فاعلية مستخلصات أجزاء الآس المزروع تجاه بعض الجراثيم الممرضة

ميسون لايقة[1] و عدنان علي نظام[2] و عماد القاضي[3]

تاريخ الإيداع 2014/01/05
قبل للنشر في 2014/04/06

الملخص

أُجريت اختبارات النشاط التثبيطي لمستخلصات (الأسيتون، والإيتانول، والماء) لأجزاء نبات الآس المزروع (*Myrtus communis* L.) (الجذر، والساق، والأوراق، والثمار) بتراكيز (25، 50، 75، 100%) في نوعين من الجراثيم الموجبة بصبغة غرام وخمسة أنواع من الجراثيم السالبة بصبغة غرام التي عُزلت وعُرّفت من عينات مرضية من المختبر الجرثومي في مستشفى الأطفال الجامعي بدمشق، بطريقة الانتشار في الحفر باستعمال وسط موللر – هينتون النوعي.

أظهرت النتائج تبايناً واضحاً لتأثير تركيز مستخلصات الآس في نمو الجراثيم المدروسة، فبازدياد التركيز يزداد قطر التثبيط لنمو الجراثيم، وكانت أفضل النتائج عند التركيز 100%. وتبيّن الدراسة الإحصائية وجود ارتباط إيجابي بين المتغيرات المدروسة، فكان التباين واضحاً في تأثير نوع المستخلص ضمن الجزء النباتي ذاته، ويختلف التأثير بحسب النوع الجرثومي.

وكان تأثير مستخلصات الآس أكثر فعالية في الجراثيم الموجبة بصبغة غرام مما هي عليه في الجراثيم السالبة بصبغة غرام، فقد بلغ قطر التثبيط للمستخلص الأسيتوني للساق 27.78 مم في *Staphylococcus epidermids*، وللثمار27.11 مم في *S. aureus*، وكانت المستخلصات المائية الأقل تأثيراً في جراثيم (*E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp.)، وكان المستخلص الأسيتوني للثمار والأوراق أوضح تأثيراً في تثبيط نمو *Salmonella* إذ بلغ متوسط قطر التثبيط 21.67 و 24.33 مم على التوالي.

وبذلك، أمكن تأكيد أهمية المستخلصات النباتية بوصفها مصدراً طبيعياً مضاد للجراثيم، يمكن استعمالها كأدوية جديدة لمواجهة التحديات الصحية الجدية ومشكلات ازدياد المقاومة الجرثومية للمضادات الحيوية التي تهدد الصحة العامة، وتخفض فعالية المعالجة، وتزيد تكلفة الرعاية الصحية.

الكلمات المفتاحية: الآس، الأجزاء النباتية، الجراثيم، المستخلصات الأسيتونية والإيتانولية والمائية.

[1] طالبة دكتوراه [2] أستاذ، [3] مدرّس، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

The Activity of different parts extractions of cultured *Myrtle* against some pathogenic bacteria

M. Layqa[(1)], A. A. Nizam[(2)] and I. Al-Qadi[(3)]

Received 05/01/2014
Accepted 06/04/2014

ABSTRACT

Inhibition activity of extracts (acetone, ethanol, water) parts of the (*Myrtus communis* L.) (root, stem, leaves, fruits) with concentrations (25,50,75,100%) was carried out against growth of Gr^- and Gr^+ bacteria which were isolated and identified from the pathogenic specimens of The University Children's Hospital bacterial laboratory in Damascus, using agar well diffusion method on Mueller – Hinton medium.

The results showed obvious variation of the effect of *Myrtle* extracts concentration on studied bacterial growth, increasing concentration causes rise inhibition of bacterial growth, and the results were best at concentration of 100%. The statistical study showed a positive correlation between the studied variables, whereas, a variation effect was clear on extract type of the same plant's part, and the effect varied according to bacterial species.

The effect of Myrtle extracts was more effective on Gr+ than Gr- bacteria. Inhibition diameter of stem acetone extracts was 27.78 mm for Staphylococcus epidermids, and fruits acetone extracts was 27.11 mm for S. aureus, but water extracts were less effective on E. coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella sp., Enterobacter sp. and Salmonella sp.. Acetone extracts of fruits and leaves were more effective on growth inhibition of Salmonella, the inhibitory diameter was 21.67, 24.33 mm respectively.

These results, insure that the plant extracts can be used as a natural antibacterial substances, and can be used as a new pharmaceuticals against the serious challenges of health and the problems of increasing bacterial resistance to antibiotics which threaten the public health, decrease the effect of therapy and increase the cost of health care.

Key words: *Myrtus* L., plants parts, Bacteria, Acetone, Ethanol and water extracts.

[(1)]PhD., Student, [(2)]Professor, [(3)] Assistant Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

مقدمة

استعمل الإنسان النباتات في الحفاظ على صحته وللوقاية والعلاج منذ الماضي السحيق، وبقيت مصدراً مهماً للمركبات النشيطة حيوياً، وهي في الوقت نفسه مصدر لاكتشاف أدوية جديدة نظراً إلى كثرة انتشارها وتنوّع خصائصها العلاجية وغناها ووفرة أعدادها (Rates, 2001)، ويعود ذلك لاحتوائها مركبات عديدة لها خصائص علاجية، وتُستعمل على نحو متزايد في مختلف أنحاء العالم (Saxena and Sharma, 1999)، ولما أصبحت الأمراض المعدية ومقاومة الأدوية للعوامل الممرضة للإنسان مشكلات واسعة النطاق فإن المركبات العلاجية التي يمكن أن تثبط نمو العوامل الممرضة، وتكون غير سامة للخلايا المضيفة، يمكن ترشيحها لتطوير عقاقير جديدة مضادة للأحياء الدقيقة (Robin *et al*., 1998)، كذلك فإن ازدياد المقاومة الجرثومية للصادات الحيوية يستدعي البحث عن مركبات جديدة تتّصف بفعالية تجاه الجراثيم الممرضة (Lopez *et al*., 2001)، بحسب الجزء المستعمل من النباتات وطريقة الاستخلاص (Muthuvelan and Balaji 2008)، حتى كانت المقاومة موضوع عام 2011 في منظمة الصحة العالمية WHO "المقاومة للأدوية المضادة للجراثيم تهديد عالمي"، لأن المقاومة قابلة للانتقال وراثياً من جيل إلى آخر ومن نوع إلى آخر من الجراثيم (Taheri *et al*., 2013).

أرشدت البحوث لتقييم الزيوت الأساسية والمستخلصات التي تُظهر قدرة لهذه المركبات على تثبيط نمو مجموعة واسعة من الأحياء الدقيقة الممرضة (Ayatollahi-Moosavi, *et al*., 1996)، وأخذت المنتجات النباتية تستأثر بمكانة خاصة لإنتاج الصادات الحيوية واستعمالها (Harikrishnan *et al*., 2003, Immanuel *et al*., 2004)

ينتمي الآس الشائع (*Myrtus communis* L.) إلى الفصيلة الآسية Myrtaceae، وينتشر على نحو واسع في منطقة حوض البحر المتوسط وإيران، ونموه طبيعي على ارتفاع حتى 600 متر فوق سطح البحر، وهو شجيرات صغيرة دائمة الخضرة لها سوق وفروع عديدة، وتنتج غدده عطراً لطيفاً من الزيت الطيار ولاسيما الأوراق، أزهاره بيضاء كبيرة نسبياً، وثماره لحمية بلون أسود مزرق أو أبيض غير قابلة للتقشير، طعمها قابض وتُستعمل كتوابل في شرقي المتوسط (De Laurentis *et al*., 2005).

