Antimicrobial Activity of Populous Euphratica Leaves Extract on Growth of Some Gram Negative Bacteria

Jameel M. Badi .
Nuclear researches and applications Directorate, Ministry of Science& Technology.
Email:jameelbadi@yahoo.com
Hassan M.Resen
Nuclear researches and applications Directorate, Ministry of Science& Technology.
Email: resen66h@yahoo.com
Arkan M.Majeed
Nuclear researches and applications Directorate, Ministry of Science& Technology.
Mustafa M.Abd Al razak
Nuclear researches and applications Directorate, Ministry of Science& Technology.

Received on:7/3/2016 & Accepted on:18/8/2016

ABSTRACT:
Three kinds of extracts (hot , boil water and ethanolic extracts) had been prepared from *populous euphratica* leaves .Known chemical reagent was applied to different various function groups(flavonoid , alkaloid , polyphenoles , Tannins, Saponions and Proteins) present in the plant leaves. Different concentration of these extract (120, 180 and 240 mg/ml) were used against various bacterial *spp*.(*Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumonae* ، *Salmonella typhi* , *Shigella sonei* and *Protus mirabilu*s) to detect the antibacterial activity. The result of the antibacterial activity of *populous euphratica* leaves extract has been varied according to the kind of extract used and bacterial *spp*. applied. The results clear that the mean diameter of inhibition zone increased with increasing concentration of the extract used and The results showed that the mean diameter of inhibition zone in the range 4-26 mm for hot water extract , 4-22 mm for boiling water and 2-14 mm for ethanolic extract .Finally , the results of hot water extract plant leaves has shown of the higher biological activity (26 mm) for *E.coli* among other extract of the same concentration(120 , 180 and 240 mg/ml) and 22 mm to extract boiling water in *Shigella soni* The alcoholic extract higher inhibition zone 14 mm recorded in each of the (*Salmonella typhi Shigella soni, Protus mirabilus*).Statistical analysis of the results of all kinds of extracts was showed significant different($p<0.01$).
Keyword: Antibacterial activity, *Populous euphratica,* The effect of plant extracts, Pathogenic bacteria

الفعالية الضد ميكروبية لمستخلص أوراق نبات الغرب (القوغ الفراتي) على بعض أنواع البكتريا السالبة لصبغة كرام

الخلاصة:
تم تحضير ثلاث أنواع من المستخلصات لأوراق نبات الغرب (القوغ الفراتي *Populus euphratica*) وهي المستخلص المائي الحار (Hot water extract) ، المستخلص المائي المغلي (Boiling water extract) والمستخلص الكحولي الايثانولي (Ethanolic extract) . تم التعرف على محتوى النبات من المركبات الفعالة بواسطة الفحوصات الكيميائية الأولية لمستخلص أوراق النبات ، حيث لوحظ احتواء مستخلص أوراق النبات على الفلافونويدات (Flavonoids) ، القلويدات(Alkaloids) ، البولي فينول (Polyphenols) ، التانينات

https://doi.org/10.30684/etj.34.5B.18
2412-0758/University of Technology-Iraq, Baghdad, Iraq
This is an open access article under the CC BY 4.0 license http://creativecommons.org/licenses/by/4.0

(Tannins) ، الكلايكوسيدات(Glycosides) ، الصابونيات(Saponions) والبروتينات(Proteins). استخدمت تراكيز مختلفة من هذه المستخلصات (120،180، 240 ملغم/مل) للكشف عن تاثيرها التثبيطي على انواع مختلفة من البكتريا (*Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumonae* ، *Salmonella typhi* ، *Shigella soni*، *Protus mirabilus*) . تباينت نتائج دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلصات أوراق الغرب باختلاف نوع المستخلص واختلاف نوع البكتريا، وكانت هناك زيادة واضحة في معدل قطر مناطق التثبيط بزيادة تركيز كل من المستخلصات النباتية تجاه نمو البكتريا ، حيث تراوحت معدلات أقطار مناطق التثبيط للمستخلص المائي الحار تجاه نمو البكتريا بين 4 -26 ملم ، 4-22 ملم لمستخلص الماء المغلي و2-14 ملم للمستخلص الايثانولي ومن خلال معدلات أقطار مناطق التثبيط اتضح ان المستخلص المائي الحار لأوراق نبات الغرب كان ذا فعالية واضحة حيث انه سجل أعلى معدلات التثبيط بلغت 26 ملم لبكتريا *E.coli* عند التراكيز 120 ، 180 ، 240 ملغم/مل و22 ملم لمستخلص الماء المغلي في بكتيريا *Shigella soni* اما المستخلص الكحولي فقد سجل اعلى منطقة تثبيط 14 ملم في كل من (*Salmonella typhi, Shigella soni, Protus mirabilus*). نتائج التحليل الاحصائي اظهرت فروقات معنوية واضحة لجميع المستخلصات($p<0.01$).

