

التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لقشور الرمان على عزلات *Escherichia coli* الممرضة ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

صهيب صباح قاسم الصالحي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم/ جامعة كركوك

smay1963@yahoo.com

تاريخ قبول البحث: 2014/4/15

تاريخ استلام البحث: 2013/11/20

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى معرفة الفعالية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان على عدد من عزلات بكتريا *Escherichia coli* الممرضة ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية . اذ تم الحصول على 20 عزلة من بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات مرضية من مستشفى الاطفال في مدينة كركوك وتم اجراء الاختبارات التشخيصية (التأكيدية) عليها حسب الطرائق المتبعة في التشخيص . اوضحت النتائج فحص حساسية للمضادات الحيوية ان جميع العزلات كانت مقاومة لكل من (Amoxiclave(AMC و Ceftriaxone(CRO) و Carbenicillin (PY) وبنسبة 100% في حين لم تظهر اي من العزلات مقاومة تجاه المضادات الحيوية (Imipenem (IPM), Gentamicine CN) وامتلكت هذه العزلات صفة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية ابتداءً من ثلاثة الى ستة مضادات حيوية وان AMC, CRO, PY كانت نمط المقاومة الاكثر شيوعاً . من جانب اخر بينت نتائج الدراسة حساسية هذه العزلات وبنسبة 100% للتركيزين (100 ملغم/مل و 50 ملغم/مل) من المستخلص المائي لقشور الرمان و 25% لتركيز 25 ملغم/مل في حين لم يظهر اي تأثير تثبيطي عند التركيز (12.5 ملغم/مل) .

الكلمات الدالة: مضادات حيوية ، *E.coli* ، مستخلص مائي ، قشور الرمان .

Inhibitory Effect of Aqueous Extract of Pomegranate Peel on *Escherichia Coli* Isolates with Multiple Resistance to Antibiotics

Sohaib Sabah Al-Salihi

University of Kirkuk -College of Science-Department of Biology

Received date: 20/11/2013

Accepted date: 2014/4/15

Abstract

This study was aimed to investigate the inhibitory activities of the aqueous extract of pomegranate peel on a pathogenic isolates of *E.coli* had multi-resistance characteristic against antibiotics. Twenty pathological isolates of *E.coli* were taken from the laboratory of the Kirkuk Children's Hospital and confirmation of these isolates was done by using diagnostic methods.

The results of the antibiotics sensitivity test showed that all isolates were resistant to AMC , CRO and PY 100% , while no one of them showing any resistance to CN, IPM and these isolates possessed multiple resistance patterns to the antibiotics from three to six antibiotics and the pattern of the resistant (AMC , CRO , PY) was more common among the isolates on other hand, the results indicated that all isolates sensitized 100% to the concentration 100 mg / ml and 50 mg / ml of the aqueous extract and 25% were sensitized to the concentration of 25 mg / ml, while did not show any inhibitory in the concentration of 12.5%.

Key words: pomegranate peel , aqueous extract , *E.coli* , Antibiotics .

المقدمة

تعد الـ *E.coli* من البكتريا واسعة الانتشار في الطبيعة تعيش في امعاء الانسان والثدييات و تتواجد في التربة والمياه السطحية الملوثة ببراز الانسان والحيوان معظم انواعها غير مرضه الا ان بعضها يصبح ممرضة بعد اكتسابها عوامل الضراوة افقيا ومن هذه الامراض التهابات المجاري البولية والاسهال وتجترثم الدم وغيرها. وهي عصيات سالبة لصبغة كرام متحركة عموما. تخمر سكر الكلوكوز مع ظهور حامض و غاز و تولد الاندول و تفرز انزيم β .galactosidase ولايمكنها تحليل الجلاتين وتكون سالبة لانتاج انزيم اليوريز و استهلاك السترات كمصدر الوحيد للكربون و انتاج H_2S [1 , 2].