يمتلك الآس صفات تجعله يتميز بفعالية مضادة للجراثيم والفطريات والفيروسات ومُسكّنة ومضادة للارتشاح الالتهابي anti-inflammatory ومضادة نزفيّة ومضادة طفرية antimutagenic، ويفيد في التئام الجروح ومكافحة فرط سكر الدم (Azadbakht 2002, Mahboubi and Bidgoli 2010, Mimica-Dukic *et al*., 2010)، وكذلك فهو مضاد للطفيليات والأخماج (Garg and Deneger 1998, Rahim *et al*., 1998)، ومنه أمكن إنتاج عقّار لمكافحة الحَلأ البسيط herpes simplex الفيروسي (Sarkarti and Salamat 1997).

تُستعمل أجزاء النبات تقليدياً كمضافات غذائية، وفي صناعة مستحضرات التجميل، وفي معالجة الحروقٍ والسكري والإصابات الفطرية ولإدرار البول، وبوصفه مضاد إنتان antiseptic ومطهراً disinfectant (Chalchat *et al*., 1998, Mansouri, *et al*., 2001, Cakir 2004, Messaoud *et al*., 2005, Onal *et al*., 2005)، وتتميز أوراقه بوجود نسبة عالية من الزيوت العطرية الأساسية (De Laurentis *et al*., 2005)، ولها نشاط مضاد للجراثيم (Mansouri *et al*. 2001, Sepici *et al*., 2004).

أهمية البحث وأهدافه

نظراً إلى ازدياد مقاومة الجراثيم الممرضة التي تتطلب رصد مواد التأثيرات الصادة لها في مدد دورية، وكذلك إلى ما يتميز به الآس من صفات رائعة، يجب إجراء بحوث لتحديد تأثير الخلاصات النباتية في الجراثيم الممرضة بدقة ومجال استعمالها. أُجري البحث على الأجزاء المختلفة لنبات الآس المزروع *M. communis* L. ذي الثمار البيضاء بهدف تحديد الفاعلية الحيوية لمستخلصات أجزاء النبات المختلفة تجاه بعض الجراثيم الممرضة المعزولة من مستشفى الأطفال الجامعي بدمشق، ومعرفة تأثير المستخلصات المختلفة (الأسيتونية، والإيتانولية، والمائية) بتراكيز مختلفة في الجراثيم المدروسة.

مواد البحث وطرائقه

المواد: جُمعت عينات الآس المزروع خلال فصلي الصيف والخريف من عامي 2011 و2012، من منطقة اللاذقية بين البهلولية وبلوران والقساطل على ارتفاع نحو 70 و25 و120 عن سطح البحر على الترتيب في محافظة اللاذقية شمال غربي سورية، وكانت نسبة الرطوبة بين 45–90%، وقُطفت الأوراق في الصيف، ونزع اللحاء وجُنيت الثمار الناضجة وجُمعت الجذور في الخريف، وجففت العينات النباتية النظيفة في الظل في درجة حرارة الغرفة مدة شهر، وحفظت ضمن أكياس ورقية إلى حين الاستعمال.

الطرائق:

1.تحضير المستخلصات: أُجري تحضير ثلاثة أنماط من المستخلصات كالآتي:

المستخلصات الأسيتونية والإيتانولية: جرى استخلاص المسحوق الجاف (المحضر باستعمال المطحنة الكهربائية من النمط IKA A10) لأجزاء نبات الآس (الأوراق، الجذور، السوق، الثمار) بالمذيبات، إذْ أضيف 100 مل من الأسيتون أو الإيتانول إلى 25 غ من العينة الجافة، وتُركت مدة 7 أيام في درجة حرارة الغرفة، ثم أُعيدَ الاستخلاص مرتين لكل عينة نباتية، ثم رُشّحت المستخلصات خلال ورق ترشيح Whatman #1 وجرى التخلص من المذيب بالمبخر الدوار (من النمط IKA RV10) بدرجة حرارة

35 درجة مئوية لإنتاج مستخلص جاف، ثم خزّنت المستخلصات في الدرجة 20- °م إلى حين الاستعمال (Amensour *et al.* 2010).

المستخلصات المائية: جُفّفت أجزاء النبات جيداً في الفرن بالدرجة 40 °م مدة 24 ساعة مع بقاء باب الفرن مفتوحاً، ثم طحنت بالمطحنة الكهربائية، وحُضّرت الخلاصة المائية بنسبة 1:10، بوزن 20 غ وإضافتها إلى200 مل ماءً مقطراً معقماً، ووضعت ضمن حوجلة على الرجاج في درجة حرارة الغرفة مدة أسبوع، ثم رُشّحت الخلاصة خلال ورق ترشيح Whatman #1، وعقمت بالترشيح الغشائي على أغشية ترشيح جرثومي قطرها 0.2 ميكرولتر، وبعد ذلك بُخّر الماء بالمبخر الدوار تحت الضغط المخفف، وحُفظ الناتج بالدرجة 20- °م إلى حين الاستعمال (Al-Salammi 2006).

2. عزل الأحياء الدقيقة وتعريفها: أمكن الحصول على نماذج الأحياء الدقيقة من عينات مرضية في مستشفى الأطفال الجامعي بدمشق، وعُزلت وعُرّفت في المختبر الجرثومي للمستشفى (على جهاز Phoenix^{TM} Automated Microbiology System من شركة BD- Biosciences, Spraks, MD)، اعتماداً على الاختبارات الحيوية الكيميائية، بقياس التحسس الجرثومي وتحديد التركيز المثبط الأدنى

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) للصادات الحيوية (µg/ml) بقراءة التغيرات اللونية وتفسيرها (Horstkotte *et al.* 2004)، وطُبّقت النشاطات الصادية على الأحياء الدقيقة الآتية:

Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella sp., *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis*

3. تحديد النشاط الحيوي للمستخلصات تجاه الجراثيم: أُجري التحسس الجرثومي للمستخلصات بطريقة الانتشار في حفر الآغار (Andrews 2003, Rojas *et al.*, 2003)، على وسط موللر هينتون آغار لاستزراع الجراثيم في أطباق معقمة (قطرها 9 سم) يلقح الوسط بمعلق جرثومي بواقع ثلاثة مكررات لكل نموذج باستعمال ماسحة جرثومية معقمة لأخذ مسحة من الطبق الجرثومي بعمر 24 ساعة، ونقلها إلى مصل فيزيولوجي بتركيز 0.5 مكفرلاند MacFarland. بعد ذلك جرى صنع 4-3 حفر (قطرها 6 مم) في الطبق الواحد، وإضافة المستخلصات النباتية بمعدل 20 ميكرولتراً إلى كل حفرة، بواقع ثلاثة مكررات، ثم تركت في البراد مدة ساعة لتشريبها بالمادة الفعالة، وحضنت الأطباق بالدرجة 37°م مدة 24 ساعة، ثم قيس قطر هالة التثبيط وأُخذ المتوسط للمكررات، وحُدّدت فعالية عينة شاهدة تحتوي DMSO فقط بحجم المحل المستعمل في المستخلصات نفسها.