الكلمات المفتاحية: تثبيط البكتريا، نبات القوغ الفراتي،.تاثير المستخلصات النباتية ، البكتريا المرضية

مقدمة:

توجد العديد من المركبات الكيمائية الدوائية المصنعة المضادة للإحياء المجهرية ، ولكن الكثير من هذه المركبات لها آثار جانبية ، فضلا عن استخدامها المستمر يفقد فعاليتها ويكسب الجراثيم المقاومة ضد هذه المركبات [1] ، [2]. ولهذا أولت العديد من الدول الاهتمام بالنباتات الطبية . ان القيمة الطبية للنباتات تعتمد على المواد الفعالة التي تحويها والتي تعطي تأثير فسيولوجي محدد في جسم الإنسان . حيث استخدمت المواد الفعالة المستخلصة من النباتات الطبية في علاج العديد من الحالات المرضية [3 ،4] ، ولها العديد من التطبيقات العلاجية ضد أمراض عديدة سببها اما البكتريا أو الاعفان أو الفيروسات [5] وازداد الاهتمام باستخدام النباتات الطبية في السنوات الاخيرة وذلك لعدم تسببها في حدوث اضرار جانبية مقارنة بالادوية المصنعة [6]. فضلا عن ذلك عدم وجود او قلة التقارير التي تشير الى مقاومة الميكروبات [7] .

إن المملكة النباتية غنية بمنتجاتها الثانوية والتي تمتلك فعالية مضادة للاحياء المجهرية مثل التانينات (Tannins) والقلويدات (Alkaloids) وغيرها من المركبات الفعالة ، التي لها العديد من التطبيقات العلاجية ، مما دفع الباحثين إلى عزل هذه المركبات الحيوية من أجزاء مختلفة من النبات ، كالسيقان ، الجذور ، الأوراق ، الأزهار والثمار وأصبحت هذه المركبات تدخل في صناعة الأدوية [8] . ونظرا لكون ارض الوطن العربي عموما والعراق خصوصا غنية بإنتاج العديد من النبات الطبية والأعشاب المتنوعة لتوفر البيئة الملائمة وتنوع التضاريس والمناخ [9] . لذا على الباحثين ، إن يبذلوا جهودهم من اجل اكتشاف مثل هذه الثروة الطبيعية ، يتبع جنس القوغ العائلة الصفصافية (Salicaceae) والذي يضم 300 نوع [10] تنتشر بصورة طبيعية على ضفاف الانهار والمناطق الرطبة في وسط وجنوب اوربا ، وسط وغرب اسيا وفي الهملايا وشرق الصين [11] . تنتشر أشجار القوغ الفراتي في العراق منتشرة على ضفاف نهري دجلة والفرات وروافدهما وفي وديان المناطق الشمالية ، ويستعمل القوغ للزينة وتثبيت التربة على ضفاف الأنهار والجداول، وتستخدم أوراقة كمادة علفية للحيوانات و استخدم قلف الأشجار كعقار لعلاج بعض الأورام[12] ، وايضا استخدم القلف والاوراق كعلاج طارد للديدان ، ومسكن للآلام ومعالجة التشنجات[13،14] . كما استخدمت هذه الأشجار في العديد من الصناعات الخشبية المهمة مثل صناعة العجينة الورقية ، الألواح الخشبية ، الشخاط والأعمدة والألواح المضغوطة [15 ، 16].

ان لهذه الدراسة اهمية خاصة لان البكتريا التي تم اختيرها بكتريا مرضية ومعروفة بقدرتها على مقاومة معظم المضادات الحيوية والمتمثلة بتكوين الطبقة الحيوية (Biofilm) على المستعمرات البكتيرية [17] . كوسيلة دفاعية ضد المطهرات الكيمائية (Disinfection) والمضادات الحيوية (Antibiotics) والخلايا البلعمية (Phagocytes) والاجهزة المناعية (Immune system)، وغالبا ماتكون البكتريا السالبة لصبغة جرام(Gram negative) اكثر مقاومة للمضادات الحيوية من البكتريا الموجبة لصبغة جرام(Gram positive) بسبب وجود طبقة السكريات المتعددة-الدهون (Lipopolysaccharide) في الغشاء الخارجي للبكتريا الا ان هذه الحقيقة لاتصح بشكل دائم[18].

