فعالية خلاصات نبات الشيح الحولي المضادة لبعض الجراثيم الممرضة متعددة المقاومة

د. حسن حمادي* د. عبد العليم بلّو*

الملخص

الشيح الحولي *Artemisia annua* نبات طبي وسوري ينتمي إلى الفصيلة المركبة Asteraceae، أوصت منظمة الصحة العالمية باستخدامه كمضاد للملاريا. وفي ظل نشوء سلالات متعددة المقاومة من الجراثيم، وكذلك ندرة الأبحاث المحليّة، فقد هدف هذا البحث إلى دراسة فعالية خلاصات هذا النبات المضادة لبعض الجراثيم الممرضة متعددة المقاومة. استخدمت طريقة الانتشار من الحفر ضمن الآغار لدراسة فعالية الخلاصات المضادة للجراثيم، واستخدمت طريقة التمديد الدقيق لتحديد التركيز المثبط الأصغري، واستخدمت طريقة الانتشار القرصي لدراسة مقاومة الجراثيم للصادات الحيوية، وتمّ تشريب أقراص الصادات العيارية بالخلاصات النباتية لدراسة التأثيرات التآزرية. تراوح مردود الخلاصات النباتية بين 1.62% للخلاصة الهكسانية للأوراق، و27.64% للخلاصة المائية للأجزاء الهوائية المزهرة. كانت أكثر الجراثيم المدروسة مقاومة للصادات الحيوية هي العزلة الأولى من الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (P. a1) حيث كانت مقاومة لتسعة صادات تنتمي لسبع زمر، وأقلها

* أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية–كلية العلوم– جامعة حلب– سورية.

مقاومة العزلة الثانية من المكورات العنقودية الذهبية (S. a2) *Staphylococcus aureus* حيث كانت مقاومة لسبعة صادات تنتمي لأربع زمر. كانت الخلاصة الميثانولية الأقوى فعالية والأوسع طيفاً، حيث بلغ متوسط أقطار هالات التثبيط 12.33 و14 و10.66 و13.33 و17.66 و19.33 مم للجراثيم (E. c1) *Escherichia coli* و(E. c2) *Escherichia coli* و(P. a1) *Pseudomonas aeruginosa* و(P. a2) *Pseudomonas aeruginosa* و(S. a1) *Staphylococcus aureus* و(S. a2) *Staphylococcus aureus* على التوالي عند استخدام 75 ميكروليتر من الخلاصة الميثانولية للأوراق. تراوح التركيز المثبط الأصغري MIC بين 0.39 مغ/مل لخلاصات الهكسان للأوراق وللأجزاء الهوائية بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*. و25 مغ/مل للخلاصة المائية للأوراق بالنسبة للإشريكية القولونية *Escherichia coli* والزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa*. حدث التأزر بين بعض الصادات الحيوية وبعض الخلاصات النباتية، فمثلاً ازداد قطر هالة التثبيط الجرثومي لجراثيم *Staphylococcus aureus* (S. a2) من 12 مم عند استخدام صاد أميكاسين AK إلى 22 مم عند استخدام قرص أميكاسين المشرب بالخلاصة الميثانولية للأوراق. يمكن استخدام الخلاصة الميثانولية للشيح الحولي كمضاد للجراثيم متعددة المقاومة، وخاصة المكورات العنقودية الذهبية.

الكلمات المفتاحية: الشيح الحولي، الفعالية المضادة للجراثيم، التركيز المثبّط الأصغري، الجراثيم متعددة المقاومة، التأثيرات التآزرية.

Antibacterial Activity of *Artemisia annua* (Asteraceae) against some Multidrug Resistant Pathogenic Bacteria

Dr. Hasan Hammadi* **Dr. Abdel Aleem Bello***

Abstract

Artemisia annua is a medicinal and Syrian plant belonging to the Asteraceae, recommended by the World Health Organization (WHO) as an antimalarial agent. With the emergence of multi-drug resistant bacterial strains, as well as the scarcity of local research, this research aims to study the antibacterial activity of the extracts of this plant against some pathogenic multidrug resistant bacteria. The agar well diffusion method was used to study the antibacterial activity of extracts. Micro-dilution method was used to determine the minimal inhibitory concentration. Disk diffusion method was used to study antibacterial resistance to antibiotics. Standard antibiotic disks were infused with plant extracts to study synergistic effects. The yield of plant extracts ranged between 1.62% for leaf hexane extract and 27.64% for flowering aerial parts aqueous extract. The most resistant bacteria was the first isolate of *Pseudomonas aeruginosa* (P. a1), which was resistant to nine antibiotics belonging to seven groups, the least resistant bacteria was the second isolation of *staphylococcus aureus* (S. a2), which was resistant to seven antibiotics belonging to four groups. methanol extract was the most potent and The broader spectrum, Where the diameter of inhibition zones were 12.8, 14, 10.66, 13.33, 17.66 and 19.33 mm for *Escherichia coli* (E. c1),

* Associate Prof. at Plant Bilolgy Department Faculty of Science- University of Aleppo.