ازداد الاهتمام مؤخرا الى استعمال الادوية المعزولة من الاعشاب والنباتات المختلفة كمواد علاجية ضد الجراثيم المرضية لضمان فعاليتها من جهة ولامانها واقتصاديتها من جهة اخرى .كما اثبتت النباتات والاعشاب الطبية قدرتها الفاعلة في معالجة الكثير من الامراض واثار جانبية محدودة لا تكاد تذكر مقارنة مع الادوية الكيماوية ذات التأثيرات الجانبية [3,4]. ومن بين هذه النباتات الرمان وهو ثمار شجرة *Punica granatum* ويسمى باللغة الانكليزية Pomegranate ويعود الى العائلة الرمانية Punicaceae موطنه الاصلي غرب اسيا ويزرع في معظم المناطق العربية خصوصا حوض البحر الابيض المتوسط والعراق و بلاد الشام [5] . تمتلك الأجزاء المختلفة لشجرة الرمان فاعليات طبية متنوعة واستخدمت بصورة واسعة في مجال الطب الشعبي في عدد كبير من بلدان العالم [6] وأشادت دراسات عديدة إن لقشور ثمرة الرمان خواصاً علاجية متعددة منها فعلها المضاد للأكسدة [7] والفعل المحفز للجهاز المناعي [8] والتأثير القاتل لليرقات الضارة [9] والفعل المضاد للسرطان [10] والتأثير الخافض لسكر الدم [11] والفعل المضاد للميكروبات [12] من خلال احتوائها على مركبات alkaloids, glycosides flavonoids, polyphenol, tannin وبالاخص مركبات tannin والتي تبلغ نسبتها في القشور حوالي 25% والتي لها فعالية ضد مايكروبية عالية من خلال ارتباطها بالبروتينات وتكوين معقد مع جدار الخلية مسببة تحطم الخلايا البكتيرية [13]. كما وانها ذات فعالية تثبيطية ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام [14 , 15].

ويسبب تطور ظاهرة مقاومة المتعددة لجراثيم *E.coli* للمضادات الحيوية وقدرتها على انتاج انزيمات البيتا لكتاميز الواسعة الطيف [16] اضافة الى التأثيرات الجانبية لبعض هذه المضادات الحيوية [17]، لذلك كان الهدف من هذه الدراسة معرفة الفعالية التثبيطية لقشور الرمان على عزلات *E.coli* ذات المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية والتي قد تساهم في ايجاد بدائل للمواد المثبطة لبكتريا *E.coli*.

المواد وطرائق العمل

العزلات الجرثومية :- تم الحصول على 20 عزلة من بكتريا *E.coli* المعزولة من عينات مرضية من مختبرات مستشفى اطفال في مدينة كركوك والمشخصة بشكل اولي وتم إعادة تشخيصها اعتماداً على الطرائق المتبعة في التشخيص العلمي في مختبرات كلية العلوم - جامعة كركوك [18-20] و حفظت هذه العزلات على مائل اكارالمغذي Nutrient agar (Slant) وبدرجة حرارة 4°C لحين الاستعمال مع مراعاة ادامة العزلات دورياً كل اسبوعين وإعادة زرعها لتثبيطها طيلة فترة الدراسة [21].

دراسة حساسية العزلات للمضادات الحيوية : استعملت طريقة الانتشار في الوسط الصلب طبقاً لطريقة [22] باستخدام اقراص المضادات الحيوية المذكورة في جدول (1).