يهدف البحث للكشف عن الفعالية المضادة لمستخلصات اوراق نبات الغرب على بعض الانواع من البكتريا المرضية خارج جسم الانسان والكشف عن المواد الفعالة فيها

المواد وطرائق العمل:

المواد

1-جمع العينات النباتية:

جمعت أوراق نبات الغرب (القوغ الفراتي *Populus euphratica*) من ضفاف نهر الغراف في محافظة ذي قار في حزيران عام 2013 ، وصنفت من قبل د.على الموسوي ، قسم علوم الحياة،جامعة بغداد ،العراق ، تم تنظيف أوراق النبات من الأتربة العالقة ووضعت في الظل لتجف ، ثم تم طحنها بطاحونة كهربائية ، ووضع المسحوق النباتي في قنينة زجاجية نظيفة وجافة محكمة الغلق وتم خزنة في الثلاجة لحين استعماله في تحضير مستخلصات مختلفة ودراسة تأثيراتها التثبيطية على بعض الأحياء المجهرية.

2-- العزلات البكتيرية:

تم الحصول على العزلات البكتيرية خلال فترة البحث من مختبر البكتريولوجي في دائرة البيئة والمياه مركز معالجة الملوثات التابعة لوزارة العلوم والتكنولوجيا.

طرائق العمل:

1- تحضير المستخلص المائي الحار(Infusion):

تم نقع 8 غرام من مسحوق الأوراق في 50 مل من الماء الحار المقطر المعقم لمدة ساعة [19] ، ورشح بواسطة ورق ترشيح نوع Whatman No 1 . اخذ الراشح وجفف باستعمال الفرن بدرجة حرارة 40 م°، ثم حفظ في الثلاجة لحين الاستعمال .

2- تحضير المستخلص المائي المغلي(Decoction):

تم نقع 8 غرام من مسحوق الأوراق في 50 مل من الماء المقطر المعقم غلي لمدة 15 دقيقة [19] ، ورشح بواسطة ورق ترشيح نوع Whatman No 1
اخذ الراشح وجفف باستعمال الفرن بدرجة حرارة 40 م°، ثم حفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

3- تحضير المستخلص الكحولي (Ethanol Extraction):

تم نقع 8 غرام من مسحوق الأوراق في 50 مليلتر من الكحول الاثيلي(80%) وترك لمدة 24 ساعة [19] ، ورشح بواسطة ورق ترشيح نوع Whatman No 1 اخذ الراشح وجفف باستعمال الفرن بدرجة حرارة 40 م°، ثم حفظ بالثلاجة لحين الاستعمال.

4 - طريقة الكشف عن المجاميع والمركبات الفعالة الموجودة في مستخلص أوراق النبات قيد الدراسة:

تم الكشف عن القلويدات باستخدام كاشف دراكندروف , Dragendroff reagent وفقا لطريقة [20] ، وكشف عن البروتينات ، الفينولات والفلافونويدات بحسب طريقة [21] استخدم كاشف بايوريت للكشف عن البروتينات، و 1% كلوريد الحديديك للكشف عن الفينولات وكشف عن الفلافونويدات (Flavonoids) باستخدام هيدروكسيد البوتاسيوم 10%. كما تم الكشف عن التانينات والصابونيات في نفس المستخلصات تبعا لطريقة [22]. اما الكلايكوسيدات فكشف عنها باستخدام كاشف بندكت وحسب طريقة [23].

5- تحضير تراكيز المستخلصات المختلفة :

اذيب المستخلص الجاف في المذيب الملائم [19] ، وتم تحضير التراكيز التالية 120 ملغم/1مل، 180ملغم/1مل،240 ملغم/1مل ، لبيان تأثيرها التثبيطي على الأنواع المختلفة من البكتريا(*E. coli* ، *Kle. pneumon*ae ،*Sal. typhi* ،*Shi. soni* ،*Pro. mirabilus*).

