

مقایسه حداقل غلظت مهاري عصاره گیاه مورد و نیستاتین بر روی سویه‌های کلینیکی و استاندارد *Candida albicans* در شرایط آزمایشگاهی

سیروس بیدریغ*^۱، محمدرضا خوش خلق^۲، علیرضا مسیحا^۳، خسرو عیسی زاده^۴، محمد فائزی قاسمی^۵
*^۱، ^۲، ^۳، ^۴ و ^۵ - دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه بیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶
s_bidarigh@yahoo.com

چکیده

در این مطالعه اثرات مهاري عصاره گیاه *Myrtus communis* و نیستاتین بر روی ایزوله‌های بدست آمده از بیماران مبتلا به ولوواژینیت کاندیدیایی و سویه استاندارد *Candida albicans* ATCC90028 در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاهی مورد، محصول شرکت باریج اسانس کاشان به منظور تعیین حداقل غلظت مهاري عصاره به همراه سویه استاندارد و نمونه‌های کلینیکی مخمری، به روش Macrodilution broth استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که بهترین میزان غلظت مهاري از عصاره گیاه بر روی نمونه‌های کلینیکی و سویه استاندارد به ترتیب معادل ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و ۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و نیز بهترین میزان غلظت مهاري از داروی نیستاتین معادل ۳۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بوده است. همچنین مشخص گردید که عصاره گیاهی مورد در غلظت‌های کمتری نسبت به داروی نیستاتین بر روی سویه‌های کلینیکی و استاندارد اثرات مهاري خود را نشان داده است.

کلمات کلیدی: فعالیت ضد میکروبی، *Candida albicans*، گیاه مورد، نیستاتین.

مقدمه

استفاده از طب سنتی قرن‌هاست که در بسیاری از جوامع جهت درمان بیماری‌های مختلف انسانی شناخته شده است. در طی بیست سال گذشته علاقه‌مندی زیادی در خصوص استفاده از مواد طبیعی به عنوان منابع عوامل ضد باکتریایی جدید به وجود آمده است. هرچند که استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتری‌های مختلف را امکان‌پذیر ساخته است اما استفاده بی‌رویه و مفرط از آن منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در میان میکروارگانیسم‌ها شده است لذا به منظور نیاز به توسعه درمان‌های ضد میکروبی جدید در سالیان اخیر توجه زیادی به استفاده از منابع طبیعی معطوف شده است. در این میان عصاره‌های مختلفی از گیاهان دارویی سنتی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند و تعدادی از محصولات طبیعی به عنوان داروهای جدید ضد باکتریایی به تأیید رسیده‌اند اما نیاز فوری وجود دارد که بتوان مواد جدیدی را که در مقابل انواع خیلی مقاوم باکتری‌های بیمارزا فعال هستند شناسایی نمود (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷). استفاده از گیاهان در درمان سوختگی‌ها و بیماری‌های عفونی یا به صورت ترکیبات آنتی‌سپتیک و ضد التهابی در طب سنتی ایران شایع می‌باشد به همین منظور جهت نشان دادن طیف اثربخشی منابع طبیعی از عصاره آبی گیاه مورد (*Myrtus communis*) در این بررسی استفاده گردید. در طبقه بندی علمی گیاه مورد در خانواده *Myrtle* یا *Myrtaceae* قرار دارد. این خانواده شامل حدود ۱۳۰ جنس و ۳ هزار گونه می‌باشد. گیاه *Myrtle* انتشار وسیعی در مناطق گرمسیر دنیا از جمله استرالیا دارد. برگ‌های خشکیده این گیاه حداقل دارای ۱/۵ درصد حجمی اسانس زرد کم رنگ می‌باشد. این