4. التحليل الإحصائي: قدمت النتائج كمتوسط ± الانحراف المعياري لتسعة مكررات، واختبرت معنوية الفروق بين المتوسطات بطريقة تحليل التباين ANOVA اعتماداً على اختبار Tukey في المقارنات المتعددة مع مستوى دلالة $p<0.05$ بهدف رؤية شاملة للعلاقة بين المتغيرات جميعها من جهة وسلوك مختلف أنواع الجراثيم تجاهها، فقد اتُبِع تحليل التباين بتحاليل عديدة الأبعاد بالتحليل إلى العوامل المركبة الرئيسة Principles Components Analysis (PCA)، نفذت التحاليل الإحصائية اعتماداً على البرنامج الإحصائي STATISTICA ver.8 (Statsoft 2007).

نتائج البحث ومناقشتها

أولاً. تأثير مستخلصات أوراق الآس المزروع في الجراثيم الممرضة

تبيّن النتائج (الجدول1) أن المستخلص الأسيتوني للأوراق أكثر تأثيراً من المستخلص الإيتانولي والمائي في تثبيط نمو جراثيم (*S. aureus, S. epidermidis*) إلا عند التركيز 100% بالنسبة إلى المستخلص الإيتانولي، إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 24.22 مم و5.78 مم على التوالي، وكان أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص الإيتانولي أو المائي في تثبيط جراثيم (*Salmonella*)، إذ بلغ أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 24.33 مم، وكان أدنى تأثير للمستخلص الأسيتوني في الجراثيم (*E. coli, P. aeruginosa*).

كان المستخلص الإيتانولي للأوراق أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص المائي في تثبيط (*S.aureus, S. epidermidis*)، إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 24.11 مم للنوعين، وكان أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص المائي في تثبيط (*Klebsiella*)، إذ بلغ أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 17.78 مم عند التركيز 100%. أمَّا تأثير المستخلص المائي فلم يتجاوز متوسط قطر هالة التثبيط 20.89 مم في (*S. aureus*)، و15.11 مم في (*Klebsiella*).

وبدراسة اختلاف تأثير تراكيز المستخلص الأسيتوني لأوراق الآس في نمو الجراثيم المدروسة عند التركيز 25% بلغ أعلى معدل لقطر هالة التثبيط 23 مم، وعند التركيز 100% بلغ 24.22 مم و25.78 مم في (*S. epidermidis, S. aureus*) على التوالي، وفي الجراثيم السالبة بصبغة غرام بلغ أعلى معدل لقطر هالة التثبيط بلغ 14.78 مم في (*Enterobacter*) عند التركيز 25%، وبلغ معدل قطر هالة التثبيط 24.33 مم في (*Salmonella*) عند التركيز 100%.

ويزداد التأثير في الجراثيم الموجبة أو السالبة بصبغة غرام على السواء بازدياد تركيز المستخلصات، وقد تميز المستخلص المائي لأوراق الآس بأدنى تأثير بالتراكيز جميعها في الجراثيم الموجبة أو السالبة بصبغة غرام، وكان أفضلها في التركيز 100%، إذ بلغ أكبر معدل لقطر هالة التثبيط 20.89 مم في (*S. aureus*).

الجدول (1) الفعالية المضادة للجراثيم (متوسط قطر هالة التثبيط، مم±sd لتسعة مكررات) لمستخلصات أوراق الآس الأسيتونية والإيتانولية والمائية (لأربعة تراكيز لكل منها: 25، 50، 75، 100%).

الجراثيم Bacteria	تركيز %Conc	Acetone	Ethanol	Water
E. coli	100	16.78±0.44[a]	13.22±0.44[a]	12.78±0.44[a]
	75	14.89±0.33[b]	12.00±00[b]	10.00±0.00[b]
	50	11.89±0.33[c]	11.89±0.33[b]	8.00±0.00[c]
	25	0.00±0.00[d]	10.00±0.00[c]	8.00±0.00[c]
P. aeruginosa	100	11.22±0.66[a]	15.22±0.44[a]	12.00±0.70[a]
	75	9.00±0.00[b]	10.22±0.44[b]	6.67±0.50[b]
	50	8.00±0.00[c]	10.11±0.33[b]	0.00±0.00[c]
	25	0.00±0.00[d]	9.67±0.50[c]	0.00±0.00[c]
Klebsiella sp.	100	17.67±0.50[a]	17.78±0.97[a]	15.11±0.33[a]
	75	16.00±0.00[b]	14.00±0.00[b]	14.44±0.00[b]
	50	12.00±0.00[c]	13.00±0.00[c]	12.00±0.00[c]
	25	11.00±0.00[d]	11.00±0.00[d]	0.00±0.00[d]
Enterobacter sp.	100	21.00±0.00[a]	17.11±0.33[a]	10.00±0.00[a]
	75	18.11±0.33[b]	16.11±0.33[b]	0.00±0.00[b]
	50	15.11±0.33[c]	14.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]
	25	14.78±0.83[c]	12.00±00[d]	0.00±0.00[b]
Salmonella sp.	100	24.33±0.50[a]	17.00±0.00[a]	14.00±0.00[a]
	75	18.00±0.00[b]	16.00±0.00[b]	11.78±0.66[b]
	50	14.00±0.00[c]	14.89±0.60[c]	10.00±0.00[c]
	25	12.00±00[d]	9.11±0.60[d]	0.00±0.00[d]
S. aureus	100	25.78±0.83[a]	24.11±0.33[a]	20.89±0.92[a]
	75	23.00±0.00[b]	22.11±0.60[b]	16.89±0.33[b]
	50	23.00±0.00[b]	21.00±0.00[c]	15.89±0.78[c]
	25	23.00±0.00[b]	19.89±0.60[d]	11.89±0.60[d]
S. epidermidis	100	24.22±0.66[a]	24.11±0.33[a]	16.78±0.44[a]
	75	24.00±0.00[a]	23.00±0.00[b]	15.89±0.60[b]
	50	23.00±0.50[b]	22.11±0.60[c]	12.11±0.60[c]
	25	23.00±0.00[b]	21.00±0.00[d]	10.00±0.50[d]

المتوسطات ضمن العمود الواحد لكل نوع جرثومي والمتبوعة بأحرف مختلفة ذات دلالة معنوية فيما بينها ($p<0.05$).