6- تحضير اللقاح البكتيري:

استخدمت الطريقة التي ذكرها [24] ، في تحضير اللقاح البكتيري ، وذلك بتنمية البكتريا المنشطة على وسط Nutrient Agar وحضنها بدرجة حرارة 37 م°لمدة 24 ساعة . تم نقل عشر مستعمرات من نوع من البكتريا المستخدمة في التجربة وتحت ظروف التعقيم إلى أنبوبة اختبار تحوي 5 مل من الوسط الغذائي Nutrient Broth

، ثم حضنت بدرجة حرارة 37 م°لمدة 4-6 ساعة وبعدها تم إجراء التخافيف المناسبة لكل نوع من البكتريا بحيث يكون عدد الخلايا الكلي تقريبا بحدود 1×10^7 خلية / مل

7-فحص التاثير التثبيطي للمستخلصات المحضرة من النبات على البكتريا قيد الدراسة:

استخدمت طريقة الانتشار بالحفر(Well agar diffusion) لفحص التاثير التثبيطي للمستخلصات المحضرة على البكتريا قيد الدراسة، واثبتت هذة الطريقة كفاءتها وسهولة اجراءها [25] . استخدمت الحفر (Wells) بدل الاقراص الورقية باستعمال ثاقبة فلينية معقمة وبقطر 6 ملم لثقب الوسط Muller Hintone بعد ان زرعت الاوساط بالبكتريا المذكورة اعلاة بطريقة التخطيط بمقدار 0.1 مل من العالق البكتيري الحاوي على 1.5×10^8 خلية / مل بالمقارنة مع محلول مكفرلاند . تم وضع 0.1 مل من كل تركيز من المستخلص النباتي في الحفر واستخدم الماء المقطر كسيطرة سالبة ثم وضعت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوي ولمدة 24 ساعة ، بعدها سجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط عموديا وأفقيا ثم اخذ معدل القراءتين ، وعملت ثلاث مكررات لهذه التجربة.

8-التحليل الاحصائي:

اجريت التجربة باستخدام التصميم العشوائي الكامل وبثلاث مكررات وتم تحليلها احصائيا باستخدام جدول تحليل التباين(ANOVA) للمتوسط± الخطأ القياسي.

النتائج والمناقشة:

يبين (الجدول رقم 1) نتائج الكشف الأولي الكيميائي عن المركبات والمجاميع الفعالة في مستخلص نبات الغرب ، حيث اظهرت النتائج احتواء أوراق النبات على اغلب المركبات الفعالة التي تم الكشف عنها ، وهي الفلافونويدات (Flavonoids) ، القلويدات(Alkaloids) ، البولي فينول (Polyphenols) ، التانينات (Tannins) ، الكلايكوسيدات (Glycosides) ، الصابونيات (Saponions) والبروتينات (Proteins). أما (الجدول رقم 2) فقد اوضح التأثير التثبيطي لمستخلص الماء الحار لأوراق النبات في تثبيط النمو البكتيري ، أظهرت النتائج تباينا في تاثيرها التثبيطي للبكتريا اعتمادا على نوع البكتريا والتركيز المستخدم .فقد كانت اعلى فعالية تثبيطية للمستخلص المائي الحار(240 ملغم\مل) في نمو بكتريا *E. coli* بمنطقة تثبيط بلغت (26 ملم) تليها ، *Sal. typhi* بمنطقة تثبيط بلغت (22 ملم) ثم *Shi. soni* وال *Kle. Pneumanae* بمنطقة تثبيط بلغت (١٢ ملم) ثم بكتريا ال *Pro. mirabilus* التي وصل قطر منطقة التثبيط (8 ملم) قد يعود السبب إلى طبيعة الجدار الخلوي(Outer membrane) واختلاف نفاذيته [26]. أما (الجدول رقم 3) فيمثل التأثير التثبيطي لمستخلص الماء المغلي ، أظهرت النتائج إن المستخلص الذي تركيزه 240 ملغم/ مل أعلى تأثير تثبيطي تجاه نمو البكتريا *Shi. Soni*بمنطقة تثبيط بلغت (22 ملم) ،*Pro. mirabilus* بمنطقة تثبيط (18 ملم) ، *Sal. Typhi* بمنطقة تثبيط (14 ملم) ، *E.coli* بمنطقة تثبيط (12 ملم) و *Kle. Pneumon*ae بمنطقة تثبيط (8 ملم) ، ومن خلال النتائج نلاحظ إن التأثير التثبيطي للماء المغلي اقل مما هو علية في الماء الحار وقد يعود السبب إلى تأثر بعض المواد الفعالة لأوراق النبات بالغليان وعدم تحملها درجة حرارة 100 مئوي وخاصة المواد البروتينية [19] . أما (الجدول رقم 4) فيوضح تأثير المستخلص الكحولي لأوراق النبات على البكتريا قيد الدراسة فقد اظهر المستخلص الذي تركيزه 240 ملغم/ مل أفضل فعالية تثبيطية تجاه نمو البكتريا *Sal. Typhi* ، *Shi .soni* ، *Pro. Mirabilus* ،حيث بلغت (14 ملم) لكل منهم ، اما *Kle. Pneumon*ae فقد بلغت منطقة التثبيط (12 ملم) و *E.coli* (4 ملم) . نلاحظ من خلال النتائج ان فعاليه المستخلص الكحولي اقل من المستخلص المائي وهذا ما يتفق مع الباحثين الآخرين [27] ، والسبب يعود إلى قابلية المواد الفعالة على الذوبان في الماء بنسبة أعلى مما علية في الكحول مما يزيد من فعالية المستخلص المائي ، إن الفعالية التثبيطية لمستخلص أوراق النبات تعود إلى وجود الفلافونات التي تعرف بقدرتها على تمزيق الأغشية الخلوية عن طريق تكوين معقدات مع البروتينات الخارجة المتواجدة فيها[28] ، كما ان الفينولات تزيد من تنشيط الإنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الايضية الاساسية بتداخلها المتخصص مع البروتينات مما يؤدي إلى مسخها. (Protein denaturation) ومن ثم عدم قدرة البكتريا على الاستمرار بالنمو[29]. كما تقوم القلويدات بالتداخل مع ال DNA لخلايا البكتريا وتثبيط نموها[30]. اظهرت نتائج الدراسات الإحصائية فروقات معنوية واضحة لجميع المستخلصات($p<0.01$).