گیاه درختچه‌ای به ارتفاع حداکثر ۵ متر با ساقه افراشته و منشعب، برگ‌های ساده و متقابل و گل‌ها به صورت منفرد در طول محور برگی قرار گرفته‌اند. بهترین زمان جمع‌آوری برگ از اواسط بهار تا اواسط تابستان است زمانی که گیاه حداکثر فتوسنتز را انجام می‌دهد. در برگ‌های این گیاه علاوه بر اسانس تانن، فلاونوئید و ویتامین ث نیز وجود دارد و فاقد آلکالوئیدها و گلیکوزیدهای قلبی می‌باشد (۴، ۱۷، ۱۹ و ۲۰). طی مطالعه‌ای که توسط شهیدی و همکاران (۲۰۰۴) در خصوص فعالیت ضد باکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی ایران صورت گرفت مشخص گردید که در میان فعالترین گیاهان مورد بررسی *Myrtus communis* در مقابل *Pseudomonas aeruginosa* و گونه فلوتوسانس بیشترین اثر بخشی میکروبی را داشته است (۱۶). همچنین در بررسی صورت گرفته توسط غلامحسینیان و همکاران (۲۰۰۸) در خصوص اثر مهاری تعدادی از عصاره‌های گیاهی ایران معلوم شد که عصاره‌های متانولی و آبی گیاه مورد بر روی آلفاگلوکوزیداز به میزان بیش از ۷۵ درصد اثر مهاری داشته است (۱۰). داود یادگارنیا و همکارانش (۲۰۰۶) از مطالعه خود در خصوص فعالیت بیوشیمیایی اسانس گیاه مورد ایرانی نتیجه گرفتند که آنالیز GC Mass اسانس گیاه مورد حاوی ۳۲ نوع ترکیب مختلف می‌باشد و این گیاه فعالیت ضد میکروبی بسیار خوبی در مقابل *E.coli*، *S.aureus* و *Candida albicans* نشان می‌دهد (۲۴). مطالعه صورت گرفته توسط رسولی و همکاران (۱۳۸۷) در خصوص فعالیت ضد قارچی *Myrtus communis* L بر ضد ایزوله های *Aspergillus* نشان داد که اسانس این گیاه بر روی قارچ *Aspergillus fumigatus* اثر مهاری داشته

فعالیت ضد میکروبی این عصاره به میزان اندک وجود دارد در این بررسی برای نخستین بار اثرات مهاری عصاره نه تنها بر روی سویه استاندارد بلکه بر روی ایزوله‌های کلینیکی مخمر *Candida albicans* نیز نشان داده شد. همچنین تأثیر مقایسه‌ای عصاره و داروی نیستاتین بر روی سویه‌های مخمری جدا شده از موارد کلینیکی و سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی

عصاره گیاهی مورد از شرکت کارخانجات دارویی غذایی و بهداشتی باریج اسانس (Myrtle%2) کاشان تهیه گردید.

تهیه سویه استاندارد *Candida albicans*

در این مطالعه از سویه استاندارد (ATCC90028) مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران استفاده گردید.

تهیه ایزوله‌های کلینیکی *Candida albicans*

بر اساس کشت نمونه‌های کلینیکی بیماران مشکوک به ولو واژینیت کاندیدیایی با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی، به منظور تایید گونه‌ای مخمر و خالص سازی آن از سویه‌های بدست آمده در انجام آزمایش استفاده گردید.

مواد و محیط‌های کشت میکروبی

محیط‌های سابورود کستروزاگار و سابورود کسترو برات-DMSO (مرک-آلمان)- کروم-اگار-آنتی بیوتیک نیستاتین (بیو مریو-کشور فرانسه)

است. در یک بررسی مشابه بر روی گیاه بومی مورد که در منطقه کرمان جمع آوری و عصاره‌گیری شده بود نشان داده شد که اثر عصاره نسبت به دارو در رقت‌های مشابه بر روی درماتوفیت‌های مورد آزمایش بیشتر بوده است (۳). تحقیقات صورت گرفته جهت شناسایی عوامل جدید ضد میکروبی توسط بسیاری از محققین نشان داده است که فعالیت‌های ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی منجر به مهار رشد عوامل انگلی، باکتریایی و عده‌ای از عوامل قارچی شده است، به طوری که در مناطقی از دنیا درمان‌های گیاهی توانسته است نقش اساسی در طب سنتی به عنوان عوامل درمانی برای تعدادی از بیماری‌ها همچون کاندید یازیس و عفونت‌های درماتوفیتی ایفا نماید (۱، ۴، ۲۰ و ۲۱). امروزه مشخص گردیده است که مقاومت در میان پاتوژن‌ها نسبت به عوامل درمانی شایع رو به افزایش است. ظهور مقاومت حتی در مورد مخمر *Candida albicans* به عنوان یک علت مهم ولو واژینیت کاندیدیایی نیز گزارش شده است به طوری که ایزوله‌های *Candida albicans* توانسته است پس از دو هفته متعاقب درمان ضد قارچی با فلوکونازول و آمفوتریسین B، مقاومت نشان دهد (۲۰ و ۲۱). به طور شایع در ۸۵٪ از موارد، بیماران مبتلا به ولو واژینیت کاندیدیایی می‌شوند و حدود ۱/۵ درصد زنان نیز حداقل یک بار در طول زندگی خود به این بیماری دچار می‌گردند (۱۸ و ۱۹). از آنجایی که واژینیت کاندیدیایی در میان شایع‌ترین مشکلات کلینیکی در زنان در سنین باروری تلقی می‌گردد هدف از این مطالعه نشان دادن اثرات مهاری عصاره گیاه بر روی *Candida albicans* در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. با توجه به این که اطلاعات در مورد طیف