جدول (1) المضادات الحيوية المستخدمة في هذه الدراسة

اسم الشركة المنتجة	المركز / mcg	الرمز	اسم المضاد الحيوي	ت
Bioanalyse	30	CRO	Ceftriaxone	1
Bioanalyse	10	CN	Gentamicin	2
Bioanalyse	20 / 10	AMC	Amoxiclave	3
Bioanalyse	30	TE	Tetracycline	4
Bioanalyse	5	CIP	Ciprofloxacin	5
Bioanalyse	10	IPM	Imipenem	6
Bioanalyse	100	PY	Carbenicillin	7

إذ نقلت (3 - 5) مستعمرات نقية من البكتريا باستخدام العروة (Loop) ولقحت بها انبوبة حاوية على (5) مل من Nutrient broth وحضنت في درجة 37°C لمدة (2 - 5) ساعات لحين ظهور النمو من خلال تكون العكورة التي يمكن ان نشاهد بالعين المجردة ، وتم مقارنتها مع انبوبة الاختبار القياسية McFarland (10 X10⁸ خلية / مليلتر) ، بعدها غمرت القطيلة (المسحة الفطنية) المعقمة في الانبوبة لحين تشبعها بالمزرعة ، وبعدها ضغطت القطيلة بالجدار الداخلي للانبوبة لتتخلص من الكمية الزائدة من المزرعة ومسحت القطيلة على سطح الوسط الزرعى الصلب Muller-Hinton agar ، وتركت الاطباق في حرارة الغرفة لمدة (20 - 30) دقيقة لغرض امتصاص اللقاح ثم بواسطة ملقط معقم وضعت اقراص المضادات الحيوية على سطح الوسط الزرعى وحضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة 37°C ولمدة 24 ساعة . تم قراءة النتائج من خلال قياس قطر التثبيط باستخدام المسطرة.

قشور الرمان :- جمعت عينات من ثمار الرمان من الاسواق المحلية في مدينة كركوك و غسلت بالماء ، وبعدها فصلت القشور عن باقي اجزاء الثمرة وجففت في درجة حرارة الغرفة ثم طحنت في الطاحونة الكهربائية المنزلية للحصول على المسحوق الجاف و حفظت في علب زجاجية محكمة الغلق لحين الاستعمال .

تحضير المستخلص المائي لقشور الرمان :- تم الحصول على المستخلص المائي وذلك بوزن 50 غم من المسحوق و وضعها في دورق نظيف ومعقم مع اضافة 500 مل من الماء المقطر المعقم ثم مزجها بالتحريك المغناطيسي لمدة 24 ساعة وفي درجة حرارة الغرفة وترشح المزيج باستعمال ورق ترشيح من نوع Whattman No.2 و فصل الراشح بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 15 دقيقة وتجميفها باستعمال الفرن الكهربائي بدرجة الحرارة 45°C - 50 لتبخير الماء والحصول على مسحوق جاف [24,23] .

تحضير التراكيز المختلفة لمستخلص قشور الرمان :- حضر من اذابة 1 غم من مجفف مستخلص قشور الرمان في 10 مل من الماء المقطر والمعقم للحصول على تركيز (100 ملغم/مل) وحضرت منه بقية التراكيز وهي (50 ملغم/مل ، 25 ملغم/مل ، 12.5 ملغم/مل) وتم تعقيم التراكيز باستخدام المرشحات الغشائية (Millipore filter 0.45µm) الذي يمنع مرور الجراثيم من خلالها [25].

اختبار حساسية الجراثيم للمستخلص المائي لقشور الرمان : تم اختبار القابلية التثبيطية للمستخلص المائي لقشور الرمان ضد عزلات ال *E.coli* في الاطباق الزرعية بطريقة الحفر Agar Well diffusion method [16] حيث تم عمل حفر في الاطباق الحاوية على Muller Hinton agar المحضرة مسبقاً بواسطة ثاقب الفلين المعقم وبقطر 6 ملم . ثم نشر العالق البكتيري المحضرة حسب الطريقة المذكورة في الفقرة السابقة على الوسط الزرعى و تركت الاطباق بدرجة حرارة الغرفة لمدة (20 - 30) دقيقة وذلك لغرض امتصاص اللقاح . وبواسطة ماصة دقيقة تم نقل (100) مايكروليتر من كل تركيز من تراكيز المستخلص الى داخل الحفر مع وضع الماء المقطر المعقم في حفرة اخرى كسيطرة ثم حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37°C لمدة 24 ساعة وبعد ذلك تم قراءة النتيجة بقياس منطقة التثبيط حول الحفر بواسطة المسطرة [26].