تأتي نتائج البحث الحالي استجابة للتوصيات والمقالات العلمية المختلفة وخصوصا تلك الصادرة من منظمة الصحة العالمية(World Health Organization) والتي تدعو الى تكثيف الجهد البحثي من اجل زيادة مجالات استخدام وتطبيق النباتات الطبية كمصادر للطب البديل وذلك لمحتواها العالي من المركبات الفعالة حياتيا (Bioactive) ، والتي تؤكد التجارب العلمية أهميتها الصيدلانية.

جدول رقم (1) نتائج الكشف عن المركبات والمجاميع الفعالة بواسطة الكواشف الاستدلالية في مستخلص أوراق نبات الغرب(بمختلف الطرائق).

المركب الفعال	الكاشف المستخدم	دليل الكاشف	مستخلص اوراق القوغ الفراتي
الفلافونات Flavonoids	هيدروكسيد الصوديوم	ظهور راسب اصفر غامق	+
القلويدات Alkaloids	كاشف دراكندروف	راسب بني	+
البولي فينول Polyphenols	كلوريد الحديديك 1%	ظهور لون اخضر مزرق	+
التانيناتTannins	خلات الرصاص 1%	ظهور راسب ابيض هلامي القوام	+
الكلايكوسيداتGlycosides	كاشف بندكت	ظهور راسب احمر	+
الصابونياتSaponins	رج المستخلص المائي	رغوة كثيفة لمدة ساعة	+
البروتيناتProteins	كاشف بايوريت	ظهور لون بنفسجي	+
الدالة الاسية pH	محلول الماء الحا ر 5.3	محلول الماء المغلي 5.5	المحلول الايثانولي 5.5

+ تمثل وجود المادة المراد الكشف عنها.

جدول رقم (2) أقطار مناطق التثبيط لنمو البكتريا المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص الماء الحار لأوراق نبات الغرب لمدة ساعة.

قطر منطقة التثبيط/ملم				
التركيز / اسم البكتريا	Control Mean±SE	120ملغم/مل Mean±SE	180ملغم/مل Mean±SE	240ملغم /مل Mean±SE
Escherichia coli	0.0	14.0±0.73	22.0±0.94	26.0±1.06
Klebsielal pneumonae	0.0	6.0±0.63	8.0±0.38	12.0±1.0
Salmonella typhi	0.0	8.0±0.86	16.0±0.44	22.0±0.4
Shigella soni	0.0	8.0±0.94	12.0±0.32	12.0±1.0
Protus mirabilus	0.0	4.0±0.99	6.0±0.48	8.0±.93

جدول رقم (3) أقطار مناطق التثبيط لنمو البكتريا المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص الماء المغلي لمدة 15 دقيقة لأوراق نبات الغرب.

