اختبار الفعالية التضادية لمستخلصات أوراق نبات الزعتر *Thymus vulgaris* L في جرثومة *Staphylococcus aureus* خارج الجسم الحي.

A study of antibiosis activity of Thyme (*Thymus vulgaris* L) leaf extracts on *Staphylococcus aureus in vitro*

سهير عبد الكريم حبيب
كلية التربية للبنات/ جامعة الكوفة

ثامر خضير مرزه
كلية العلوم/ جامعة الكوفة

عباس جواد الصراف
الكلية التقنية الطبية/ بغداد

الخلاصة

تضمنت التجربة اختبار تاثير المواد الفعالة المستخلصة بالماء البارد والمغلي اضافة للأستخلاص بالمذيبات العضوية والمتمثلة بالمذيب الكحولي الأثيلي وخلات الأثيل والهكسان لأوراق نبات **الزعتر** ***Thymus vulgaris* L** في تثبيط نمو جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* خارج الجسم الحي بطريقة الانتشار في الآكار وذلك لاهميتها بصفتها أحدى المسببات للعديد من الامراض. بينت نتائج الكشف الأولي الكيميائي التمهيدي(الترسيبي) احتواء المستخلص الخام لأوراق نبات الزعتر على الفينولات والتربينات وخلوها من القلويدات، كما تم فصل المجاميع الفعالة من المستخلص الكحولي لنبات الزعتر واختبار فعاليتها التثبيطية ضد جرثومة الأختبار. اثبتت هذه التجربة ان المستخلص المائي والجزء المائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الزعتر قد أعطيا تثبيطا بسيطا في معدل قطر التثبيط بلغ 6.25 ملم لكل منهما في حين كان جزء البيكاربونات للمستخلص الكحولي هو الأكثر كفاءة في التثبيط إذ بلغ معدل القطر 11.65 ملم. بينت الدراسة ان ادنى تركيز مثبط لنمو الجرثومة المدروسة (MIC) كان لجزء البيكاربونات المفصول من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الزعتر قد بلغ 12.5 ملغم/ مل فيما كانت قيمة القاتل الأدنى (MBC) هي 25 ملغم/ مل.

Abstract

This study was conducted to test *in vitro* the effect of active materials that extracted by cold and boiled water, in addition to the extraction by different organic solvents , i.e. Ethyl Alcohol ; Hexan and Ethyl Acetate for the leaves of Thyme plant on inhibition growth of *Staphylococcus aureus* for its importance due to the causes of numerous diseases .Results showed from the preliminary chemical (filtration) test that, the extracts of thyme leaves contain, phenols and terpens, but without alkaloids, the active groups from alcoholic extracts were also seperated and its inhibition activities were tested against *S. aureus*. This study proved that, the aqueous extract and aqueous part of alcoholic extract produced an inhibition effect of 6.25 mm in diameter for both extracts, while, the bicarbonate part of alcoholic extract was the most effective in inhibition diameter, of 11.65 mm.The study also showed that, the minimum inhibition concentration of the bicarbonate part of alcoholic extract was 12.5 mg/ml growth of *S .aureus*. while, the minimum bactericidal concentration was 25 mg/ml .

* مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول عام 2006.

المقـــــدمـة

تعد مقاومة الجراثيم لفعل المضادات الحياتية إحدى أهم التحديات التي تواجه المختصين في المجال الطبي والصيدلاني, ورغم من ان المقاومة للمضادات الحياتية عرفت منذ العام 1940 عندما صنعت المضادات الحياتية لأول مرة , ولكن حصلت زيادة نوعية في المقاومة أثناء العقدين الماضيين من القرن العشرين,وقد لوحظ أن الانتشار الواسع لاستعمال المضادات بشكل عشوائي ودون إتمام مدة العلاج أدى الى تفاقم المشكلة (Aledort وآخرون , 2000).هنالك العديد من الجراثيم التي تسبب بعض الامراض المعدية كجراثيم المكورات العنقودية الذهبية التي تعد من الممرضات الانتهازية (apportunistic pathogen), تتفاوت أصاباتها بين إصابات جلدية بسيطة كالبثور (boils) الى إصابات خطرة كذات الرئة (pneumonia). وفي الماضي كانت أغلب أصابات هذه الجراثيم ممكنا علاجها بالمضادات الحياتية كالبنسلين ومشتقاته، ومنذ العام 1950أصبح علاجها اكثر صعوبة نتيجةً لتطويرها مقاومة العديد من المضادات الشائعة (Bonjar , 2004)،واعتمادا على تقارير منظمة الصحة العالمية World Health Organization (WHO),(2001) ان الزيادة في مقاومة *S.aureus* للمضادات أصبحت مشكلة المستشفيات في كل أنحاء العالم, وأمام هذه التحديات دعا الكثير من العلماء والباحثين للعودة الى الطبيعة. ووفقاً لدراسة اجرتهاWHO اعتماداً على استعمال