کدورت استاندارد مخمیری و ایزوله‌های کلینیکی مخمیری که قبلاً به 10^6 CFU/ml اضافه شده بود به لوله‌ها اضافه گردید. بعد از طی انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای 30° تا 32° درجه سانتی گراد، غلظتی از لوله که هیچ رشد آشکاری نداشت به عنوان MIC تعیین گردید. این عمل در طی سه نوبت نیز تکرار شد (۸، ۱۸ و ۱۹).

نتایج

نتایج بدست آمده از مهار رشد مخمر برای هر دو عصاره گیاهی و داروی نیستاتین نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره گیاه مورد و نیستاتین بر روی نمونه‌های کلینیکی به ترتیب معادل 25 میکروگرم در میلی لیتر و $2/5$ میکروگرم در میلی لیتر و اثر عصاره و نیستاتین بر روی سویه استاندارد معادل 36 میکروگرم در میلی لیتر بوده است. نتایج آماری حاصل از تأثیر عصاره مورد بر روی قارچ ایزوله و سویه استاندارد با توجه به تعداد نمونه‌های هر آزمایش $n=45$ نشان داد که از یک توزیع نرمال برخوردار بوده و با فاصله اطمینان 95% در هر سه نوبت تکرار آزمایش، نتایج یکسانی حاصل گردید (اشکال ۱ تا ۳). نتایج حاصله از آنالیز در معرض تست غیر متغییری Wilcoxon جهت مقایسه مقادیر مناطق مهاری بر حسب میلی‌متر، بدست آمده توسط روش انتشار دیسک در آگار به وسیله نرم‌افزار آماری Minitab version 13/13 مقایسه گردید.