النتائج والمناقشة

تم الحصول على 20 عزلة لبكتريا ال *E.coli* من مختبرات مستشفى الاطفال في مدينة كركوك.ومن خلال تأكيد التشخيص في مختبراتنا تبين انها جميعا تعود الى النوع *E.coli* بعد اجراء الاختبارات التشخيصية المختلفة [18-20]. كما وجد من إختبار حساسية 20 عزلة تجاه سبعة انواع من المضادات الحيوية والمبيئة في الجدول (2) ان جميع العزلات حساسة للمضادين Imipenem و Gentamicine اما المضادات Amoxiclave و Ceftriaxone و Carbenicillin فكانت جميع العزلات مقاومة لها بنسبة (100 %) ووجد ان نمط المقاومة PY, AMC,CRO هو شائع في جميع العزلات بينما كان نمط المقاومة PY+CRO+AMC+TE+CIP+CN اقل أنماط المقاومة شيوعاً إذ وجدا في عزلة واحدة (جدول 3).

جدول (2) يوضح حساسية ومقاومة عزلات *E.coli* لمختلف المضادات واقطار التثبيط للعزلات الحساسة (ملم)

المضادات الحيوية							<i>E.coli</i> رقم العزلة
PY	TE	CN	CRO	IPM	CIP	AMC	
R	R	20	R	30	30	R	1
R	R	25	R	35	30	R	2
R	R	R	R	35	R	R	3
R	R	15	R	35	15	R	4
R	R	15	R	35	15	R	5
R	R	25	R	35	R	R	6
R	R	25	R	30	R	R	7
R	R	20	R	35	10	R	8
R	R	10	R	30	R	R	9
R	15	30	R	35	30	R	10
R	R	10	R	35	30	R	11
R	R	10	R	35	R	R	12
R	R	15	R	30	R	R	13
R	R	25	R	30	R	R	14
R	R	25	R	35	R	R	15
R	R	10	R	30	35	R	16
R	R	15	R	35	R	R	17
R	20	25	R	35	R	R	18
R	R	30	R	37	35	R	19
R	10	10	R	30	10	R	20
20 (100%)	17 (85%)	0	20 (100%)	0	10 (50%)	20 (100%)	العدد الكلي للعزلات المقاومة

جدول رقم (3) يوضح النسبة المئوية للمقاومة للمتعددة للمضادات الحيوية.

ت	انماط المضادات الحيوية	العدد الكلي	عدد العزلات المقاومة	%
1	Py+CRO+AMC	20	20	100
2	Py+CRO+AMC+TE	20	17	85
3	Py+CRO+AMC+TE+CIP	20	8	40
4	Py+CRO+AMC+TE+CIP+CN	20	1	5