ثانياً. نتائج تأثير مستخلصات ثمار الآس المزروع في بعض الجراثيم الممرضة

تبيّن النتائج (الجدول2) أن المستخلص الأسيتوني أكثر تأثيراً من المستخلص الإيتانولي أو المائي في تثبيط نمو (*S. aureus*) عند التركيزين 100% و75%، إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 27.11 مم، وبلغ 21.67 مم في تثبيط نمو (*Salmonella*). وكان المستخلص الإيتانولي لثمار الآس أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص المائي عند التركيز 100% إذ بلـــغ

متوسط قطر هالة التثبيط 21.89 مم في تثبيط (*S. epidermidis*)، وبلغ أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط للمستخلص الإيتانولي في الجراثيم السالبة بصبغة غرام 19.00 مم في تثبيط (*Salmonella*). أمَّا تأثير المستخلص المائي فلم يتجاوز متوسط قطر هالة التثبيط 17.89 مم في الجراثيم (*S. aureus*) والقيمة 17.00 مم في (*Salmonella*).

الجدول (2) الفعالية المضادة للجراثيم (متوسط قطر هالة التثبيط، مم±sd لتسعة مكررات) لمستخلصات ثمار الآس الأسيتونية والإيتانولية والمائية (لأربعة تراكيز لكل منها: 25، 50، 75، 100%).

Bacteria الجراثيم	%Conc تركيز	Acetone	Ethanol	Water
E. coli	100	16.00±0.00[a]	16.00±0.00[a]	14.33±2.06[a]
	75	10.00±0.00[b]	12.00±0.00[b]	10.22±1.48[b]
	50	7.11±0.60[c]	12.00±0.00[b]	9.89±0.33[b]
	25	7.11±0.33[c]	9.11±0.78[b]	8.75±0.46[b]
P. aeruginosa	100	10.00±0.00[a]	8.11±0.92[a]	14.00±0.00[a]
	75	7.67±0.50[b]	8.11±0.33[a]	11.89±0.60[b]
	50	0.00±0.00[c]	00.00±0.00[b]	10.00±0.70[c]
	25	0.00±0.00[c]	0.00±0.00[b]	6.89±0.60[d]
Klebsiella sp.	100	16.00±0.50[a]	16.56±1.01[a]	15.88±0.60[a]
	75	15.11±0.60[b]	14.78±0.97[b]	14.00±0.00[b]
	50	9.00±0.50[c]	14.00±0.50[b]	14.00±0.00[b]
	25	8.89±0.60[c]	12.00±0.70[c]	13.00±0.00[c]
Enterobacter sp.	100	19.11±0.60[a]	16.00±0.50[a]	14.00±0.70[a]
	75	17.89±0.33[b]	15.89±0.33[b]	14.00±0.70[a]
	50	14.89±0.60[c]	14.00±0.50[b]	14.00±0.70[a]
	25	11.78±0.44d	8.00±0.70c	10.00±0.00b
Salmonella sp.	100	21.67±0.50a	19.00±0.86a	17.00±0.70a
	75	20.00±0.00b	16.00±0.50b	17.00±0.70a
	50	17.67±0.50c	16.00±0.50b	17.00±0.70a
	25	14.78±0.44d	14.00±0.50c	14.00±0.00b
S. aureus	100	27.11±078a	19.00±0.86a	17.89±0.33a
	75	27.11±0.78b	16.00±0.50b	14.89±0.33b
	50	21.78±0.44c	14.00±0.50c	14.00±0.50c
	25	14.89±0.60c	14.00±0.50c	11.89±0.33d
S. epidermidis	100	24.11±0.33a	21.89±0.78a	16.00±0.50a
	75	24.11±0.33a	20.00±0.50b	15.89±0.33a
	50	16.89±0.60b	20.00±0.50b	15.89±0.33a
	25	14.78±0.44c	16.78±0.66c	14.89±0.60b

المتوسطات ضمن العمود الواحد لكل نوع جرثومي والمتبوعة بأحرف مختلفة ذات دلالة معنوية فيما بينها ($p<0.05$).

ونلاحظ اختلاف تأثير تراكيز المستخلص الإيتانولي لثمار الآس في نمو الجراثيم، فقد أظهر التركيز 25% وجود أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 16.78 مم في (*S. epidermidis*)، أمَّا المستخلص الأسيتوني عند التركيزين 75 و100% فكان متوسط قطر هالة التثبيط 27.11 مم في الجراثيم (*S.aureus*)، وفي جراثيم (*Salmonella*) كان المستخلص المائي أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 14.00 مم عند التركيز 25%، و17.00مم عند التركيز 100%. وكلما ازداد تركيز المستخلصات ازداد التأثير في الجراثيم الموجبة أو السالبة بصبغة غرام على السواء، وكان المستخلص المائي لثمار الآس الأدنى تأثيراً من المستخلص الأسيتوني الإيتانولي في الجراثيم الموجبة بصبغة غرام بالتراكيز جميعها.

ثالثاً. نتائج تأثير مستخلصات ساق الآس المزروع في بعض الجراثيم الممرضة

تظهر النتائج (الجدول3) أن المستخلص الأسيتوني للساق أكثر تأثيراً من المستخلص الإيتانولي أو المائي في تثبيط نمو (*S. epidermidis*) عند التراكيز جميعها، وبلغ أكبر متوسط قطر هالة التثبيط في التركيز 100% 27.78 مم، وكان المستخلص الأسيتوني والإيتانولي أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص المائي في تثبيط الجراثيم السالبة بصبغة غرام، إذ بلغ أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط في جراثيم (*Salmonella*) 17.89 و18.67مم لكليهما على التوالي، وكان أدنى تأثير في (*E. coli, P. aeruginosa*)، أمَّا المستخلص المائي فلم يظهر أي تأثير مهم في الجراثيم السالبة بصبغة غرام وكان معدوماً عند أغلبها. ولم يتجاوز متوسط قطر هالة التثبيط 7.89 مم في (*Klebsiella*)، والقيمة 14.33 مم في الجراثيم (*S. aureus*) عند التركيز 100%.

وكان المستخلص الإيتانولي للساق أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص المائي في تثبيط الجراثيم (*S. epidermidis*)، فبلغ متوسط قطر هالة التثبيط 20.00 مم.

أمَّا تأثير المستخلص الأسيتوني في جراثيم (*S. epidermidis*)عند التركيز 100%، فكان متوسط قطر هالة التثبيط 27.78 مم، وعند التراكيز 75 و50 و25% كان 21.78 مم، بينما في الجراثيم السالبة بصبغة غرام، أظهر هذا المستخلص أكبر متوسط لقطر هالة التثبيط 15.89 مم في (*Enterobacter*) عند التركيز 25%. وأظهر المستخلص الإيتانولي أكبر متوسط قطر هالة تثبيط 18.67 مم في (*Salmonella*)، في الجراثيم السالبة بصبغة غرام عند التركيز 100%.

الجدول (3) الفعالية المضادة للجراثيم (متوسط قطر هالة التثبيط، مم±sd لتسعة مكررات) لمستخلصات ساق الآس الأسيتونية والإيتانولية والمائية (لأربعة تراكيز لكل منها: 25، 50، 75، 100%).