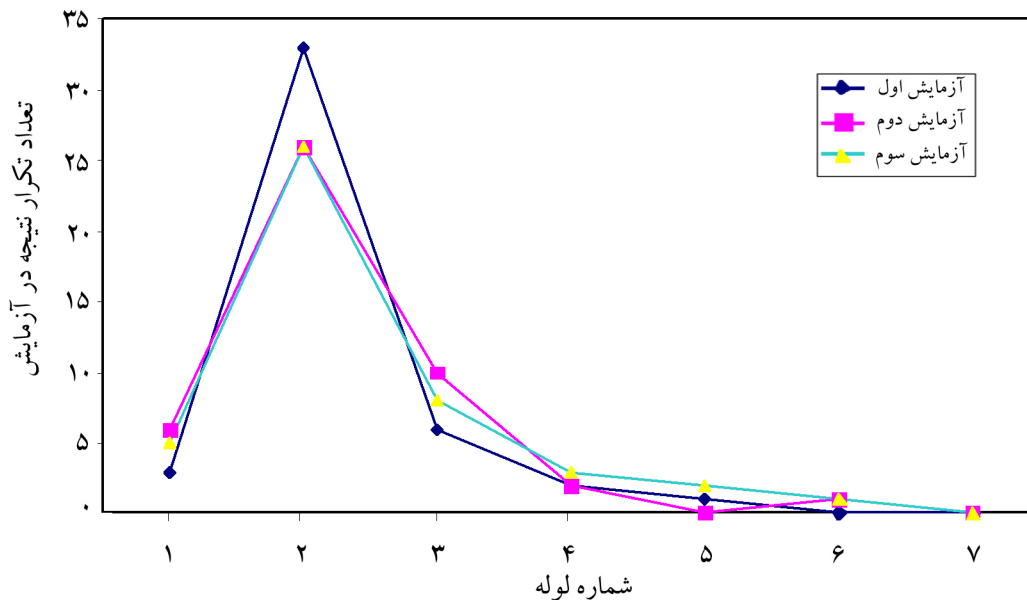
روش انجام آزمایش

تعیین فعالیت ضد میکروبی

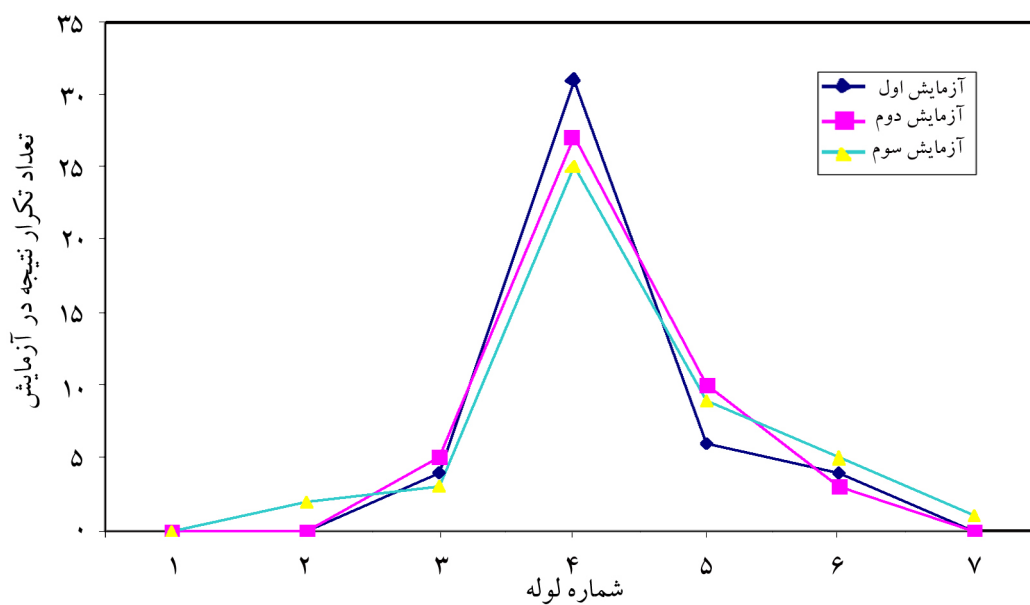
به منظور تعیین فعالیت ضد قارچی همه ایزوله‌های کلینیکی *Candida albicans* و سویه استاندارد *Candida albicans*، غلظتی معادل 10^6 CFU/ml از آن‌ها تهیه گردید و با تهیه سوسپانسیون از کشت‌های *Candida albicans* در محلول استریل سالین $0/9$ درصد، در پلیت سابورودکستروز آگار تلقیح گردید. سپس به دیسک‌های کاغذ صافی استریل به قطر 13 میلی‌متر، معادل 100 میکرولیتر از رقت‌های عصاره که در مقدار مینیمی از حلال و در غلظت‌های 50 و 100 میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شده بود، آغشته گردید و به مدت 48 ساعت در دمای 30° تا 32° درجه سانتی گراد انکوبه شد. همچنین به عنوان عامل ضد میکروبی استاندارد، از کاغذهای صافی استریل آغشته با 20 میکرولیتر از محلول نیستاتین جهت مقایسه استفاده شد و فعالیت ضد میکروبی با اندازه‌گیری منطقه مهاری اطراف هر کاغذ صافی تعیین گردید. این عمل در سه نوبت جهت سویه‌های استاندارد و مخمیری تکرار شد (۸، ۱۸ و ۱۹).

تعیین حداقل غلظت مهاری رشد (MIC)