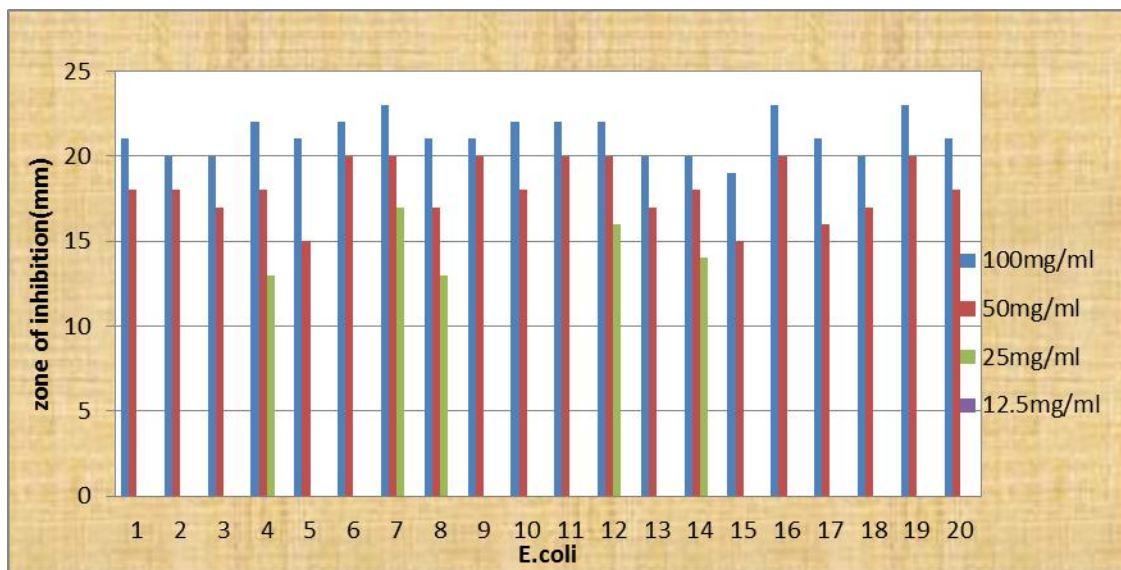
ان النسبة العالية لمقاومة 100% لكل من AMC و CRO و PY قد يعود الى قابلية هذه العزلات على انتاج انزيمات ال β -lactamase المحللة لحلقة البيتا لاكتام في مضادات البيتا لاكتام [16]. ومن جانب اخر اظهرت العزلات الدراسة الحالية نسبة مقاومة 50% و 85% لكل من CIP و TE على التوالي حيث ان المضاد CIP من المضادات الحديثة نوعا ما مقارنة بمضادات البيتا لاكتام المستخدمة في الدراسة الحالية وبالتالي فهي من الممكن ان تصل الى المادة

النوعية للبكتريا وتؤدي الى التأثير على انزيم DNAgyrase وبالتالي تثبط نمو هذه البكتريا [27] وهذه النتيجة تتفق مع دراسات اخرى اظهرت فعالية ال CIP على البكتريا [28].

اما بالنسبة للمضاد TE فهو يعتبر من المضادات المستخدمة بشكل واسع في العلاج وبالتالي ممكن ان تكون هذه الجراثيم قد اكتسبت صفة المقاومة لهذه المضادات وان هذه النتيجة مقارنة الى حد ما مع ما توصل اليه الباحثة جابك [29] حيث وجدت ان نسبة المقاومة لهذا المضاد 84.2%. اما بالنسبة للمضاد IPM فقد وجد بانه تؤثر على جميع العزلات المستخدمة في هذه الدراسة وقد يعود السبب في ذلك الى قلة استخدامه مقارنة مع المضادات الاخرى وبالتالي قلة حدوث عمليات انتقال المقاومة بين البكتريا لهذا المضاد وأن هذه النتيجة تتوافق مع ما توصل إليه [30]. اما بالنسبة للمضاد CN فهو من مجموعة مضادات الامينوكلايوسيدات الواسعة الاستخدام خاصة للبكتريا السالبة لملون كرام [27].

كما اظهرت نتائج الدراسة ان جميع العزلات كانت تمتلك صفة المقاومة المتعددة لثلاث مضادات حيوية (AMC وPYCRO) وبنسبة 100% في حين وجد ان عزلة واحدة كانت تمتلك صفة المقاومة لستة مضادات حيوية (PY+CRO+AMC+TE+CIP+CN) اي بنسبة 5% (جدول 3). وهذا يتوافق مع ما توصل اليه [16,31]. ويرجع ظهور أنماط المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية نتيجة للتغيرات الوراثية في الخلية البكتيرية كحصول طفرات وراثية تلقائية في المواقع المسيطرة على الحساسية للمضادات الحيوية التي تؤدي إلى ظهور المقاومة الكروموسومية لهذه المضادات أو قد تحمل جينات المقاومة للمضادات الحيوية على البلازميدات أو العوامل القافزة. كما وان احد الاسباب الرئيسية لظهور عزلات مقاومة هو الاستخدام العشوائي للمضادات الحيوية دون الاعتماد على إجراء فحص الحساسية لها، مما يزيد من ظهور سلالات مقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة في العلاج [30].