النباتات الطبية في 91 دولة ,تبين ان عدد النباتات الطبية يصل الى 20000 نوعاً نباتياً (Ates وErdogrul ، 2003) , وهذا ما حدى بعلماء الاحياء المجهرية للأهتمام بالمستخلصات النباتية المضادة للميكروبات كونها شبيهةً لتلك المواد الكيمائية التي تدخل في صناعة الادوية المضادة للميكروبات من حيث الكفاءة العلاجية للمسببات المرضية التي وصفها المختصون , وتطرح سنوياً أثنان أو ثلاثة من المضادات المشتقة من الجراثيم الى الاسواق ,ونتيجةً تداولها الواسع وجد العلماء أن قسما منها قد تحول خلال مدة قصيرة الى ادوية ذات فائدة محدودة وليست لها اية جدوى في العلاج , مما دعاهم للأسراع في إيجاد بدائل علاجية للمضادات الحياتية التقليدية تمثلت بالنباتات واللقاحات (Cowan،1999). أن استخلاص المواد الفعالة من النباتات الطبية يسمح لإثبات فعاليتها الفسيولوجية, كذلك يسهل الدراسات الدوائية مؤدياً الى تصنيع دواء أكثر فعالية مع اختزال السمية(Manna وAbalak, 2000), وهذا التكامل بالمكونات يعطي النبات الامان الكامل وكفاءة أفضل أو اشمل من تلك المواد المعزولة والمنقاة (Shariff,2001). ونتيجة ذلك تعد النباتات عوامل بديلة تحل محل العوامل الاخرى غير المؤثره لتقليل الزيادة الحاصلة في معدل المقاومة. لذا اجريت هذا البحث لاختبار الفعالية التضادية لمستخلصات أوراق نبات الزعتر لجراثيم المكورات العنقودية الذهبية على الوسط الزرعي بطريقة الحفر.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات النباتية

جمعت كمية كافية (1 كغم) من أوراق نبات الزعتر ***Thymus vulgaris* L** ثم نظفت لإزالة الشوائب والأتربة والأجزاء التالفة منها تحت ماء الحنفية، ثم بعد جفافها سحقت بالمطحنة Blender وحفظت في الثلاجة لحين الاستعمال. وشخصت العينات النباتية في مختبر التصنيف في كلية العلوم / جامعة الكوفة.

جرثومة الاختبار

تم الحصول على عزلة من جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *S.aureus* المنماة على وسط الغراء المغذيNutrient agar (NA), والمشخصة بشكل اولي في مختبر البكتريولوجي في مستشفى الحكيم في النجف بعدها نُميت هذه العزلة على وسط المانيتول الملحي الصلب Mannitol Salt Agar (MSA) كما اجريت عدد من الاختبارات الكيموحيوية للتأكد من تشخيص الجرثومة, وقد حضر اللقاح الجرثومي بأخذ عدة مستعمرات ذات حجم صغير من مزرعة حديثة بوساطة العروة Loop تم نقلها إلى أنبوبة اختبار تحتوي على 5 مل من المرق المغذي NB،وحضنت لمدة 4-5 ساعات بدرجة حرارة 37 ± 1مْ، بعدها اضيف المحلول الفسيولوجي، ثم مزجت جيداحتى تتكون عكرة مقاربة للعكرة الموجودة في المحلول القياسي لانبوبة ماكفرلاند رقم 0.5 الذي يقارب (1.5 × 108) مل/ خلية.

