام. مجلة علوم المستنصرية. 22 (4): 1- 12.

29. النعيمي، حنان عدنان؛ الثويني، آمنة نعمة والطحان، فريد جميل (2008). تقييم فعالية المستخلصين المائي والكحولي لأوراق اليوكالبتوس *Eucalyptus camaldulensis* في تثبيط نمو البكتريا المرضية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من مرضى مصابون بالتهاب لبلعوم واللوزتين. المجلة العراقية للعلوم. 49 (2): 82- 89.