الفاعلية الضدمايكروبية لمستخلص نباتي الزعتر *Thymus vulgaris L.* والنعناع *Mentha piperita L.* ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من أخماج الحروق

م. د. عباس ياسين حسن
كلية التربية المقداد / جامعة ديالى

م.د. سهام شكور عبيد
الكلية التقنية / جامعة كركوك

الخلاصة

شملت الدراسة 60 مريضا مصابا بالحروق في مستشفى بعقوبة التعليمي للفترة من بداية تشرين الثاني الى نهاية كانون الأول 2012 . زرعت المسحات التي أخذت من أخماج الحروق على وسطي Blood agar و Mannitol salt agar , فأظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والإختبارات الكيموحيوية التي أجريت على العزلات عائدية 15 عزلة 25% لنوع المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*. تم إختبار حساسية العزلات تجاه 8 مضادات حيوية مختلفة , وقد أبدت تحسسا لمضادات Azithromycin و Erythromycin و Ciprofloxacin و Ofloxacin و Amikacin في حين كانت مقاومة لمضادات Ampicillinو Amoxicilline وCephotaxime . أظهرت الدراسة ان للمستخلص المائي الحار لنبات النعناع تأثيرا معنويا بالتراكيز (10 , 20, 40 , 80 , 160) ملغم / مل ضد عزلات بكتريا *S. aureus* باقطار تثبيط (11.8 , 15.2 , 18.0 , 20.6 , 23.4) ملم على التوالي، ومن ناحية أخرى كان للمستخلص المائي الحار لنبات الزعتر تأثيراً مماثلا تقريبا بأقطار تثبيط (13.6 , 16.0 , 18.2 , 20.3) 0.0 ملم على التوالي.

كلمات مفتاحية: أخماج الحروق , المكورات العنقودية الذهبية , نبات الزعتر, نبات النعناع .

الفاعلية الضدمايكروبية لمستخلص نباتي الزعتر *Thymus vulgaris L.*
والنعناع *Mentha piperita L.* ضد بكتريا *Staphylococcus aureus*
المعزولة من أخماج الحروق

م. د. عباس ياسين حسن
م.د. سهام شكور عبيد

Antibacterial activity of *Thymus vulgaris L.* and *Mentha piperita L.* extracts against *Staphylococcus aureus* isolated from burn infection

Dr. Abbas Y. Hassan
Lecturer
Al- Muqdad college of Education
Diyala University

Dr. Siham Sh. Al-salihi
Lecturer
Technical college
Kirkuk University

Abstract

The study includes 60 patients infected with burns in Baquba Educational Hospital from the beginning of November to the end of December 2012. The swabs taken from burns have been cultured in media of blood agar and Mannitol salt agar. The characterizations of morphology and biochemical test for isolates shows that 15 isolates 25% belonged to *Staphylococcus aureus*. The isolates sensitivity were tested against 8 different antibiotics , which revealed sensitivity to Azithromycin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Ofloxacin, and Amikacin, while they were resistant to Ampicillin , Amoxicilline and Cephotaxime .This study revealed a significant effect of *Mentha piperita* hot water extract at the concentrations (10, 20, 40, 80, 160) mg/ ml against isolate of *Staph. aureus* with inhibition zones (11.8,15.2,18.0,20.6, 23.4)mm respectively. Approximately a similar inhibitory effects were observed using *Thymus vulgaris* hot water extract with inhibition zones (0.0, 13.6, 16.0, 18.2, 20.3) mm respectively.

Key words: Burn infection , *S. aureus, Thymus vulgaris*, *Mentha piperita*.

الفاعلية الضدمايكروبية لمستخلص نباتي الزعتر *Thymus vulgaris L.* والنعناع *Mentha piperita L.* ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* المعزولة من أخماج الحروق

م. د. عباس ياسين حسن م.د. سهام شكور عبيد

المقدمة

تُعد أخماج الحروق من المشاكل الصحية الرئيسة في العالم [1] , إذ يتعرض مرضى الحروق لمخاطر كبيرة ناجمة عن الالتهابات الموضعية وإصابات الجسم بصورة عامة[2] . لقد أصبح تلوث جروح الحروق بالأنواع الجرثومية مسألة شائعة ومستعصية في ردهات الحروق مما أدى الى ارتفاع نسب الوفيات, ومن أكثر الأنواع البكتيرية تكرارا لهذه الأخماج هي *S. aureus* [3] , المسؤولة عن عدد كبير من الأمراض التي تصيب الانسان بسبب قدرتها على تجنب كل الحواجز الدفاعية لجسم المضيف وامتلاكها مدى واسع من عوامل الضراوة [4] .