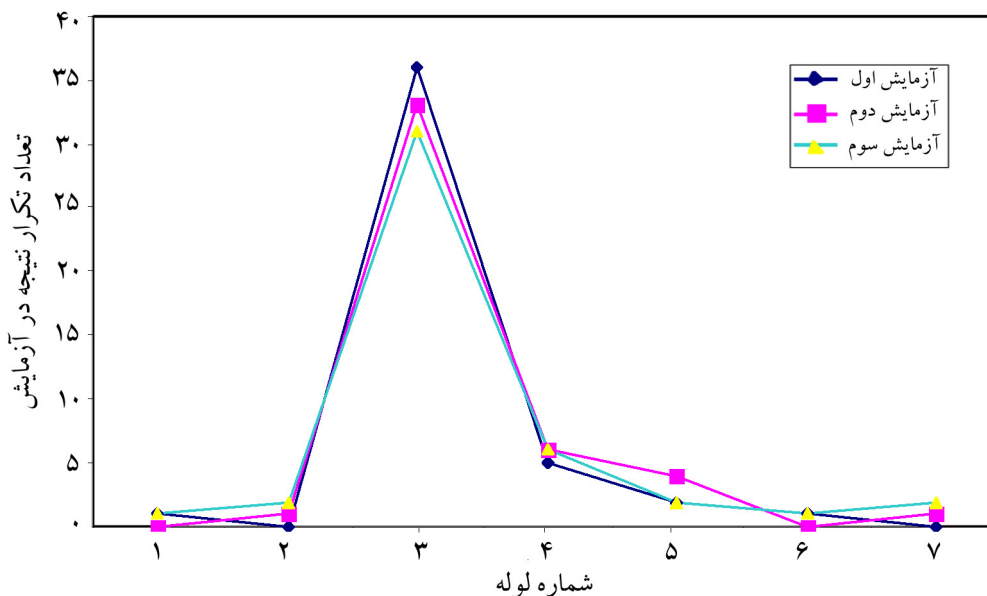
در این بررسی حداقل غلظت مهاری رشد عصاره‌ها جهت هر یک از ارگانیزم‌های تست مورد ارزیابی قرار گرفت، به این ترتیب که به $0/5$ سی سی از غلظت‌های مختلف عصاره ($0/5$ mg/ml صفر، $1/0$ ، $2/0$ ، $4/0$ ، $8/0$ ، $16/0$ ، $32/0$) دو سی سی از آبگوشت مغذی اضافه گردید و سپس یک لوپ فول از



شکل ۱: مقایسه نتایج حاصل از آزمایش تأثیر دارو بر قارچ استاندارد



شکل ۲: مقایسه نتایج حاصل از آزمایش تأثیر عصاره بر قارچ استاندارد



شکل ۳: مقایسه نتایج حاصل از آزمایش تاثیر دارو بر قارچ ایزوله

گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* اثر مهاري داشته است (۱۶). نتیجه مشابهی هم از دانه این گیاه بر روی گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* از جنس سودوموناس نشان داده شده است. علت تفاوت نتایج بدست آمده از این مطالعه در مقایسه با بررسی به عمل آمده توسط این گروه را می‌توان به روش انجام آزمایش، سویه منتخب، واریته گیاهی و عدم استفاده از سویه کلینیکی نسبت داد. نظر به اینکه هم سویه بالینی و هم سویه استاندارد از *Candida albicans* در غلظتی برابر از داروی نیستاتین دارای حساسیت مشابهی بودند و نیز به دلیل استفاده انتخابی از داروی نیستاتین سویه‌های دارای ویرولانسن و سویه استاندارد نتایج یکسانی را نسبت به دارو نشان دادند، می‌توان نتیجه گرفت که با توجه به اثر عصاره گیاه مورد بر روی

بحث

این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره گیاهی مورد دارای اثرات مهاري قابل قبولی بر روی *Candida albicans* می‌باشد. در این مطالعه علاوه بر استفاده از سویه‌های کلینیکی، در تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) از روش لوله‌ای استفاده گردید که از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد. شهیدی و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه مشابهی از عصاره گیاهی مورد که با استفاده از سویه استاندارد *Candida albicans* و بر روش انتشار دیسک در چاهک انجام دادند و در آن از غلظت نسبتاً زیاد عصاره (۲۰mg/ml) همراه با DMSO استفاده نمودند، نشان دادند که برگ‌های این گیاه با قطره‌های مهاري ۱۱ و ۱۶ میلی‌متر و با حداقل غلظت مهاري رشد ۷/۵۰ و ۱/۸۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب بر روی