يتضح من الشكل (1) ان جميع العزلات كانت حساسة للمستخلص المائي لقشور الرمان وبنسبة 100% للتركيزين 100ملغم/مل و 50ملغم/مل وبقطار تثبيطية متقاربة في حين ان 25% من العزلات اظهرت حساسية للتركيز 25 ملغم/مل بينما انعدم التأثير عند 12.5ملغم/مل وهذا يدل على تخفيف تركيز المادة الفعالة في المستخلص بتركيز 12.5 ملغم/مل وهذا مما يؤكد على التناسب الطردي بين تركيز المواد الفعالة في المستخلص على تثبيط النمو. وهذه النتائج تؤكد على ما جاء في الدراسات الاخرى حول تأثير تراكيز المختلفة لمستخلص المائي لقشور الرمان على عزلات *E. coli* [32,33].



شكل (1) تأثير تراكيز مستخلص المائي لقشور الرمان (مقاس اقطار التثبيط بالملم)

كما تبين من هذه الدراسة ان العزلات المقاومة لعدة المضادات حيوية قد تكون جميعها حساسة لتراكيز العالية من المستخلص المائي لقشور الرمان ربما يعود السبب في تأثيرها السلبي على نمو البكتريا الى واحد او اكثر من المكونات الكيميائية التي تحتويها قشور الرمان اذ ان تواجد المواد العفصية مثل Tannine قد يؤثر على طبقة البروتينات في الجراثيم مما يؤدي الى قتلها او ربما يؤثر على الغشاء البلازمي مغيراً بذلك خواصها الوظيفية وهذا يؤدي الى تثبيط النمو البكتيري [34-36] كذلك تواجد Polyphenol و Flavonoids و Ellagic acid و Triterpens في المستخلصات المائية لقشور الرمان والمعروفة في فعلها المضاد للميكروبات وبالتالي فان الفعل المضاد للجراثيم لخالصة قشور الرمان تعود الى الفعل التآزري لهذه المركبات [37,38].

التوصيات

استنادا للنتائج المستحصلة من هذه الدراسة نوصي بالتوسع في دراسة مستخلصات النباتات لغرض تحديد المركبات الذائبة عند الاستخلاص المائي والكحولي، وبالتوسع في دراسة الفعالية التثبيط لانواع اخرى من العزلات البكتيرية لغرض استخدامها في المعالجة على نطاق اوسع بدلا عن المواد الكيميائية في المعالجة.

المصادر

- [1] الشبيب ، اسفار شهاب . (1998) . علم الاحياء الدقيقة المعوية . مكتبة دار الثقافة للنشر والتوزيع . عمان . الاردن
- [2] Jawetz, M.; Adelberg, E. A.; Brooks, G. F.; Butel, and Morse, S, A. (2007). Medical microbiology 24 edition p253 McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York .USA.
- [3] المياحي، عبد الرضا اكبر علوان (2001).النباتات الطبية والتداوي بالاعشاب ط(1)،مركز عبادي للدراسات والنشر، صنعاء، 291ص.
- [4] Glombitaz, K.W.; Mahran, G.H.; Mirhon, Y.W.; Michel, K.G. and Motawi, T.K. (1994). Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of zizyophus sinachrist in rats. Plan. Med., 60:244-247.
- [5] Vanisree , M.; Lee , C.Y.; Lo , S.F.; Nalawade , S.M.; Lin , C. and Tsay ,H.S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture . Bot. Bull. Acad. Sin. 45:1-22.
- [6] Chidambara , K . ; Jayaprakasha , G . K . and Singh , R . P . (2002) . Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) Peel extract using in vivo models . J . Agric . Food chem . 50 :4791-4795.
- [7] Singh, R.P.; Chidambara, M. and Jayaprakasha, G.K. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*punica granatum*) peels and seeds extracts using in vitro models. J. Agric. Food chem. 50:81-86.
- [8] Gracious , R . R.; Selvasubramanian , S . and Jayasundar . S . (2001) . Immunomodulatory activity of punica granatum in rabbit apreliminary study . J . Ethnopharm . 78 : 85-89 .
- [9] Morsy , T . A . ; Mazyad , S . A . and El-Sharkawy , A . (1998) . The larvicidal activity of solvent extracts of three medicinal plant aganits third instar larvae of chrysomyia albiceps . J . Egypt . Soc . Parasitol . 28 :699 .
- [10] Mavhjanav, S.M.; Islambekov, S.Y.; Karimdzhanav, A. and Alsmailov, A. (1997). Polyphenols of pomegranate peels show marked antitumor and antiviral action . Khim. Pri. Soedin. 33:124.