ان للمستحضرات الطبية الصناعية دورا هاما في القضاء على مصادر الخمج غير أنها قد تحمل آثارا جانبية مختلفة مما دعى الى استخدام المستخلصات النباتية والأعشاب الطبية المثبطة لنمو الأحياء المجهرية, ومنها مستخلص نبات الزعتر *Thymus vulgaris L.* الذي استخدم لفترات طويلة كعلاج لمدى واسع من الاعتلالات الجسدية وكمادة مطهّرة Antiseptic للأخماج [5] . يتمتع نبات الزعتر بقابلية كبيرة على التأثير في العديد من الأنواع البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام مثل *Citrobacter* sp. و *Salmonella typhi* و *S. aureus* و *Micrococcus* sp. و *Bacillus subtilis* وذلك لاحتوائه على مركبات مهمة طبيا مثل Thymol و Carvacrol و Caffeic acid و Tannins و Terpenoids[7,6]، ويستعمل الزيت الرئيسي لنبات الزعتر الغني بالمركبات الفينولية Phenolic compounds كمادة طاردة للريح Carminative ومضاد للمكروبات Antimicrobial كالبكتريا والفايروسات ومضاد للأكسدة Antioxidative [8], فضلا عن فاعليته الضد مايكروبية في علاج الجروح[9].

أما نبات النعناع *Mentha piperita L.* فيحتل أهمية طبية واقتصادية كبيرة لإحتوائه على الكثير من المركبات الكيميائية المهمة ذات الاستخدامات الطبية الشائعة ، منها Menthol و Menthyl acetate و Menthone و Pulegone و Menthofurane و Piperitone [11,10] , كما يحتوي مستخلص النعناع على مواد Tannins و Flavanoids المهمة في علاج بعض الأخماج البكتيرية [12]. استعمل النعناع في الطب الشعبي لعلاج أمراض الجهاز الهضمي مثل الغثيان وعسر الهضم, ويعمل كمهدىء للجهاز العصبي المركزي ومسكن موضعي للمغص الحاد وآلام الرأس وعلاج الانفلاونزا وأخماج البلعوم ومضادا للأكسدة وتشنجات العضلات التنفسية ومضادا للبكتريا والفطريات [13].

طرائق العمل

عزل وتشخيص البكتريا

زرعت المسحات المأخوذة من المرضى على الأوساط الزرعية Blood agar وMannitol Salt agar ، شخصت العزلات اعتمادا على شكل المستعمرة وصبغة كرام واختبار الكاتاليز Catalase test والأوكسديز Oxidase test واختبار تخثر البلازما Plasma coagulase test [14].

اختبار الحساسية للمضادات الحيوية

إختبرت حساسية العزلات البكتيرية للمضادات الحيوية على وسط Mueller-Hinton agar بحسب طريقةKirby Bauer disc diffusion method [15], قرأت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط وقيست بالمليمتر بواسطة مسطرة مدرّجة, قورنت النتائج بالمعدلات القياسية لقطر منطقة التثبيط للمضادات الحيوية المعتمدة عالميا[16].

تقدير فاعلية مستخلص نباتي الزعتر والنعناع ضد البكتريا

إستخدمت الاوراق النباتية للزعتر والنعناع التي تم الحصول عليها من مركز طب الأعشاب التابع لوزارة الصحة. إستعملت مطحنة كهربائية لطحن الأوراق للحصول على مسحوق حُفظ في قناني زجاجية مغلقة ونظيفة.

تحضير المستخلص المائي الحار

أضيف 15 غم من المسحوق النباتي الى 100 مل من الماء المقطر المغلي بدرجة حرارة 100°م وترك لمدة نصف ساعة في حاضنة هزازة ، ثم رشح المزيج بواسطة ورق ترشيح (Whatman no. 1, 2, 3, 6) ونبذ الراشح بجهاز النبذ المركزي بسرعة 2500 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقائق, جمع الراشح ووضع في أطباق زجاجية وجفف في الحاضنة بدرجة حرارة 37°م لمدة 48 ساعة للحصول على مسحوق جاف[17] .