Bacteria الجراثيم	%Conc تركيز	Acetone	Ethanol	Water
E. coli	100	11.00±0.00[a]	7.11±0.33[a]	0.00±0.00
	75	8.11±0.33[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00
	50	8.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]	0.00±0.00
	25	0.00±0.00c	0.00±0.00[b]	0.00±0.00
P. aeruginosa	100	11.89±0.33[a]	10.89±0.33[a]	7.11±0.33[a]
	75	9.00±0.50[b]	10.89±0.33[a]	0.00±0.00[b]
	50	8.00±0.00[c]	10.33±0.50[b]	0.00±0.00[b]
	25	7.00±0.00[d]	0.00±0.00c	0.00±0.00[b]
Klebsiella sp.	100	18.22±0.44[a]	16.33±0.70[a]	7.89±0.33[a]
	75	16.00±0.00[b]	16.33±0.50[a]	7.89±0.33[a]
	50	16.00±0.00[b]	11.00±0.00[b]	7.00±0.00[b]
	25	8.11±0.33[c]	9.00±0.00[c]	0.00±0.00[c]
Enterobacter sp.	100	18.00±0.50[a]	18.11±0.33[a]	7.11±0.33[a]
	75	17.11±0.33[b]	18.00±0.00[a]	0.00±0.00[b]
	50	17.00±0.00[b]	12.00±0.00[b]	0.00±0.00[b]
	25	15.89±0.33[c]	7.33±1.00[c]	0.00±0.00[b]
Salmonella sp.	100	17.89±0.33[a]	18.67±0.50[a]	0.00±0.00
	75	17.89±0.78[a]	15.00±0.00[b]	0.00±0.00
	50	15.89±0.33[b]	12.11±0.33 c	0.00±0.00
	25	12.11±0.33[c]	12.00±0.00 c	0.00±0.00
S. aureus	100	21.00±0.50[a]	18.33±0.50[a]	14.33±0.50[a]
	75	20.00±0.00[b]	18.33±0.50[a]	13.00±0.00[b]
	50	20.00±0.00[b]	18.33±0.50[a]	9.11±0.33[c]
	25	18.78±0.44[c]	14.89±0.33[b]	0.00±0.00[d]
S. epidermidis	100	27.78±0.44[a]	20.00±0.00[a]	11.89±0.33[a]
	75	21.78±0.83[b]	19.33±0.50[b]	9.11±0.60[b]
	50	21.78±0.44[c]	19.33±0.70[b]	7.78±0.44[c]
	25	21.78±0.44[c]	14.78±0.44[c]	7.11±0.33[d]

المتوسطات ضمن العمود الواحد لكل نوع جرثومي والمتبوعة بأحرف مختلفة ذات دلالة معنوية فيما بينها ($p<0.05$).

رابعاً. نتائج تأثير خلاصات جذر الآس المزروع في بعض الجراثيم الممرضة

تظهر النتائج (الجدول4) أن المستخلص المائي للجذر أكثر تأثيراً من المستخلص الأسيتوني أو الإيتانولي في تثبيط نمو (*S. epidermidis*) في التراكيز جميعها، إذ بلغ متوسط أكبر قطر هالة تثبيط 31.56 مم عند التركيز100%، وكان المستخلص الأسيتوني أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص الإيتانولي أو المائي في تثبيط (*Enterobacter*) في

التراكيز المستخدمة جميعها، إذ بلغ أكبر متوسط لقطر هالة التثبيط 17.11 مم، وكان للمستخلص الأسيتوني أدنى تأثير في (*P. aeruginosa*)، وانعدم تأثير المستخلص المائي في جراثيم (*E. coli*). ولم يتجاوز متوسط قطر هالة التثبيط 20.11 مم في (S. *aureus*) و17.11 مم في (*Enterobacter*).

الجدول (4) الفعالية المضادة للجراثيم (متوسط قطر هالة التثبيط، مم±sd لتسعة مكررات) لمستخلصات جذر الآس الأسيتونية والإيتانولية والمائية (لأربعة تراكيز لكل منها: 25، 50، 75، 100%).

الجراثيم Bacteria	تركيز%Conc	Acetone	Ethanol	Water
E. coli	100	10.56±0.72[a]	11.89±0.33[a]	0.00±0.00
	75	9.89±0.33[b]	10.22±0.66b	0.00±0.00
	50	7.89±0.33[c]	10.00±0.00[b]	0.00±0.00
	25	7.89±0.33[c]	8.00±0.00c	0.00±0.00
P. aeruginosa	100	8.33±0.50[a]	11.00±0.00[a]	11.89±0.33[a]
	75	8.00±0.00[b]	9.89±0.33[b]	10.00±0.50[b]
	50	0.00±0.00[c]	8.00±0.00[c]	9.89±0.33[b]
	25	0.00±0.00[c]	6.00±0.00[d]	8.00±0.00[c]
Klebsiella sp.	100	12.11±0.33[a]	14.11±0.33[a]	12.11±0.33[a]
	75	12.00±0.00[a]	11.89±0.33[b]	12.00±0.00[a]
	50	11.00±0.00[b]	12.00±0.00[b]	10.00±0.00[b]
	25	9.67±0.70[c]	6.00±0.00[c]	8.00±0.00[c]
Enterobacter sp.	100	17.11±0.60[a]	15.33±0.50[a]	11.78±0.83[a]
	75	14.89±0.33[b]	13.00±0.00[b]	7.89±0.33[b]
	50	15.00±0.00[b]	12.67±0.50[b]	8.00±0.00[b]
	25	10.89±0.33[c]	8.00±0.00[c]	7.78±0.44[b]
Salmonella sp.	100	17.00±0.50[a]	15.33±0.50[a]	12.00±0.00[a]
	75	11.00±0.50[b]	14.00±0.00[b]	12.00±0.00[a]
	50	11.00±0.50[b]	14.00±0.00[b]	10.89±0.33[b]
	25	10.11±0.33[c]	11.89±0.33[c]	10.78±0.44[b]
S. aureus	100	20.11±0.60[a]	15.33±0.50[a]	23.00±0.00[a]
	75	20.00±0.00[a]	14.0±0.00[b]	16.00±0.00[b]
	50	18.00±0.00[b]	12.00±0.00[c]	13.00±0.00[c]
	25	8.00±0.00[c]	10.00±0.00[d]	12.89±0.33[c]
S. epidermidis	100	14.44±0.52[a]	23.56±0.88[a]	31.56±0.72[a]
	75	12.89±0.33[b]	18.11±0.60[b]	25.89±0.33[b]
	50	12.78±0.83[b]	12.89±0.33[c]	21.00±0.00[c]
	25	10.89±0.33[c]	12.78±0.44[c]	20.89±0.33[c]

المتوسطات ضمن العمود الواحد لكل نوع جرثومي والمتبوعة بأحرف مختلفة ذات دلالة معنوية فيما بينها ($p<0.05$).