- [11] Khalil,E.A.(2004).Antidiabetic effect of an aqueous extract of pomegra-natum L.peels in normal and alloxan diabetic rats.J.Egypt of hosp.Med. 16:92-99.
- [12] Navarro,V.;Villarrwal,M.;Rojas,G and Lozoya,Y.(1996).Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases.J.Ethnopharma.53:143.
- [13] الحمدو،ميسون منذر وفرج ديمة نزار (2009).تأثير المستخلصات المائية والكحولية لقشور الرمان على انتاج انزيم الهيمولايسين لبعض الانواع البكتيرية. مجلة بغداد للعلوم- مجلد 7.
- [14] Hoffmann, D. (1996). The complete illustrated holistic herbal, a safe practical guide for making and using herbal remedies lement book. Great Britain. 132 P.
- [15] Prashanth. D. Ash.,M-K;and Amit.A.,(2001) Antibacterial activity of *Punica granatum*. Fitoterapia 72 (2): 171P.
- [16] ناجي ، عبد الرحمن سعيد (2008).دراسة تأثير المضادات الحيوية البركة والثوم على جرثومة الايشريشيا كولى المعزولة من مرضى التهاب المجاري البولية في مشفى الاطفال الجامعي .رسالة جامعية.جامعة دمشق.سوريا.
- [17] Cheke , I.,Laxminaraya , R., Bhutta , Z., Duse, A., Jenkins , R. and O Brien, T.(2005).Antimicrobial resistance in developing countries . Part 1 :recent trends and current status . The Lancet infectious Diseases , 5: 481-493.
- [18] Baron, E.J. and finegold, S.M. (1990) . Baily and Scott,s Diagnostic Microbiology 8th. ed. The C.V. mosby company . U.S.A.
- [19] Macfaddin,J.F.(2000). Biochemical test for identification of medical bacteria. 3th ed. Awolters Kluwer Company. Baltimore.
- [20] Forbes, B.A; Sahm, D.F. ; Weissfeld, A.S, and Trevino , E.A. (2002).Bail and Scottu`s Diagnostic Microbiology , 11th ed. Mosby, Inc. St Louisis .
- [21] Collee,J.G. ;Fraser,A.G. ; Marmion,B.P. &Simmons, A.(1996) : Mackie and McCartney`s particle medical microbiology . 14th ed . Churchill Livingston .USA.,Pp:166-170 , 838-839 .
- [22] Baure, A.W.; Kirbay, W.A.W.; Sherries, J.S. and Truk, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by astandarised single disc method Am.J.Clin. Pathol., 45:493-496.
- [23] باقر،ميعاد غالب(2000). استعمال بعض الاعشاب الطبية وقشور الرمان في علاج بعض الاصابات الجلدية الفطرية والبكتيرية،رسالة ماجستير /كلية العلوم/الجامعة المستنصرية
- [24] الامارة،غازي يعقوب عزال و كاظم ،مريم عبد الحسين و حسن،زهرة عباس(2006). علاج الدجاج المحلي المصاب ببفيلي *Eimeria tenella* بمستخلص قشور الرمان المائي وعقار *Tinidazole* . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري.المجلد 5،العدد 2.
- [25] سليمان،خضر داؤد(2011).الدراسة البيولوجية لقشور ثمار الرمان ومكوناتها الفعالة لبعض انواع الجراثيم المعزولة من حالات الاسهال في مدينة الموصل.مجلة التربية والعلم-المجلد(24)،العدد(2).
- [26] Mahmood,M.J.;Jawad,A.J.;Hussain ,A.M.;Al-Omeri,M.and Al-Naib,A.(1989).In vitro antimicrobial activity of Salsola rosmarinus and Adiantum capillusveneris .Int.J.Crude.Drug.Res.27:14-16.
- [27] زين العابدين،صلاح سلمان(2014).الوجيز في المضادات الحيوية . الطبعة الاولى.مكتبة دجلة.
- [28] Hassan , A.(2008).Etiology and antibiotic resistance patterns of urinary tract infections in Thi –Qar Governorate. Journal of Thi-Qar University No.4 Vol.3
- [29] چابك، سرى إحسان عبد.(2010) . دراسة بعض عوامل الضراوة لبكتريا اشيريكييا القولون الممرضة للأمعاء المعزولة من حالات الإسهال الحاد لدى الأطفال الرضع في محافظة بابل. رسالة ماجستير، كلية العلوم-جامعة بابل.