تأثير مستخلص نباتي الزعتر والنعناع في نمو البكتريا

إستخدمت طريقة الإنتشار في الحفر بالغراءAgar well-diffusion method وكما يلي: حضر العالق البكتيري بنفس درجة عكورة ثابت العكرة القياسي(0.5) لعزلات *S. aureus* , لقح وسط Nutrient agar بواسطة قطيلة معقمة من العالق البكتيري الخاص ببكتريا *S. aureus* . عملت حفر في الأوساط الزرعية بواسطة ثاقب فليني معقم بقطر 5ملم. أضيف اليها 100 مايكروليتر من محلول المستخلص, وقد جرى اختبار فعالية المستخلص للتراكيز(160,80,40,20,10) ملغم/مل على نمو البكتريا, كما عملت حفرة وضع فيها ماء مقطر معقم اعتمدت كسيطرة

Control. حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 ْم لمدة 24 ساعة, تم بعدها قياس قطر منطقة تثبيط النمو حول كل حفرة بالمليمتر[18].

حللت البيانات احصائيا وفق اختبار T(T-test), كما تم استخدام تحليل التباين الاحادي One way analysis of variance والمقارنات المتعددة Multiple comparisons بطريقة الفرق المعنوي الأصغر Least Significance Differences لمعرفة وجود فروق معنوية بين المعاملات المختلفة. ثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي ± الخطأ المعياري).

النتائج والمناقشة

عزل بكتريا *S. aureus*

أظهرت نتائج الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية التي أجريت على الجراثيم المعزولة من جروح مرضى الحروق عائدية 15 عزلة 25% لنوع *S. aureus* , أتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه كل من Ekrami وKalantar [19] و Shahzad وجماعته[20] و Chalise وجماعته [21], إذ وجدوا أن اصابة هذه الجرثومة لجروح مرضى الحروق كان بنسبة 20% و 22% و 28% على التوالي, بينما لم تتفق النتائج الحالية مع دراسة الباحث Alsaimary [22] الذي عزلها بنسبة أكبر تقدّر بـ 54.83%.

ان تواجد هذه البكتريا بصورة طبيعية بنسبة (20-30)% على الجلد والأغشية المخاطية للأنسان يُعد أحد العوامل الممهدة للأصابة بهذه الجرثومة [23] , كما أن قدرة هذه البكتريا على انتاج كميات كبيرة من الانزيمات والسموم قد يلعب الدور الكبير في تحطيم أنسجة المضيف وتحفيزها على النمو والتكاثر مما يتسبب في تسهيل غزوها وانتشارها بجسم المضيف[24] ,وهذا ما يفسّر أيضا مدى نجاح الجرثومة في احداث الخمج.

حساسية عزلات *S. aureus* للمضادات الحيوية

أختبرت في الدراسة الحالية حساسية عزلات *S. aureus* البالغة 15 عزلة تجاه 8 مضادات حيوية مختلفة. أظهرت النتائج أن كافة العزلات المدروسة 100% مقاومة لمضاد Ampicillin, في حين تفاوتت في مقاومتها لعدد من المضادات فقد أبدت 93.33% مقاومة لمضاد Amoxicillin و 80% مقاومة لمضاد Cefotaxime و 40% مقاومة لمضاد Azithromycin و 33.33% مقاومة لمضاد Erythromycin و 6.66% مقاومة لمضاد Ciprofloxacin, في الوقت الذي كانت كافة العزلات حساسة لمضادي Ofloxacin و Amikacin جدول(1).

ان ارتفاع نسبة مقاومة بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية قد يعزى الى الاستخدام الواسع والعشوائي لتلك المضادات[20]. تشير الدراسة الحالية الى المقاومة البكتيرية العالية لمضادي Ampicillin و Amoxicillin, وقد فسّر ذلك الى اكتساب البكتريا بلازميد يشفر عن انتاج أنزيمات البيتالاكتاميزBeta-lactamase المحللة لهذه المضادات من مجموعة البنسلينات[25]. كما ارتفعت نسبة مقاومة البكتريا لمضادCefotaxime وهذا يتفق مع ما توصل اليه Bayat وجماعته[26]، وقد فسّر Ortez [27] مقاومة البكتريا للمضاد الى قابلية عزلاتها على انتاج انزيمات البيتالاكتاميز. أما النتيجة التي سجلت حول المقاومة المعتدلة لكل من مضادي AzithromycinوErythromycin فجاءت مؤكدة لنتائج دراسةChalise وجماعته[21]. وفيما يتعلق بمقاومة البكتريا لمضاد Ciprofloxacin كانت النتائج منسجمة مع ما توصل اليه Al-Hamdani وHamad[28]عن الكفاءة العالية لهذا المضاد في علاج الأخماج المتسببة عن البكتريا الموجبة لصبغة كرام وبالأخص المكورات العنقودية الذهبية ، فضلاً عن ندرة استخدام المضاد بصورة عامة في علاج الأمراض مما يمنع الجرثومة من تطوير مقاومة له . كما أظهرت كافة العزلات تحسسا لمضاديّ Ofloxacin و Amikacin بنسبة 100%, ويُعد Ofloxacin من المضادات الواسعة الطيف Broad spectrum ذات التأثير الفعال على العديد من أنواع البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام[21].