ولی در $\text{pH}=6$ هیچگونه اثر مهارکننده‌ای دیده نشد. اثرات ضد کاندیدیایی این گیاه توسط مک کوی (۲۰۰۳) نیز نشان داده شد (۱۳ و ۱۱). میلر و همکاران (۲۰۰۵) اثرات مهاری این گیاه را بر روی قارچ کلادوسپوریوم نشان دادند. مارتینز و همکاران (۲۰۰۱) نیز بر روی قارچ فوزاریوم اثرات ضد مهارکنندگی این گیاه را نشان دادند و در این مطالعه قارچ پنی سیلیوم بر عصاره مقاوم بود (۱۴ و ۱۲). در مطالعه دیگری اوزکان (۲۰۰۱) اثر مهارکنندگی مخلوطی از اسانس‌های گیاهی از جمله مورد، نعنا و کومین را در غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۵ درصد بر روی میکروارگانسیم‌های سالمونلاتیفی موریوم، استافیلوکوک اورئوس، کاندیداروگوزا و گونه آسپرژیلوس نایجر نشان داد (۱۵). در این مطالعه برگ گیاه بیشترین اثر ضد قارچی را نشان داد اما از آنجایی که فراکشن‌های متنوع و نسبت‌های مختلف آن حتی در نقاط مختلف گیاه بسته به کموتایپ و شرایط آب و هوایی منطقه، متفاوت است، لزوم شناسایی و میزان اثر بخشی عصاره گیاهی هر منطقه امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. پاسخ به این سوال که آیا نتایج آزمایشگاهی حاصل از این مطالعه می‌تواند در شرایط *in vivo* نیز موفقیت‌آمیز باشد، به وضعیت سویه عامل مهاجم، شرایط میزبانی و ایمونولوژیکی آن و همچنین فارماکولوژی عصاره گیاهی بستگی دارد. لذا ضروری به نظر می‌رسد که تحقیقات بیشتری لازم است تا در آینده در زمینه بروز عوارض جانبی همچون سمیت و واکنش‌های آلرژیک و یا مقاومت میکروبی نسبت به عصاره به منظور تحقق اهداف *in vivo* صورت پذیرد.

سویه‌های کلینیکی در MIC کمتر نسبت به اثر آن بر روی سویه استاندارد، عامل حدت سویه‌های بالینی می‌تواند در این اختلاف نقش داشته باشد. مطالعات صورت گرفته توسط زامبونیلی و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که در غلظت ۱۶۰۰ ppm از اسانس ۶۰ درصد قارچ‌های فیتوپاتوزن نظیر *Colletotrichum indemuthianum* و *Fusarium solani* از بین رفته و مورفولوژی هیف تمام قارچ‌ها در این غلظت بهم خورد است (۲۲). آمیزین و همکاران (۲۰۰۷) اثرات ضد قارچی این گیاه را بر روی قارچ پاتوزن ژئوتریکوم کاندیدیوم نشان دادند (۵). در این زمینه ساختی و همکارانش (۲۰۰۷) اثرات عصاره متانولی برگ‌های این گیاه را از روی قارچ‌های دیماتیا سئوس نظیر آلترناریا مورد بررسی قراردادند (۱۷). فراتنالس و همکاران (۲۰۰۳) اثرات ضد میکروبی اسانس این گیاه را در مقابل باکتری‌های یرسینیا اینترکولیتیکا و هموفیلوس آنفلوانزا نشان دادند (۹). ویلسون و همکاران (۱۹۹۷) اثرات ضد قارچی متوسطی از عصاره گیاه مورد (*Myrtus communis*) بر روی قارچ *Botrytis cinerea* که پاتوزن گیاهی غلات و مرکبات می‌باشد نشان دادند (۲۳). شهیدی و همکاران (۲۰۰۴) اثربخشی اسانس این گیاه را بر ضد باکتری‌های *E. coli*، کلبسیلا، بوردتلا و استافیلوکوک اورئوس و قارچ‌هایی چون *Candida albicans* و *Candida utilis* نشان دادند اما بر روی مخمر ساکارومایسس سرویسه اثر چندانی نشان داده نشد (۱۶). مهدی و همکاران (۲۰۰۶) اثر ضد میکروبی اسانس گیاه مورد را بر روی تک یاخته تریکوموناس واژینالیس در $\text{pH}=4/6$ نشان دادند