[30] تركي ، احمد محمد و عيد الرحمن، ابراهيم عبد الكريم و عيد، جنان جميل(2012). المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية لبكتريا الإشريكية القولونية الممرضة للمعدة والأمعاء المسببة لإسهال الأطفال ال رضع.مجلة الانبار للعلوم البيطرية.المجلد(5)،العدد(2).

[31] ال اسماعيل، وجيهة عبد الكريم محمد (2007).البكتيريات المسببة لالتهاب المسالك البولية، خاصة ايشيريشيا كولاي ونمط مقاومتها للمضادات الحيوية في المملكة العربية السعودية رسالة ماجستير. جامعة الملك سعود.المملكة العربية السعودية.

[32] Hussein , S.A.M.; Barakat, H.H .; Merfort,I. and Nawwar , M.A.M. (1997).Tannins from the leaves of *Punica granatum* .photochemistry 45:819-823 .

[33] Saeed. S and Tariq. P . (2006). Effect of some seas and vegetable and fruits on the growth of bacteria .pakis.j.Biolog . Scien. 9(8): 1547-1551

[34] Scalbert.A.(1991). Antimicrobial properties of tannins. Chemistry . 30:3875-3883

[35] Ghazouli, K., Kheunouf, S., Amira, S .(1999). Effect of aqueos extracts from *Quercus ilex* L.root bark , *punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba - alba* leaves on ethanol induced gastric damage in rats . Phytother.Res.13: 42-45.

[36] Sumner,M.D.,M.Fliott.eller,G.Weidner,J.J.Daubenmier,M.H.chew,R.Marlin,C. J .Raisin and D.Ornish.(2005) . Effect of pomegranate juice consumption my ocardial per Fusion in patients with coronary heart disease . Am J.cardio .96:810-814 .

[37] Gil, M . I., TOMAS –Barberan. F.A . , Hess - pierce .B . , Holcrofi. D . M . and Kader. A .A ., (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its elation ship with phenolic composition and processing J . Agric food chem. .48:4581-4589.

[38] Seeram , N. P ., L . S . Adams , S . M . Henning , y . N iu , y. Zharg ,M .G. Nair ,and D . Herber . (2005) . Invitro antiproliferation , apoptotic and antioxidant activites of punicalagin , ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polphenols as found in pomegranate juice . J . Nutr. Bioche . 16 (6) : 360-367 .