جدول(1) نتائج فحص حساسية بكتريا *S. aureus* للمضادات الحيوية

المضاد الحيوي	عدد ونسبة العزلات المقاومة	عدد ونسبة العزلات الحساسة
Ampicillin	(% 100) 15	(% 0.00) 0
Amoxicillin	(% 93.33) 14	(% 6.66) 1
Cefotaxime	(% 80) 12	(% 20) 3
Azithromycin	(% 40) 6	(% 60) 9
Erythromycin	(% 33.33) 5	(% 66.66) 10
Ciprofloxacin	(% 6.66) 1	(% 93.33) 14
Ofloxacin	(% 0.00) 0	(% 100) 15
Amikacin	(%0.00) 0	(% 100) 15

إختبار الفاعلية الضد مايكروبية لنباتي الزعتروالنعناع

أُجري اختبار تقدير فاعلية المستخلص النباتي للزعتر والنعناع على بكتريا *S.aureus* لما لها من دور في أخماج الحروق , وذلك باستخدام طريقة الإنتشار في الحفر بالغراءAgar well-diffusion method.

تبين من خلال النتائج ان للمستخلص المائي الحار لنبات الزعتر فاعلية عالية ضد بكتريا *S.aureus* عند تركيز 160 ملغم/مل, فبلغ معدل قطر منطقة التثبيط 20.3 ملم تليها التراكيز (80 ,40 ,20) ملغم/مل وبمعدل اقطار تثبيط (13.6,16.0,18.2) ملم على التوالي, في حين لم يكن هنالك تاثيرا يذكر عند تركيز 10ملغم/مل جدول(2). وقد كانت الفروقات معنوية ($p< 0.05$) بين اقطار التثبيط للتراكيز المذكورة.

جدول(2)تاثير المستخلص المائي الحارلنبات الزعتر على بكتريا *S. aureus*

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم ± الخطا المعياري
0.00	*(f, e, d, c) 0.00 ± 0.00
10	*(f, e, d, c) 0.00 ± 0.00
20	*(f, e, d, b, a) 0.13 ± 13.60
40	*(f, e, c, b, a) 0.11 ± 16.00
80	*(f, d, c, b, a) 0.15 ± 18.20
160	*(e, d, c, b, a) 0.14 ± 20.30

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى ($p< 0.05$)
- الحروف(f, e, d, c, b, a) تمثل التراكيز(160,80,40,20,10,0)ملغم / مل على التوالي

جاءت نتائج هذه الدراسة مطابقة مع ما توصل اليه Issa [29] الذي أكد على التأثير التثبيطي لمستخلص نبات الزعتر بالتراكيز(160, 80, 40, 20) ملغم/مل على بكتريا *S. aureus* التي تم عزلها من أخماج قرحة الفراش. وأشارت دراسة الباحثة Lakis وجماعتها [30] الى الفاعلية الكبيرة لزيت الزعتر ضد *S. aureus* من سلالات الأنماط القياسية والبرية التي تصيب الانسان, وان زيادة تأثير فاعلية المستخلص على البكتريا يعتمد على زيادة تركيزه وهذا ما يتفق مع نتائج الدراسة الحالية فقد حقق التركيز 160 ملغم/مل أعلى تاثيرا بين التراكيز الاخرى بمعدل تثبيط 30 .20 ملم.