- glucosidase. Iranian journal of Basic Medical sciences: 11(1):1-9
11. Mahdi, N.K.; Gang, Z.H. and Sharif, M., 2006. Alternative druges against *Trichomonas vaginalis*. East Mediterr Health J: 12(5):679-684.
 12. Martinetz, A.; Johanson, M. and Phillips, B., 1998. Antimicrobial effects of *Myrtus cmmuonis* L.essential oil on clinical isolates of *Fusarium* and *Penicilium*. Med plant: 34(6): 85-89.
 13. Mccoy, K. and Lima, J., 2003. Antimicrobial activity of *Myrtus communis* L. against *Candida albicans*. Med Hypo: 89(15): 166-171.
 14. Miller, P. and Danniell, R., 2005. Inhibitory effects of *zingiber officinalis* and *Myrtus cmmuonis* Against Dimatiaceouses. Fito: 22(8); 211-215.
 15. Ozcan, M. and Erkmer, O., 2001. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. Eur Food Res Technol: 212(6):658-660.
 16. Shahidi Bonjar, G.H.; Nik, A. and Aghighi, S., 2004. Antimicrobial and antifungal survey in plants used in indigenous herbal medicine of south east regions of Iran. journal of biological science: 13:405-410.
 17. Sacchetu, G.; Muzzoli, M.; Statti, G.A.; Conforti, F.; Bianchi, A., Agrimontic et al. 2007. Intra specific biodiversity of Italian myrtle (*Myrtus cmmuonis*) through chemical markers profile and biological activities of leaf methanlonic extracts. Nat prod Res: 21(2):167-169.
 18. Rechinger, K.H.; Flora Iranica .5 tt.ed. 2001. Verlagsanstalt Akademische Druck: pp.55-59.
 19. Ilcim, A.; Digrak, M. and et al., 1998. The investigation of antimicrobial effect of some plant extract. Journal of Biology Turkish: 22(1) pp.230-233.
 20. Tkachenko, K.G.; Kazarinova, N.V. and et al., 1999. Sanation properties of essential oils of some plant species. Rastitel'nye Resursy 35(3) pp.56-58.

منابع

۱. آئینه چی،، ۱۳۸۰. مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران. تهران، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۵ تا ۱۳.
۲. برازنده، م.م.، ۱۳۸۰. شناسایی ترکیبات روغن های اسانسی موجود در پنج گونه گیاه معطر ایران، همایش ملی گیاهان دارویی ایران، ۸۵ صفحه.
۳. شریفی فرا، ف.؛ کاظمی پور، ن و احراری، س.، ۱۳۷۹. بررسی اثرات ضد قارچی عصاره های گیاه مورد بومی شهرستان کرمان، اولین همایش بین المللی طب سنتی و مفردات پزشکی، ۶۲ صفحه.
۴. زرگری، ع.، ۱۳۷۰. گیاهان دارویی. تهران: انتشارات دانشگاه تهران صفحات ۳۰۲ تا ۳۰۶.
5. Ameziane, N.; Boubaker, H.; Boudyach, H.; Msanada, F.; Jilal, A. and Ait Benaoumar, A., 2007. Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. Agron sustain Dev: 27; 273-277.
6. Adefumbi, M.A. and Lau, B.H., 1983. Aliium sativum (garlic) - natural antibiotic. Med Hypo theses: 12(3): 227-237.
7. Adelakum, E.A.; Finbar, E.A.; Agina, S.E. and Makinde, A.A., 2001. Antimicrobial activity of *Boswellia dalzielii* stem bark Fitoterapia: 72(7): 822-824.
8. Doughar, J.H., 2006. Antimicrobial activity of *Tamarindus* in dicca linn. Tropical journal pharmaceutical Research: 5(2): 597-603.
9. Feraternals, S.; Daniel, M. and Giamper, L., 2003. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil obtained from Invitro plants of *Myrtus cmmuonis* essential oil Resear: 71(3): 309-314.
10. Gholamhoseinian, A, Fallah, H, .Sharifi-far, F, .Mirtajaddini, M, .2008. The inhibitory effect of some Iranian plants extracts on the Alpha

21. Twaij, H.A.A. and Sayed, A.H.M., 1988. Pharmacological, phytochemical and antimicrobial studies on *Myrtus communis*. Journal of Biological Sciences Research 19(1). ?.
22. Zambonelli, A.; Torta, L.; Bruni, R.; Epifano, F.; Bianchi, A. and Curini, M., 2003. Composition and Invitro antifungal activity of essential oils of *Erigeeron Canadensis* and from *Myrtus cmmuonis*. France. Chem of Natuer compun: 39(2) pp.87-89.
23. Wilson, J.; Solar, A. and Wisniewski, P., 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinera*. Agri Med: 19(6):76-78.
24. Yadegarinia, D. and et al., 2006. BioChemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L essential oils. Elsevier Journal: 67(13): 1249-1255.