قطر منطقة التثبيط/ملم				
التركيز / اسم البكتريا	Control Mean±SE	120مل ملغم/ Mean±SE	180ملغم/مل Mean±SE	240ملغم /مل Mean±SE
Escherichia coli	0.0	6.0±1.03	8.0±0.53	12.0±0.55
Klebsielal pneumonae	0.0	4.0±0.63	6.0±0.79	8.0±0.82
Salmonella typhi	0.0	6.0±0.14	12.0±0.65	14.0±0.58
Shigella soni	0.0	12.0±0.37	16.0±0.61	22.0±0.77

Protus mirabilus	0.0	10.0±0.25	12.0±0.38	18.0±0.67

جدول رقم (4) أقطار مناطق التثبيط لنمو البكتريا المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص الكحول الاثيلي لأوراق نبات الغرب لمدة 24 ساعة.

قطر منطقة التثبيط/ملم				
التركيز / اسم البكتريا	**Control Mean±SE**	**120ملغم/مل Mean±SE**	**180ملغم/مل Mean±SE**	**240ملغم /مل Mean±SE**
Escherichia coli	0.0	٢.0±0.33	٢.0±0.56	٤.0±0.36
Klebsielal pneumonae	0.0	٢.0±0.46	٦.0±0.36	١٢.0±0.40
Salmonella typhi	0.0	٢.0±0.39	٤.0±0.40	١٤.0±0.29
Shigella soni	0.0	٢.0±0.41	٤.0±0.30	١٤.0±0.30
Protus mirabilus	0.0	٤.0±0.30	10.0±0.42	١٤.0±0.64

الاستنتاجات:

1-أظهرت جميع مستخلصات أوراق نبات الغرب فعالية تثبيطية لنمو البكتريا المرضية خارج جسم الكائن الحي(الأوساط الزراعية).

2-ان لمستخلص الماء الحار لمدة ساعة فعالية تثبيطية أكثر تجاه نمو البكتريا المرضية.

التوصيات

1-اختبار فعالية مستخلص أوراق نبات الغرب على أنواع أخرى من الأحياء المجهرية.

2-اجراء المزيد من الدراسات واستخلاص المواد الفعالة منها وعزلها وتنقيتها لزيادة تاثيرها على الاحياء المجهرية باستخدام الطرق الحديثة مثل HPLC

3-اجراء التجارب للفعالية التثبيطية للمستخلصات داخل جسم الكائن الحي باستخدام الطرق الحديثة مثل HPLC.

REFERENCES

[1].Chan ED,Iseman MD(2008)Multidrug-resstant and extensively drug resistant tuberculosis:A reVivew.Curr.Opin.Infect.Dis.21:577-595.

[2].Gandhi NR,Moil A, ,Sturm AW,Pawinski R,Govender T,Lalloo U ,Zeller K. Andrews isJ,Friedland G(2006)Extensively drug resistant tuberculosis a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa.Lancet.368:1575-1580.

[3].Kokate CK , Purohit AP. Gokhale SB (2003).Pharmacognosy .39td Edition.Pune:NiraliPrakashn;,p.5112.

[4].Boskababy M H. H Rakhshandad (2006) Antitiussive of *plantagolaceolata* in guinnea Pigs Iran J.Med.Sci :31143-146 .

[5].El Astal ,Z.Y.,Ashour ,A.and Kerrit,A.A.M (2005)Antimacrobial activity of some medicinal plant extract in Palestine.pak J .Med.Sci.21(2):187-193.

[6].Iniaghe,O M. ,S O. Malomo and J.O. ,Adebayo (2009) Proximate composition and phytochemical consituentsof leaves of some aclypha species.Pake.j.Nutrit 8:256-258.

[7].Stephen, U . A. , F. Abiodun, O.Osahon and E.Ewaen (2009) Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Khaya grandifoliola* stem bark.J.Biol.Sci. 9:63-67.

[8].Cowan M.M .(1999) plant production as antimicrobial agents .Clinical Microbiology Reviews ,12(4):564-582.