يعزى التاثير الضد مايكروبي لمستخلص نبات الزعتر لإحتوائه على مواد فعالة بايولوجيا مثل Cinnamaldehyde و Carvacrol و Thymol التي تؤثر على البكتريا عن طريق التثبيط الانزيمي بفعل مركباتها المؤكسدة ، وأكد على ذلك الباحث Cowan[31] الذي أوضح دور هذه المواد في التأثير على أنواع مرضية مختلفة من البكتريا والفطريات. وقد تعود الميكانيكية المسؤولة عن سمية الفينولات الموجودة في نبات الزعتر عند قتلها بكتريا *S. aureus* الى عمل ثقوب في غشائها البلازمي مما يؤدي الى فقدان الغشاء وظيفته وبالتالي التسبب بموت الخلية[32].

من جانب آخر أظهرت نتائج الاختبار ان للمستخلص المائي الحار لنبات النعناع فاعلية عالية ضد المكورات العنقودية الذهبية عند تركيز 160 ملغم/مل, فبلغ معدل قطر منطقة التثبيط 23.4 ملم تليها التراكيز (80 ,40 ,20) ملغم/مل وبمعدل أقطار تثبيط (20.6 ,18.0 ,15.2) ملم على التوالي, في الوقت الذي كان التأثير الأقل عند تركيز 10 ملغم/مل إذ بلغ 11.8 ملم جدول (3). وقد وجد ان هنالك فروقاً معنوية ($p< 0.05$) بين اقطار التثبيط للتراكيز المختلفة .

جدول(3)تاثير المستخلص المائي الحارلنبات النعناع على بكتريا *S. aureus*

التركيز ملغم/مل	معدل قطر منطقة التثبيط ملم ± الخطا المعياري
0.00	*(f, e, d, c, b) 0.00 ± 0.00
10	*(f, e, d, c, a) 0.14 ± 11.80
20	*(f, e, d, b, a) 0.12 ± 15.20
40	*(f, e, c, b, a) 0.11 ± 18.00
80	*(f, d, c, b, a) 0.14 ± 20.60
160	*(e, d, c, b, a) 0.13 ± 23.40

- العلامة * دليل على وجود فرق معنوي عند مستوى ($p< 0.05$)
- الحروف (f, e, d, c, b, a) تمثل التراكيز(160,80,40,20,10,0) ملغم/مل على التوال

ان نتائج الدراسة الحالية جاءت مطابقة لدراسة Probst وجماعته[33] و Schelz وجماعته[34] التي أشارت خلالها الى أهمية مستخلص النعناع كمادة فعالة ضد جرثومة *S. aureus* المعزولة من مصادر سريرية مختلفة. كما تبين من نتائج هذه الدراسة أن نسبة قتل هذه الجراثيم ترتفع بزيادة تركيز مستخلص نبات النعناع, إذ سجّل التركيز 160 ملغم/مل أعلى تأثيرا بين التراكيز الاخرى بمعدل قطر تثبيط 23.40 ملم وبفارق معنوي عند مستوى ($p< 0.05$)

وهذا يتفق مع دراسة الباحث Jeyakumar وجماعته [35]. وقد يعود السبب لفاعلية المستخلص الى احتوائه على المواد الفعالة مثل Tannins و Flavanoids وMenthol التي تمتلك خصائص سمّية عالية ضد البكتريا مثل *S. aureus* و *Acinetobacter* وE. *coli* وضد بعض انواع الفطريات مثل *Candida albicans* و *Candida glabrata*[36].

يمكن تفسير آلية عمل التانينات (Tannins) والمركبات الفينولية الأخرى لنبات النعناع الى قابليتها لترسيب بروتينات الغشاء الخلوي او بروتينات المحتوى السايتوبلازمي للخلية الحية عند نفاذها من خلال الغشاء وتكوين أواصر هيدروجينية بين مجاميع الهيدروكسيل الفينولية Phenolic hydroxyl الحرة والمتعددة والمركبات النتروجينية أو البروتينات وبالتالي تثبط فاعلية بعض الأنزيمات الضرورية للخلية البكتيرية[37].

ان معدل تأثير مستخلص نبات النعناع على بكتريا *S. aureus* كان أكبر من تأثير مستخلص نبات الزعتر على نفس العزلات, إلا أن الفروقات في هذا التأثير لم تكن معنوية, إذ تتأثر المكونات الفعالة للنباتات الطبية بصورة عامة في كمياتها ونوعياتها بظروف تنمية النباتات [38], كما يتفاوت تأثير هذه المركبات على الأحياء المجهرية اعتمادا على التراكيز المستعملة من المستخلصات واعداد البكتريا الخاضعة للفحص, فضلا عن ظروف إجراء التجربة[39].