تحضير المستخلصات النباتية

حضر المستخلص المائي البارد لأوراق نبات الزعتر بحسب طريقة(Hernandez و آخرون ، 1994) التي تتضمن مزج كمية من المسحوق الجاف لأوراق نبات الزعتر مع كمية من الماء المقطر بنسبة 1غم:2مل ماء مقطر، وباستعمال الخلاط الكهربائي Blender وبدرجة حرارة الغرفة،ترك المحلول لمدة 24 ساعة ثم رشح الخليط الناتج بوساطة عدة طبقات من الشاش الطبي المعقم، بعدها وزع الراشح الناتج من الترشيح في انابيب اختبار في جهاز الطرد المركزي بسرعة 3500 دورة/دقيقة. كررت العملية السابقة نفسها باستبدال الماء البارد بماء مغلي، ثم اخذ الراشح لغرض التجفيف بالفرن الكهربائي بحرارة (40-45ْ م) المزود بمروحة هوائية لتجهيز تيار هوائي ساخن يساعد في التجفيف من ناحية ولتخفيف تأثير الحرارة على مكونات المستخلص من ناحية أخرى وذلك منعاً لحدوث أي تغييرات وظيفية أو كيميائية قد تؤدي الى انخفاض الفعالية البايولوجية للمستخلصات. وبعد ان تم الحصول على المسحوق المجفف لمستخلص أوراق النبات المستعمل في التجربة, وزن المسحوق الجاف وحفظ في قناني زجاجية محكمة الغلق ثم وضع في الثلاجة لحين الاستعمال .واستعملت طريقة Ladd وآخرون (1978) في تحضير مستخلصات المذيبات العضوية التي تتضمن ثلاث مذيبات عضوية مختلفة القطبية وهي الكحول الأثيلي (80)% (مذيب قطبي) وخلات الأثيل (متوسطة القطبية) والهكسان (لا قطبي)(Harborne, 1984). ولغرض الاستخلاص استعمل جهاز Soxhlet واخذ (10) غم من مسحوق النبات الجاف ووضع في حاوية جهاز الاستخلاص (Thumble) ثم أضيفت (200) مل من كل مذيب لأوراق نبات الزعتر ولمدة (24) ساعة للعينة النباتية الواحدة ابتداءً بالكحول الأثيلي (80) % ثم خلات الأثيل فالهكسان ولنفس العينة بدرجة حرارة (40-45)مْ، ثم كررت العملية نفسها مرات عديدة للحصول على كمية كافية من المادة الفعالة لإجراء التجارب عليها.

الكشف التمهيدي (الترسيبي) لمجاميع المركبات الكيميائية الثانوية لأوراق نبات الزعتر

تم الكشف عن المركبات الكيميائية لأوراق نبات الزعتر بحسب ماجاء في Harborne,(1984) اذ تم الكشف عن التربينات(الصابونين) والفينولات والقلويدات.

تقييم فعالية مستخلصات نبات الزعتر المختبرة في نمو جرثومة الاختبار بطريقة الانتشار في الآكار

حضر المحلول الخزين Stock solution بأخذ (2) غم من المستخلصات المائية وأذيب في اقل من (10) مل ثم اكمل الحجم الى (10) مل من الماء المقطر المعقم، وبذلك يكون تركيز محلول الخزن 200 ملغم /مل ومنه حضرت التراكيز المتسلسلة المستعملة التي تتضمن (25 و50 و100 و200) ملغم /مل، اما معاملة السيطرة فتمثلت بالماء المقطر المعقم فقط. استعملت طريقة الانتشار في الآكار بوساطة الحفر (Egorove, 1985) لدراسة تأثير مستخلصات نبات الزعتر في تثبيط نمو بكتريا *S. aureus*. وتضمنت هذه الطريقة عمل خمس حفر بقطر 6 ملم بوساطة الثاقب الفليني Cork porer وبأبعاد متساوية ثم نشر 0.1 مل من العالق البكتيري بوساطة Spreader بصورة متجانسة على وسط MHA (بعد مقارنتها مع انبوب ماكفرلاند القياسي رقم 0.5) ثم أضيفت التراكيز المحضرة لكل مستخلص(200,100,50,25) ملغم/مل بمقدار 0.1 مل لكل حفرة مع بقاء حفرة كسيطرة Control، ثم حضنت الأطباق بدرجة 37م لمدة 24 ساعة. وأمكن معرفة فعالية المستخلص بقياس منطقة التثبيط بوساطة المسطرة حول كل حفرة.