وكان المستخلص الإيتانولي للجذر أكثر تأثيراً مقارنة بالمستخلص الأسيتوني في تثبيط جراثيم (*S. epidermidis*)، إذ بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 23.56 مم عند التركيز 100%.

أظهر المستخلص المائي أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 31.56 مم عند التركيز 100%، و20.89 مم عند التركيز 25% في (*S. epidermidis*). في حين أظهر المستخلص الإيتانولي أكبر متوسط لقطر هالة التثبيط 11.89 مم عند التركيز 25% في (*Salmonella*)، في حين أظهر المستخلص الأسيتوني أعلى متوسط لقطر هالة التثبيط 17.11 مم في (*Enterobacter*) عند التركيز 100%. وانعدم تأثير المستخلص المائي للجذر في جراثيم (*E. coli*).

المناقشة

أظهرت النتائج السابقة تبايناً واضحاً لتأثير تركيز المستخلصات الأسيتونية والإيتانولية والمائية في نمو الجراثيم، فمع زيادة التركيز المستعمل يزداد معدل قطر التثبيط لنمو الجراثيم، وقد تحققت أفضل نتيجة عند التركيز 100%. وبهدف رؤية شاملة لتأثير المستخلصات المختلفة للتركيز 100% المستخرجة من الأجزاء المدروسة من جهة وسلوك مختلف أنواع الجراثيم تجاهها أُنشئت مصفوفة تضم متوسط قطر تثبيط هذا التركيز المستخلص من مختلف الأجزاء المدروسة (وهذا يمثل 12 متغيراً) تجاه الأنواع الجرثومية السبعة المدروسة، وعولجت هذه القائمة بطريقة PCA (Principal Component Analysis) أي التحليل وفق العوامل المركبة الرئيسة وهي طريقة وصفية تهدف إلى اختزال عدد المتغيرات الأصلية لقائمة البيانات إلى عدد أقل، وتُقدم PCA المحاور التركيبية الجديدة في هيئة خريطة تضم محورين رئيسين يُسقط ضمنهما كل من المتغيرات والأفراد.

يوضح الشكل (1) دائرة الارتباط بين المتغيرات المدروسة للمحورين التركيبيين 1×2 (وهذا يمثل 82% من التباين الكلي) فضلاً عن توزع الأفراد، إذْ يوجد تجمع المتغيرات في جهة واحدة للمحور الأول (الارتباط بينها إيجابي) ولكنها تنفصل على المحور الثاني، ويحدث تبعثر جيد للأفراد ضمن هذين المحورين، وهذا يعبر عن تباين واضح في تأثير نوع المستخلص النباتي حتى ضمن الجزء النباتي ذاته.

إن التضاد الملاحظ على المحور الأول بين جراثيم *S. aureus* و*S. Epidermidis* وبدرجة أقل *Salmonella* من جهة (توجد في الجزء السالب منه) وجراثيم *E. coli* و*P.aeruginosa* من جهة أخرى (توجد في الجزء الموجب منه) دليل على أن تأثر جراثيم المجموعة الأولى بهذه المستخلصات عموماً يكون أوضح بكثير من تأثر جراثيم المجموعة الثانية، أما الأنواع الأخرى فتحتل موقعاً وسطاً بين المجموعتين، أي إن الجراثيم الموجبة بصبغة غرام كانت الأكثر تأثراً مقارنة بالجراثيم السالبة بصبغة غرام.

أمَّا انفصال المتغيرات والأفراد على المحور الثاني فيعكس الاختلاف في تأثير مصدر المستخلص النباتي في نوع الجراثيم، ولاسيَّما المجموعة الجرثومية الأولى التي أُشير إليها في الفقرة السابقة، إذْ يلاحظ تضاد بين *S. epidermidis* من جهة (الجهة الموجبة للمحور) و*Salmonella* من جهة أخرى (الجهة السالبة للمحور) وتحتل *S. aureus* موقعاً وسطاً.

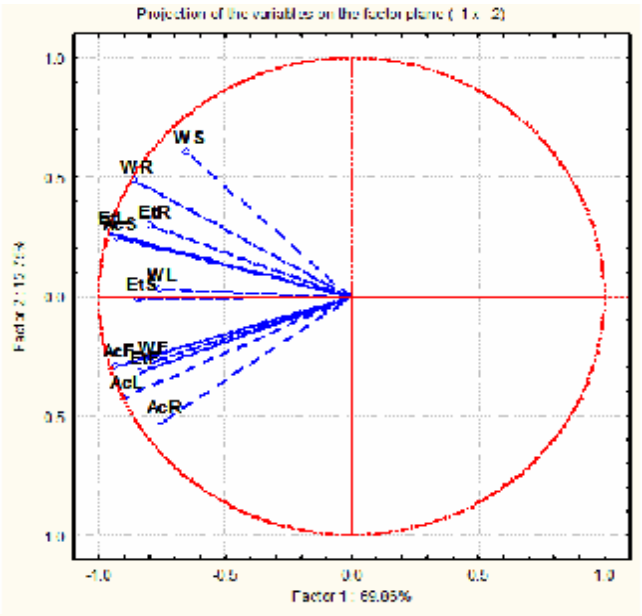
وبدت المستخلصات المائية أقل تأثيراً في الجراثيم السالبة بصبغة غرام، بينما كان للمستخلص المائي للجذور أفضل تأثير في الجراثيم الموجبة بصبغة غرام، وكانت المستخلصات الأسيتونية أكثر تأثيراً في الجراثيم، ولاسيما مستخلصات الأوراق والثمار والساق، وكان كل من المستخلص الأسيتوني للأوراق والثمار أوضح تأثيراً في جراثيم *Salmonella*، أمَّا المستخلصات الإيتانولية فتأتي، عموماً، في المرتبة الثانية بعد المستخلصات الأسيتونية، وكان أفضل تأثير لها مستخلص الأوراق.

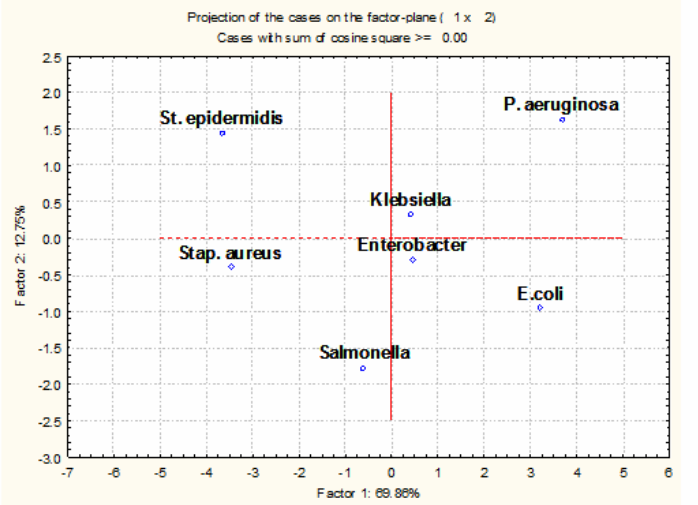
يبدو أن الجراثيم السالبة بصبغة غرام أكثر مقاومة لمستخلصات أجزاء الآس والزيوت العطرية (Reynolds 1996, Bajpai *et al*., 2008)، لأن جدرها تمنع اختراق الزيوت العطرية وتراكمها في الغشاء الخلوي (Bezic *et al*., 2003)، على عكس الجراثيم الموجبة بصبغة غرام، ويتعلق تأثير مستخلصات أوراق الآس بمركبات فينولية (Cakir *et al*. 2004) تؤثر في وظائف الغشاء الخلوي كالنقل الإلكتروني وعمل الإنزيمات أو نقل المغذيات (Fung *et al*. 1977, Bajpai *et al*. 2008).