References

1. Rajput, A. ; Singh, K. P. ; Kumar, V. ; Sexena, R. and Singh , R. K. (2008) . Antibacterial resistance pattern of aerobic bacteria isolates from burn patients in tertiary care hospital. Biomedical Research, 19(1): 1-4.
2. Idomir, M. ; Pirau, R. ; Nemet, C. and Badea, M. (2012). Evaluation of microbiological spectrum of burn wound infections. Med. Sci. , 5(1) : 7-12.
3. Altoparlak, U. ; Erol, S. ; Akcay, M. N. ; Celebi, F. and Kadanali, A. (2004). The time – related changes of antimicrobial resistance patterns and predominant bacterial profiles of burn wounds and body flora of burned patients. Burns, 30 : 660 – 664.
4. Plata, K. ; Rosato, A. E. and Wegrzyn, G (2009). *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Acta. Biochim. Pol. 56: 597- 612.

5. Zekovic, Z. P. ; Lepojevic, Z. D. ; Markov, S. L. and Ilosevic, S. G. (2002). Tables with thyme *(Thymus vulgaris L.)* Extracts. Chromotographia. 33: 159 -165 .
6. 6.Oyewole, O. I. ; Owoseni, A. A. and Faboro, E. O. (2010). Studies on medicinal and toxicological properties of *Cajanus cajan*, *Ricinus communis* and *Thymus vulgaris* leaf extracts. J. Med. Plant. Res. , 4(19) : 2004- 2008.
7. Karimi, Z. and Rahemi, M. (2009). Comparison extract oils of thymol and caryophyllus and imazalill fungicidies on thev decay penicillium italicum citrus fruits in cold storage. J. Sci. Agri. Techniquies. , 12(45).
8. Nejad, E. S. ; Haddian, J. ; Mirjalilli, M. H. ; Sonboli, A. and Yousefzadi, M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. Food chem. , 110 : 927 -931 .
9. Al-Araji, M. K. ; Hatem, S. F. and Aziz, F. M. (2011). Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* and *Prunus amygdalus* extracts against bacterial wound infection. AJPS. , 10(2): 198 -205.
10. Sokovic, M.D. ; Vukojevic, J. ; Marin, P.D.; Brkic, D.D.; Vajs, V. and van Griensven, L.J.(2009). Chemical composition of essential oils of thymus and Mentha species and their antifungal activities. Molecules, 14(1); 238- 249.
11. Saeidnia, S.; Reza- Gohari, A.;Yassa, N. and Shafiee, A.(2005). Composition of the volatile oil of Achillea conferta Dc. from Iran. Daru, 13: 34 – 36.
12. Kaur, J.; Xavier, R.; Marimuthu, A.; Leng, K. M.; Rajasekaran, A.; Kathiresan, S. and Sreeramanan, S.(2010). Preliminary investigation on the antibacterial activity of mango *(Mangifera Indica L:* Anacardiaceae) seed Kernel. Asian Pacific J. Trop. Med., 3(9): 707-710.
13. Hedges, L.J. and Lister, C.E.(2007). Nutritional attributes of herbs. Crop and food Research Confidential Report H 1891, A report prepared for Horticulture New Zealand.
14. Brook,G.F.;Carool,K.C.;Bultel,J.S.and Morse, S .A .(2007). Medical microbiology. 24th Ed., Mc Grow- Hill companies, USA. , 818 pp.