تحديد قيمة التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibition Concentration (MIC) والتركيز القاتل الأدنى Minimum Bactericidal Concentration (MBC) لبعض مستخلصات نبات الزعتر

استعملت طريقة التخافيف المتسلسلة Serial dilution method في تحديد التركيز المثبط الأدنى الذي يثبط نمو الجراثيم لكل من مستخلصات أوراق نبات الزعتر بتحضير تراكيز متسلسلة من كل مستخلص وبشكل تنازلي باستعمال المرق نقيع الدماغ والقلب Brain heart infusion (BHI) (3.1, 6.2, 12.5, 25 , 50 , 100) ملغم / مل وزعت كافة التراكيز المحضرة بحجم ناقل جرثومي Standard loop full من اللقاح الجرثومي المحضر الذي يكون عكرة مقاربة للعكرة الموجودة في المحلول القياسي لأنبوبة ماكفرلاند (0.5). اضافةً الى تحضير أنبوبي اختبار سيطرة الأول أحتوى على المستخلص من دون عالق بكتيري والاخر أحتوى العالق البكتيري من دون مستخلص، ثم مزجت محتويات الأنابيب بجهاز الهزاز Shaker لبضع دقائق وحضنت لمدة 24 ساعة بدرجة حرارة 37م، وبعد ان حُدد وجود النمو نظارياً (بوساطة العين) Visually وعملياً وذلك بزرع كل الأنابيب التي لم يظهر فيها عكر على أطباق الغراء المغذي وحضنت الأطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37م ولمدة 72 ساعة للتأكد من التراكيز التي لم يحدث فيها نمو جرثومي واعتبر التركيز الذي يقضي على الجراثيم نهائياً هو MBC (Working Party Report , 1991).

النتائج والمناقشة

الكشف الكيميائي التمهيدي(الترسيبي)للمركبات الفعالة لأوراق نبات الزعتر

أوضحت نتائج الكشف الكيميائي التمهيدي لبعض المكونات الفعالة المبينة في الجدول (1) ان اوراق الزعتر تحتوي على الفينولات التي تعد المكون الاساس والفعال لزيته الطيار فضلاً عن احتوائه على التربينات و التانينات و الفلافونات، وهذا يتفق مع ما ذكره Spiewak وآخرون (2001). أن احتواء مستخلصات نبات الزعتر على هذه المركبات والتي اشارت اليها الكثير من البحوث العلمية جعله يستعمل في مجالات الصناعات الدوائية. (Ahmad وآخرون , 1998 وShariff, 2001) وبذلك فأن التأثير المثبط لهذا النبات للجراثيم المرضية يعود لوجود تلك المواد التي تمتلك خصائص علاجية للعديد من المسببات المرضية مما شجع على استخلاص المركبات الفعالة فيه واختبار فعاليتها الدوائية وتسهيل الدراسات اللاحقة في مجال صناعة الادوية لتصنيع علاجات ذات كفاءة عالية مع اختزال السمية (Pamplona - Roger, 1999).

اختبار كفاءة مستخلصات نبات الزعتر في تثبيط نمو جرثومة *S.aureus*

تأثير نوع المستخلص النباتي في معدل اقطار تثبيط نمو جرثومة *S.aureus*

تفاوت تأثير مستخلصات نبات الزعتر في نمو جراثيم *S.aureus* فكان مستخلص جزء البيكاربونات هو الأشد تأثيرا في النمو إذ بلغ معدل قطر التثبيط 11.65 ملم تلاه مستخلص خلات الاثيل بقطر 10.87ملم. أما مستخلصي الماء المغلي والجزء المائي للمستخلص الكحولي فلم يعطيا الا تأثيرا بلغ (6.25 ملم لكل منهما) (شكل 1). وهذه النتائج مقاربة لنتائج العديد من الباحثين الذين أكدوا فعالية مكونات نبات الزعتر في تثبيط العديد من الكائنات الحية المجهرية فقد ذكر Katayama و Nagai,(1993) إن الـ Thymol والـ Carvacrol في زيت الزعتر يعود لهما التأثير المضاد لأنواع الجراثيم ومنها *S.aureus* . اما Inouy وآخرون (2001) فقد أكدوا فعالية بخار زيت الزعتر في تثبيط عدد من الجراثيم و منها *S.aureus*. اما تباين فعالية المستخلصات في التأثير فقد تعود الى طبيعة المواد المستخلصة بكل طريقة استخلاص و نوع المذيب المستعمل في عملية الاستخلاص، وهذا يتفق مع ما ذكره Mahasnesh وآخرون (1996), ويمكن تفسير قابلية الفينولات في تثبيط نمو الجراثيم المرضية على اساس قابليتها على مسخ البروتينات(Denature Protein) وايقاف فعل الانزيمات المسؤولة عن سلسلة من التفاعلات الايضية وهذا يؤدي الى فقدان الكائن الحي القدرة على النمو والاستمرار (Pyatkin و Krivoshein 1987).