كما أن فاعلية مستخلصات *Myrtus communis* ضد جراثيم *Staphylococcus aureus* مرتفعة جداً، وتعود لتأثير الجذور الحرة (Gholamhoseinian *et al*., 2009).

وكذلك تعود فعالية مستخلصات الآس لوجود المركبات الفينولية وعديدات الفينول التي تتميز بنشاط تثبيطي على الجراثيم الموجبة أو السالبة بصبغة غرام (Taoubi *et al*., 2002, Al-Salammi 2006, El-Hossary and Tadroos 1989)، وكذلك تأثير أجزاء المستخلص الإيتانولي للآس بسبب احتوائه مركبات فعالة –Ellegicacide و Gallicacid، إلى جانب الغليكوزيدات الفلافونية ذات النشاط التثبيطي على الجراثيم الموجبة أو السالبة بصبغة غرام (Tawij *et al*., 1989) ووجود الزيوت الطيارة المثبطة لنمو جراثيم *P. aeruginosa* (El-Hossary and Tadroos 1989).

وتبيّن نتائج البحوث وجود تأثير جيد لمستخلصات الأوراق والسوق من الآس في نمو الجراثيم، مثل: *Staphylococcus aureus* (Ghahraman 1990, Shahidi-Bonjar 2004:1)، *E.coli* (Bouzouita *et al*., 2003, Shahidi-Bonjar 2004:2)، *Lactobacillus plantarum* (Bouzouita *et al*., 2003)، *Bacillus cereus* (Shahidi-Bonjar 2004:1)، *Listeria monocytogenes* وكذلك *Pseudomonas aeruginosa* (Shanmugavelu *et al*., 2006, Amensour *et al*., 2010)، *Shigella* *Klebsiella* (Shanmugavelu *et al*., 2006)، وإن كان تأثيره في بعض سلالات *E. coli* قد رُفض في دراسة أخرى (Amensour *et al*., 2010).





المستخلصات الأسيتونية تبدأ بالحرفين Ac، والمستخلصات الإيتانولية بالحرفين Et والمستخلصات المائية بالحرف W وأشير إلى الجزء المستعمل بحرف ثالث بعد الحرفين السابقين "الأوراق L والساق S والجذر R والثمرة F"

الشكل (1) دائرة الارتباط بين المتغيرات المدروسة الممثلة بقطر التثبيط الناتج عن تأثير المستخلصات الأسيتونية والإيتانولية والمائية ذات التركيز 100% في الأنواع الجرثومية ضمن المحورين التركيبين 1×2 وخارطة توزع الأفراد ضمن هذا الفراغ.

وتتفق نتائج البحث مع نتـــائج Dugler and Gonuz (2004)، فمستخلـــصات أوراق الآس ذات تأثير أكبر في الجراثيم الموجبة بصبغة غرام مما هي عليه في السالبة بصبغة غرام، وإن كانت نتائجه عديمة التأثير في *E. coli, Klebsiella pneumoniae* بينما تبيّن نتائج هذا البحث وجود تأثير منخفض، وتتفق النتائج في الفعاليـــة العاليـــة فـــي النـــوع *Staphylococcus epidermidis*، وتحتوي الأوراق مركبـــات طبيـــة: terpineolene, cineol, linalool, terpineole, linalyl acetate, tannins and flavonoids (Garg and Denger 1998, Rahim *et al*., 1998)، وتفيد الأوراق كمضادات أكسدة فعالـــة بـــسبب وجود مشتقات galloyl وغناها بعديدات الفينول polyphenols (Romani *et al*. 2004).

وهكذا، يستأثر الآس بأهمية كبيرة في الرعاية الصحة بسبب وفرته من جهة، وسهولة استعماله وانخفاض كلفته، وهو في الوقت نفسه آمن.

التوصيات

1. يمكن استعمال المستخلصات الإيتانولية للأوراق كمواد مضادة للعوامـــل الممرضـــة المنقولة بالغذاء أو المفسدة له، اعتماداً على نتائج تأثير مستخلصات الآس في الجراثيم الممرضة.
2. الانتقال إلى أسلوب الاستهلاك الأخضر للحياة بتحفيز الاعتماد على استعمال منتجات طبيعية نباتية وتطويرها.
3. تحديد المركبات الكيميائية المسؤولة عن النشاط المضاد للجراثيم فـــي المستخلـــصات النباتية لأجزاء النبات المختلفة.
4. توسيع دراسة تأثير المستخلصات، بحسب طريقة الاستخلاص والتراكيز ووقت الجني وأماكن النمو النباتي وطريقة العناية أو الزراعة، في العزلات الجرثومية المختلفة.

References

1. **Al-Salammi Abdulla (2006). Study of effect of extracts of *Myrtus communis* L.and *Allium sativum* L. on *Pseudomonas aeruginosa*in *vitro* and in *vivo*.1062.**
2. **Amensour M., Bouhdid S., Fernandez-Lopez J. *et al.* (2010). Antibacterial activity of extracts of *Myrtus commuis* against food-borne pathogenic and spoilage bacteria. Int J Food Proper; 13: 1215-1224.**
3. **Andrews Jenny (2003). BSAC Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, Version 2.1.4,1-51.**
4. **Ayatollahi-Moosavi S. A., Abdollahi H., Kazemipour N. (1996). Study of anti-dermatophyte effect of ten herbal methanolic extract. J Kerman Med Univ. Sci. 3(3): 115-122.**
5. **Azadbakht M. (2002). Myrtle, In: Iranian Herbal Pharmacopoeia Editorial Committee (Eds.), Iranian Herbal Pharmacopoeia. Publications of Ministry of Health, Tehran. pp. 747-753.**
6. **Bajpai V. K.; Rahman, A.; Kang S. C. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essentialoil and extracts of Nandinadomestica Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilagebacteria. International Journal of Food Microbiology, 125 (2), 117–122.**
7. **Bezic N.; Skocibusic M.; Dinkic V.; Radonic A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. Phytotherapy Research, 17, 1037–1040.**
8. **Bouzouita N., Kachouri F., Hamid M. and Chaabouni M. M. (2003). Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. Flavour Fragrance J. 18(5): 380-383.**
9. **Cakir A. (2004). Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae, Hamnoides* L. (Sea Buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. Biochem. Syst. Ecol., 32: 809-816.**
10. **Cakir A.; Kordali S.; Zengin H.; Izumi S.; Hirata T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour&Fragrance Journal 2004, *19*, 62–68.**
11. **Chalchat J. C., Garry R. F., Michet A. (1998). Essential oils of Myrtle (*Myrtus communis* L.) of the Miterranean littoral. J. Essent. Oil Res. 10:613-617.**
12. **De Laurentis N., Rosato A., Gallo L., Leone L., Milillo M. A. (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Myrtus communis*. RivistaItaliana EPPOS 39:3-8.**
13. **Dugler, B.; and Gonuz A. (2004). Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. Asian Journal of plant Science, vol.3, no.1, 104-107.**
14. **El-Hossary G. A., and Tadroos S. H. (1989). Phytochemical study of leaves of *Myrtuscommunis* grown in Egypt. Bull . Fa. Pharm. Cario Univ., 27 (1): 101-103.**

15. Fung D. Y. C.; Taylor S.; Kahan J. (1977). Effects of butylate dhydroxyanisole (BHA) and Butylate dhydroxytoluene (BHT) on growth and aflatoxina production of *Aspergillus flavus*. Journal ofFood Safety, *1*, 39–51.