15. Vandepitt, J. and Verhapgen, J.(2003). Basic laboratory procedures in: linical bacteriology, 2nd Ed., World health organization, Geneva: 167 pp.
16. NCCLS.(2007). Performance standard for antimicrobial disk susceptibility testing, 17th ed., Informational supplement.NCCLS document M100-S17.National Committee on Clinical Laboratory Standard, Wayne, Pennsylvania, USA.
17. Anesini,C. and Perez,C.(1993). Screening of plants used in Argentin folk fedicine for antimicrobial activity. J. Ethnopharma. ,39(20): 119- 128.
18. Baron , E.J. and Finegold, S.M. (1994).Diagnostic Microbio-logy. 9th Ed., The C.V. Mosby Co., USA.
19. Ekrami,A.and Kalantar,E.(2007).Bacterial infections in burn patients at aburn hospital in Iran. Indian J.Med.Res.,126:541- 544.
20. Shahzad,M.N;Ahmed,N.;Khan,I.H.;Mirza,A.B.and Waheed,F. (2012).Bacterial profile of burn wound infections in burn patients.Ann.Pak.Inst.Med.Sci., 8(1): 54- 57.
21. Chalise, P.R.; Shrestha, S.; Sherpa, K.Nepal, U.; Bhattachan, C.L.and Bhattacharya, S.K.(2008). Epidemiological and bacter- iological profile of burn patients at Nepal Medical College Teaching Hospital.Nepal Med.Coll.J.,10(4):233-237.
22. Alsaimary,I.E.(2009).Efficacy of some antibacterial agents on *Staph.aureus* isolated from various burn cases. Int. J. Med .Med.Sci.,1(4):110-114.
23. Kluytmans,J.A.and Wertheim,H.F.(2005),Nasal carriage of *Staph.aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection, 33(1): 3-8.
24. Cheung,A.L.(2004). Regulation of virulence determinants in vitro and in vivo in *Staph. aureus* . FEMS Immun. Med.Microbiol., 40: 1-9.
25. Ahmad,B.M.and Kudi,M.T.(2003).Chronic supprative otitis media in Gombe.Nigeria.The Nigeria J.sur.res., (5): 3-4.
26. Bayat,M.;Zia,M.;Haghi,M.;Hemmatyar G. and Toghyani,M. (2011). Antibiotic resistance pattern of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aurus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burnt patients in Urmia,Iran. Afr .J . Microbiol. Res., 5 (9): 996-1000

27. Ortez,J.H.(2005).A Guide to Using the NCCLS Documents. In:Coyle,M.B.(Eds).Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology antibiology, Washington,pp25-38.
28. Al-Hamdani,M.A. and Hamad,I.G.(2012).Study of plasmid profile, susceptibility patterns of clinical *Staph. aureus* isolated from patients with otitis media in Basrah.J.Basrah.Res.Sci.,38(1): 79-89.
29. Issa,M.A.K.(2004).The effect of Thymbra spicata extract on infection in patients with bed sore .M.Sc.Thesis,College of science –University of Al-Mustansiriya,(In Arabic).
30. Lakis, Z.; Mihele, D.; Nicorescu,I.; Vulturescu,V.and Udeanu, D . I. (2012). The antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and origanum syriacum essential oils on *Staphylococcus aures*, *Streptococcus pneumoniae* and Candida albicans. Farmacia., 60(6): 857-865 .
31. Cowan,M.M.(1999).Plant products as antimicrobial agents. Clin.Micro.Revi.,12(4):564-582.
32. Shapiro,S.and Guggenheim,B.(1995).The action of thymol on oral bacteria,Or.Micro.Immun.,10(4): 241-246.
33. Probst, I.S.; Sforcin, J.M.; Rall, V.L.M.; Fernandes, A.A.H. and Fernandes, J.A.(2011). Antimicrobial activity of propolis and essential oils and synergism between these natural products. J . Venom.Anim.Toxins.incl.Trop.Dis.,17(2): 159-167.
34. Schelz, Z.;Molnar, J . and Hohmann, J.(2006).Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils.Fitoterapia.,77(4): 279-285.
35. Jeyakumar, E. ;Lawrence, R. and Pal,T.(2011).Comparative evaluation in the efficacy of peppermint*(Mentha piperita)* oil with standards antibiotics against selected bacterial pathogens. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicin., 253-257.
36. Pramila, D.M.; Xavier, R.; Marimuthu, K.; Kathiresan, S.; Khoo, M.L.;Senthilkumar, M.; Sathya, K.and Sreeramanan, S. (2012). Phytochemical analysis and antimicrobial potential of methanolic leaf extract of peppermint (*Mentha piperit*a :Lamiaceae). J. Med. Plants res.,6(2);331-335.

37. Covington , A. D. (1997) . Modern tanning chemistry .J. Chem .Soc.Rev., 26:73- 146.
38. Reynolds,S.J.;Black,D.W.; Borin, S.S.; Breuer, G.;Burmeister, L.F.;Fuortes,L.G.Smith, T.F. ; Stein ,M .A . ; Subramanian,P.; Thorne P.S. and Whitten,P(2001). Indoor environmental quality in six commercial office buildings in the midwest United States.Appl. Occup.Inviron.Hyg.,16:10650-10677.
39. Varel,I. and Vincent,H.(2002).Carvacrol and thymol reduce swine waste odor and pathogens:stability of oils Curr:Microbiol., 44:38-43.