[9] الدوري ، ص.ص.ص.(2005) تاثير عصائر الليمون الحامض *Citrus Limon* والفلفل الاخضر البارد *Capscumgrossum L* والبصل الاخضر الحلو . *Allium cepa L* على البكتريا المعزولة والملوثة للسلطة .رسالة ماجستير ، كلية ابن الهيثم – جامعة بغداد .

[10].Karrenberg S,Edwads PJ,Kllmann J (2002)The life history of Salicaceae livingin the active zone of floodplains.Freshwat.Biol.47:733-748.

[11].Roiron P.Ali AA, Guendon JL,Carcaillet C.Terral JF(2004)Preuve de l'indigenat de *Populus alba* L.dans le Bassin mediterraneen occidental. C.R.Biol.327:220-226.

[12].Aitchison ,JE.T(1988).The botany of the Afghan Deliminatio commission. Thrans.Linn .Soc.Bot . Lond on ,3(1):1-139.

[13].Khandelwal KR (2008) ،Pharmacognosy Techiques and Experiments.Pune:Nirali Prakashan;2008,p.149-161.

[14].Kalia AN,(2005)Text Book of Industrial Pharmacognosy. 1st Edition New Delhi:CBS Puplishers and distributors;2005,p.1-2.

[15].Smith ,J.H.G.(1980) Growth and yield of poplar in British Columbia. Procceding of The Second Annual Meeting of The Poplar council ,August,51-60.

[16]العبادي ،شيت محمد صالح (1988) .مقارنة بعض السلالات التشريحية والوزن النوعي بين جذور ثلاث سلالات من نوع القوغ لاستخدامه في صناعة العجينة الورقية .رسالة ماجستير –كلية الزراعة والغابات ،جامعة الموصل ،ص.93.

[17].Indrayan A.K.,Sharma A,.Gideria B.s and Gupta C.P. (2002) Antimicrobial activity oddye from Gaesalpina sappan (patang/Braziluvoral) Indian J. Microbial. 42:359-360.

[18].Vukovic N.,Milosvic T., Sukdolak S.and S. (2007) antimicrobial activity of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*.Oxford J.Vol.4:17-20.

[19].Haout A. Cherif. Souraya E. endouz. Abdellatif H .Suzan na D. , H. Sqalli. S. uda and Mohammed Iraqui .(2013) Antimicrobacterial of *populous albva* leaf extracts.J .Med . plant .Res .7(16) : 10 15-1021.

[20]..Al-Machtar .A. J.(1994)Study of some characters drugs in some parasitical Helminthus of some Medical plants in Mice laboratory ;M.Sc. Thesis. Veterinary Midicine Baghdad Univ. (in Arabic).

[21].Harborne J.B(1984) Phytochamical Methods Aguide to Modern Techniques of plant Analysis , London ,New York, chapman 8 HII.2nded

[22].Shihata,I.M(1951).Aphrmacological study of Anagalis arvarsis M.D.Vet. Thesis .Cairo University.

[23]- الشيخلي ، محمد عبد الستار . عبد الجليل ، فريال حسن . والعزاوي ، حسن فياض .الجزء العملي .كلية العلوم .الجامعة.الجامعة المستنصرية .

[24] حسين فوزي ،طه قطب ، النباتات الطبية ، زراعتها ومكوناتها ، دار المريخ للنشر ،الرياض ،١٩٨١

[25] Balows A, Wandepitte J (1987) Bench Level Procedure Manual and basic bacteriology,W.H.O..part 1,p.45.

[26]- Jawetez E, Melinik J,LAdelberg.E Brooks, G EButel J.S and Ornson .L M (1987) Review Medical Microbiology 17thed .Meddle East .Appleton and lange, Norwalk Connection.Los Aloto.

[27].Thankare, M (2004) Pharmacological screening of some medical plant as antimicrobial and feed dditives. Msterthesis, irginia polytechneic Institute and State University. BlaCKburg,.USAVirginia.

[28].Tuschia H., Stato M.,T Linum M.,YokoyamaJ.,OhyamaM.,TanakaT.,Tak asai.and Naimkawa I.(1994) Inhabition of the growth of carcinogenic bacteria invitro by plant flavones experiential 50:846-849.

[29].Hamburger H.and Hostettmann K.(1991)The link between photochemistry and medici ne. Phytochemistry 30:3864-3874.
[30].Phillipson,J.D., and O.Neill,M.J.(1987)New leads tio treatment of Protozoal infection based on natural product molecules.Acat.Pharm.Nord.1:131-144.