تأثير تراكيز مستخلصات نبات الزعتر في نمو جرثومة *S.aureus*

يبين الشكل (2) حساسية جراثيم *S.aureus* لجميع التراكيز المختبرة باستثناء التركيز25 ملغم/مل وكان التركيز 200 ملغم /مل هو الاكفأ في تثبيط نمو الجراثيم إذ بلغ قطر التثبيط 10.9 ملم، إن التركيز 50 ملغم/مل أعطى قطرتثبيط قدره 7.5 ملم فقط وارتفع قطر التثبيط عند التركيز 100 ملغم/مل ليبلغ 8.8 ملم.

إن هذه النتائج لا توافق ما ذكره Bonjar, (2004) من قدرة مستخلص الزعتر بتركيز 20 ملغم/مل على تثبيط نمو جراثيم *S.aureus* التي بلغ معدل قطر التثبيط فيها 13 ملم، وهذا قد يعود الى حساسية الجراثيم للمستخلص او كمية المواد الفعالة الموجودة في نبات الزعترالمختبر. ويلاحظ بصورة عامة ان التأثير المثبط لنمو الجرثومة يزداد بزيادة التراكيز، وهذا يتوافق مع الكثير من الدراسات التي تؤكد ان فعالية معظم المركبات المثبطة للنمو المايكروبي تزداد بزيادة الجرعة المستعملة في الاختيار(حسين والمصلح, 1989).

تأثير تداخل مستخلصات نبات الزعتر وتراكيزها في نمو جرثومة *S.aureus*

تشير النتائج المبينة في الجدول (2) أن مستخلصات خلات الاثيل وجزء البيكاربونات وجزء الهيدروكسيد من المستخلص الكحولي والهكسان بدأ تأثيرها في نمو الجرثومة عند التركيز 50 ملغم/مل فبلغت معدلات اقطار التثبيط 10.5 و9.7 و7.5 و8.5 ملم على التوالي، اما بقية المستخلصات فلم تؤثر في النمو عند هذا التركيز, واعطى جزء البيكاربونات للمستخلص الكحولي بتركيز 200 ملغم/مل أعلى قطر تثبيط للجرثومة المختبرة إذ بلغ 17.8 ملم، وأقل المستخلصات تأثيراً في نمو الجرثومة عند التركيز 200 ملغم/مل هما مستخلصا الماء البارد والجزء المائي للمستخلص الكحولي إذ بلغ معدلا قطر التثبيط 7.0 ملم لكل منهما. إن التأثير الفعال لجزء البيكاربونات من المستخلص الكحولي في نمو هذه الجراثيم قد يعود الى احتواء هذا المستخلص كمية أكبر من الفينولات المتكونة اساساً من الثايمول و الكارفاكرول من بقية المستخلصات الاخرى (Wrightو2002 وPenalver و آخرون, 2005) وهذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Inouye وآخرون (2001) الذين أكدوا فعالية الـ Thymol والـ Geraniol في تثبيط نمو البكتريا *S.aureus* وبتراكيز قليلة جداً، وقد يعود الضعف في تأثير بعض المستخلصات الى طبيعة المواد المستخلصة من النبات او كمية المواد الفعالة المستخلصة وفقاً لطريقة الاستخلاص المستعملة.