16. Garg S. C., Denger S. L. (1998). Antifungal activity of the essential oil of *Myrtus communis* var. *microphylla*. HerbaHungarica. 27(2-3): 123-124.

17. Ghahraman A. (1990). Iran Flora. 15 ed. Tehran: Tehran University Press: 28-39.

18. Gholamhoseinian N., Mansouri S. and Rahighi S. (2009). Effects of Sub-Inhibitory Concentrations of Myrtus communis Leave Extracts on the Induction of Free Radicals in Staphylococcus aureus; A Possible Mechanism for the Antibacterial Action. Asian Journal of Plant Sciences, 8: 551-556.

19. Harikrishnan R., Nisha R. M., Balasundaram C. (2003). Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture; 221(1-4): 41-50.

20. Horstkotte, M. A. Knobloch, J. K. M.; Rohade, H.; Dobinsky, S. and Mack, D. (2004). Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for detection of metgicillin resistance in coagulase-negative Staphylococci, Journal of Clinical Microbiology, 42(11):5046.

21. Immanuel G., Vincybai V. C., Sivaram V., *et al*. (2004). Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeusindicus* juveniles. Aquaculture; 236(1-4): 53-65.

22. Lopez A., Hudson J. B., and Towers G. H. N. (2001). Antiviral and Antimicrobial Activity of Colombian Medicinal Plants. Journal of Ethnopharmacology, Vol.77, pp:189-196.

23. Mahboubi M., Ghazian Bidgoli F. (2010). In vitro synergistic efficacy of combination of amphotericin B with *Myrtus communis* essential oil against isolates of *Candida albicans*. Phytomedicine, 17: 771-774. 24.

24. Mansouri S., A. Foroumadi, T. Ghanei and A. G. Najar (2001). Antibacterial activity of the crude extracts and fractionated constituents of *Myrtus communis*. Pharm. Biol., 39: 399-401.

25. Messaoud C., Zaouali Y., Ben Salah A., Khoudja M. L., Boussaid M. (2005). *Myrtus communis* in Tunisia: Variability of the essential oil composition in natural populations. FlavourFragr. J. 20: 577-582.

26. Mimica-Dukic N., Bugarin D., Grbovic S., Mitic-Culafic D., Vukovic-Gacic B., Orcic D., Jovin E., Couladis M. (2010). Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents. Molecules, 15: 2759-2770.

27. Muthuvelan B. and Balaji Raja R. (2008). Studies on the efficiency of different extraction procedureson the antimicrobial activity of selected medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 2837-2842.

28. Onal S., S. Timur B. Okutucu and F. Zihnioglu (2005). Inhibition of α-glucosidase by aqueous extracts of some potent antidiabetic medicinal herbs. Prep. Biochem. Biotechnol., 35: 29-36.

29. Rahim Z., Sanyal S. C., Aziz K. M., *et al*. (1998). Isolation of enterotoxigenic, haemolytic and antibiotic resistant *Aermonas hydrophila* strains from infected fish in Bangladesh. Appl. Environ Microbiol. 48(4): 865-867.
30. Rates S. M. (2001). Plants as source of drugs. Toxicon. 2001 May; 39(5):603-13
31. Reynolds, J. E. F. (1996). *Martindale the extra harmacopoeia*, 31st ed.; Royal Pharmaceutical Society of Great Britain: London, 1996, pp. 1681–1682.
32. Robin E. H., Anril W., Alexander M., Loeto M. and Keith K. (1998). Nasopharyngeal carriage and antimicrobial resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Heamophilus influenzae*type b in children under 5 years of age in Botswana. Int. J. Infect. Dis., 3: 18-25.
33. Rojas R., Bustamante B.;BauerJ., Fernandez I.; Alban J., Locka O. (2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, Vol.88,199-204.
34. Romani A., R. Coinu, S. Carta, P. Pinelli, C. Galardi, F.F. Vincieri and F. Franconi (2004). Evaluation of antioxidant effect of different extracts of *Myrtus communis* L. Free Radic Res., 38: 97-103.
35. Sarkarti A., Salamat M. (1997). Effect of Moord on H.B.V and negativity of positive antigens. Shiraz: First Symp. of Med Ind. 134-135.
36. Saxena V. K., and R. N. Sharma (1999). Antimicrobial activity of essential oil of *Lantana aculeata*. Fitoterapia, 70: 59-60.
37. SepiciA. I. Gurbuz, C. Cevik and E. Yeşilada (2004). Hypoglycaemic effects of Myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits, in Journal of Ethnopharmacology, Vol. 93, 2004, p. 311-318.
38. Shahidi-Bonjar GH. (2004)1. Antibacterial screening of plants used in Iranian folkloric medicine. Fitoterapia. 2004; 75: 231-235.
39. Shahidi-Bonjar GH. (2004)2. Screening for antibacterial properties of some Iranian plants against two strains of *Escherichia coli*. Asian J Plant Sci. 3(3): 310-314.
40. Shanmugavelu S., Ruzickova G., Zrustova J. and Brooker J. D. (2006). A fermentation assay to evaluate the effectiveness of antimicrobial agents on gut microflora. J Microbiol. Methods; 67(1):93-101.
41. StatSoft, Inc. (2007). STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104.
42. Taoubi, K.; Traboulsi, A. F.; El-Haj, S.; Bessiere, J. M. and Rammal, S. (2002). Insecticidal properties of essential plant oils against the mosquito Culexpipiensmolestus (Diptera: Culicidae). Pest Manag. Sci., 58 (5): 491-495.
43. Taheri, A., Seyfan, A., Jalalinezhad, S., Nasery, F., (2013). Antibacterial Effect of Myrtus Communis Hydro-Alcoholic Extract on Pathogenic Bacteria. www.zjrm.ir, ZJRMS 2013; 15(6): 19-24.
44. Tawij, H. A. A; Elisha, E. E. and Khalid, R. M. (1989). Analysis studies on some Iraqi medicinal plants .Pat.11. Int. Crude Drugs Res. Lisse. Cwets and Zeitlingar. 27: 109-112.