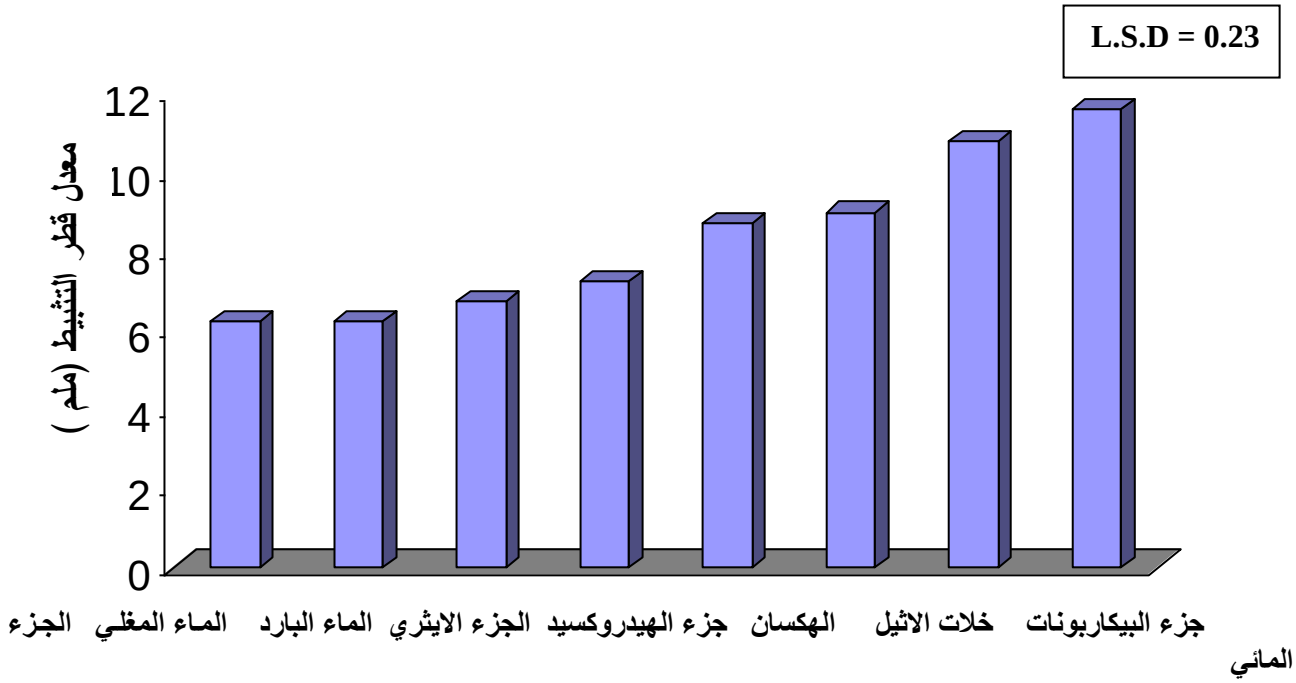
تحديد تأثير التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC لبعض مستخلصات نبات الزعتر

أن قيم MIC لمستخلصات اوراق نبات الزعتر وكما مبينة في الجدول (3) تبين ان اقل قيمة للـ MIC كانت لجزء البيكاربونات المفصول من المستخلص الكحولي التي بلغت 12.5 ملغم / مل فيما كانت قيمة MBC 25 ملغم/مل, في حين كانت قيم MIC لمستخلصي الهكسان وخلات الاثيل هي 25 ملغم/ مل وكانت هذه النتائج مقاربة لما توصل اليه Bonjar (2004) .وقد يعزى انخفاض قيم الـ MIC الى عدم تمكن البكتريا من مقاومة التراكيز المستعملة للمستخلصات وتطويرها لأحدى آليات المقاومة وبشكل فعال ضدها ولهذا يمكن القول ان هذه المستخلصات تتميز بكفاءة تثبيطية عالية لأحتوائها على نسبة عالية من المركبات الفينولية ذات القدرة على مهاجمة الجراثيم وقتلها او بأختزال معدل تكاثرها، وهذا يتوافق مع Wright (2002). وقد يرجع سبب التباين في قيم الـ MIC الى اختلاف المواد الفعالة لكلا المستخلصين والاختلاف في طبيعة المذيبات وطريقة الاستخلاص.

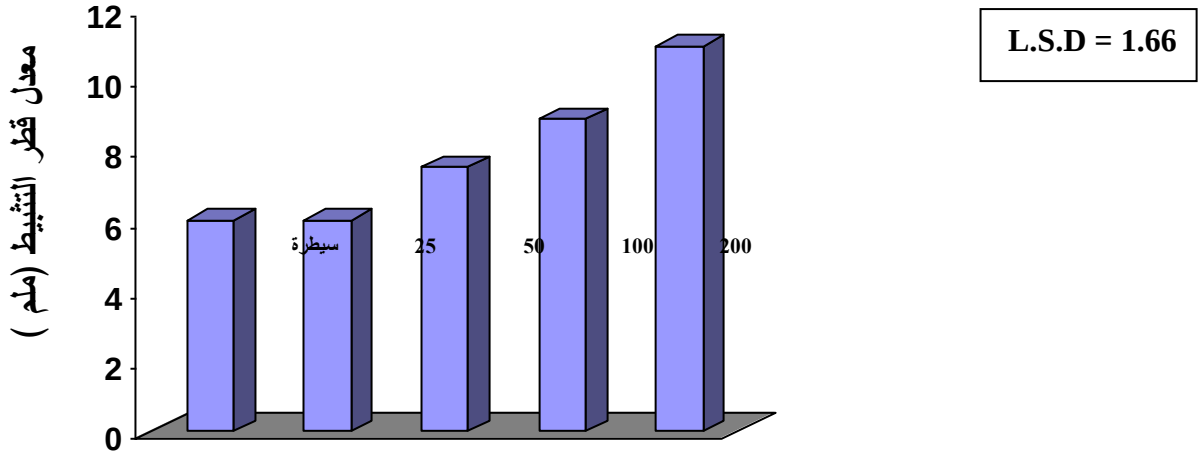
جدول 1 :الكشف الكيميائي التمهيدي (الترسيبي) للمركبات الفعالة لاوراق نبات الزعتر

المركب الكيميائي	أسم الكاشف	نوع المستخلص المختبر	مستخلص أوراق الزعتر
التربينات	الرغوه	مائي/ كلوروفورمي	+ / +
	كلوريد الزئبقيك	مائي	+
الفينولات	خلات الرصا ص	مائي/ كحولي	+ / +
	كلوريد الحديديك	مائي	+
	هيدروكسيد البوتاسيوم	كحولي	+
القلويدات	ماير	مائي/ كحولي	– / –
	دراكندروف	مائي	–
	حامض التانيك	مائي	–

+ يعطي نتيجة , – لا يعطي نتيجة



شكل 1: تأثير نوع المستخلص لاوراق نبات الزعتر في معدلات اقطار تثبيط نمو *S.aureus*



شكل 2: تأثير التراكيز المختلفة لمستخلصات اوراق الزعتر في معدلات اقطار تثبيط نمو *S.aureus*

جدول 2: تاثير التداخل بين مستخلصات أوراق نبات الزعتر وتراكيزها في معدلات أقطار تثبيط نمو جراثيم *S.aureus* (ملم)

التركيز(ملغم/مل) المستخلص	25	50	100	200
جزء البيكاربونات	6.0	9.7	13.1	17.8
خلات الاثيل	6.0	10.5	13.0	14.0
الهكسان	6.0	8.5	10.0	11.5
جزء الهيدروكسيد	6.0	7.5	10.0	11.3
الجزء الايثري	6.0	6.0	6.0	11.0
الماء البارد	6.0	6.0	7.0	8.0
الماء المغلي	6.0	6.0	6.0	7.0
الجزء المائي	6.0	6.0	6.0	7.0

L.S.D.للتداخل = 0.46

جدول3: قيم التركيز المثبط الادنى MIC والتركيز القاتل الادنى MBC لمستخلصات أوراق الزعتر

التركيز(ملغم/مل) نوع المستخلص	3.1	6.25	12.5	25	50	100
جزء البيكاربونات للمستخلص الكحولي	+	+	+	–	–	–
الهكسان	+	+	+	+	–	–
خلات الاثيل	+	+	+	+	–	–

+ ظهور نمو جرثومي , – عدم ظهور نمو جرثومي

المصـــــادر

حسين ، بهاء الدين والمصلح رشيد محجوب. (1990). الاحياء المجهرية في الاغذية. مطابع التعليم العالي، ص 560.

Ahmad,I.; Mehomood,Z. and Mohammed,F.(1998) Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial roperties.J.Ethnopharmacology,62(2),183–193 .

Aledort , J . ; Laxminarayan,R . ; Howard , D . ; Seiguer , E . and Weldon , S . (2000) International Workshopon Antibiotic Resistant : Global Policies and Options . Center for nternational Development . Harvard University , pp : 1 – 22.

Ates , D . A . and Erdogrul , O . T . (2003)Antimicrobial Activities of Various Medicinal and Commercial Plant Extracts . Turk . J . Biol . , 27 : 157 – 162 .

Bonjar.S . G . H(2004)Inhibition of three Isolates of Staphylococcus arueus Mediated by Plants used by Iranian Native People . Asian Journal of Plant Sciences, 4(2) : 136 – 141 .

Egorove , N . S . (1985) Antibiotics Scientific Approach . Mir publishers . Moscow.

Eisenberg , D . M ; Kessler , R . C . , Foster , C . , Norlock , F . E . , Calking , D . R . and Delbanco , T . H . (1993) Unconventional medicine in the United States : Prevalence , costs and patterns of as . N . Engl . J . Med . , 328 : 246 – 252 .

Harborne , G . B . (1984) Phytochemical Methods . Aguide to modern techniques of plants analysis . 2nd. ed . Chapman and Hall . London . New York .

Hernandez , M . ; Lopez , R . ; Abanas , R . M . ; Paris V. and Arias , A.(1994) Antimicrobial activity of Visnea mocanera leaf extracts . J.Ethnopharmacology , 41 : 115 – 119 .

Inouye , S . ; Takizawa , T . and Yamaguch , H . (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tractpathogens by gaseous contact . J .Antimicrobial Chemotherapy , 47(5) : 565–73 .

Katayama , T . Nagai , I . (1993) . Chemical siginificance of the volatile compnents of spices from the food preservation standpoint , structure and antimicrobial activity of some terpenes . Nippon suisan Gakkaishi , Vol (1)26 : 29.

Ladd , T . L ; Jacobson , M , and Buriff , C . R . (1978) Jopanese beetles extracts from neem tree seeds as feeding deferents . J . Econ .Entorol . 71 : 810 – 813 .

Mahasneh , A . M . ; Abbas . J . A . and E- Oqilah , A . A . (1996) Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Bahrain . Phytotherapy Res ., 10 : 253 – 257.

Manna, A. and Abalaka, M . E . (2000) Preliminary screening of the various extract of Physalis angulala L . for icrobialactives . Spectrum Journal , 7 (2) : 119 – 125 .

Pamplona – Roger , G . D . (1999) Encyclopedia of Medicinal Plants . Vol.1 and 2 , (2nd ed) . Education and Health library, The European Union , U . K . , PP : 128 – 150 .

Pyatkin , K . and Krivoshein , Y . N . (1987) Microbiology , Mir Publishers , Moscow .

Penalver , P . ; Huerta , B . ; Borge , C . ; Astorga , R . ; Romero , R . and Perea,A.(2005) Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of Enterobacteriaceae family . Apmis ; 113 (1) : 1 (Abst.) .

Shariff , Z . U . (2001) Modern Herbal Therapy for Common Ailments. Nature Pharmacy Series , Spectrum Books Limited , Ibadan , Nigeriain Association with Safari Books (Export) Limited , United Kingdom , Vol. 1, PP: 9 – 84 .

Spiewak , R . ; Skorska , C . and Dutkiewicz , J . (2001) Occupational airborne contact dermatitis caused by thyme dust. Contact Dermatitis , Department of Occupational Biohazards , Institute of Agricultral Medicine, Lublin , Poland ; 44 (4): 235 – 239 .

Working Party the British Society for Antimicrobial Chemotherapy . (1991) A guide to antibiotic sensitivty testing. J. Antimicrob. Chemotherpy , 27(supp1 .D) : 1 – 50 .

World Health Orgnisation (W.H.O) (2001) Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance .Available on Internet at: www.who.int/emc-documents/antimicrobial- resistance/docs/Eglobal-start.pdf .

Wright ,T ,(2002) Simple Essential Oil Remedies to The Most Common Ailments.C.F. Internet at www.findarticles.com/cf- o/mOHL /4-168/743334691/print.html.