Escherichia coli (E. c2), *Pseudomonas aeruginosa* (P. a1), *Pseudomonas aeruginosa* (P. a2), *Staphylococcus aureus* (S. a1) and *Staphylococcus aureus* (S. a2), respectively, when using 75 µl of leaf methanolic extract. The minimal inhibitory concentration (MIC) ranged from 0.39 mg/ml of leaf and flowering aerial parts hexane extract for *Staphylococcus aureus*. and 25 mg/ml of leaf aqueous extract for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Synergy between some antibiotics and some plant extracts has occurred, e.g., the diameter inhibition zone for *Staphylococcus aureus* (S. a2) was increased from 12 mm when the use of amikacin (AK) to 22 mm when using the amikacin disk mixed with methanol extract. It was concluded that the methanol extract can be used as anti-multidrug resistant bacteria, especially *staphylococcus aureus*.

Keywords: *Artemisia annua*, Antibacterial activity, Minimal inhibitory concentration (MIC), Multidrug resistant bacteria, Synergistic effects.

المقدمة Introduction:

الشيح الحولي .*Artemisia annua* L هو عشب حولي كبير وقائم، يصل ارتفاعه إلى 2 م، ذو ساق مفردة عادة وفروع متبادلة. الأوراق العطرية مجزأة بشكل عميق ومنتظم، ويتراوح طولها من 2.5–5 سم. النورات الهامية صغيرة كروية قطرها من 2–4 مم، صفراء مخضرة، محاطة بعدد كبير من القنابات المتراكبة مستطيلة أو بيضاوية، تحتوي على زهيرات مركزية خنثوية وزهيرات محيطية أنثوية، وكلا النوعين من الزهيرات يمتلك تويجاً أنبوبياً ملتحم البتلات يتجزأ في أعلاه إلى 5 فصوص في الزهيرات الخنثوية ومن 2–3 فصوص في الأنثوية. الأكينات Achenes بنية مصفرة، بيضوية متطاولة، طولها من 0.6–0.8 مم، غير مزودة بعفرة. يزهر من حزيران حتى أيلول (Ferreira and Janick, 2009) و(WHO, 2006) و(Mouterde, 1983).

تعدّ آسيا، وتحديداً الصين، هي الموطن الأصلي للشيح الحولي (Bilia *et al.*, 2014). ينتشر عالمياً في إسبانيا، وجنوب فرنسا، ووسط أوروبا، وروسيا، والقرم، وفلسطين، وسورية، وإيران، وتركيا، وينتشر محلياً حول الفرات، وفي أرمناز، وحول حلب (Mouterde, 1983)، ومزروع في حديقة النباتات الطبية في كلية العلوم بجامعة حلب.

تمّ الاعتراف بفوائد الشيح الحولي *Artemisia annua* منذ ألفي سنة في الصين، ومنذ سبعينيات القرن الماضي في جميع أنحاء العالم، وبفعاليته العالية وسميته المنخفضة. يتمّ حالياً زراعة هذا النبات كمحصول هام في بعض البلدان، أوصت منظمة الصحة العالمية باستخدامه كعقار مضاد للملاريا، ويستخدم مغلي الأجزاء الهوائية في الطب التقليدي الصيني لعلاج الملاريا واليرقان والحمى وكمسكن (WHO, 2006)، كذلك سُجّل استخدامه بتناول مسحوق الأوراق الجافّة لعلاج السعال والزكام والإسهال، عُرفت كل أجزاء النبات في مرحلة الإزهار كطارد للديدان ومانع للحمّى ومطهّر ومضاد للتشنّج، وطارد للغازات ومقوّ وفاتح للشهيّة (Sadiq *et al.*, 2014). يمتلك

الشيح الحولي فعالية مضادة للجراثيم antibacterial ومضادة للالتهاب anti-inflammatory (WHO, 2006)، يعدّ النبات مصدراً فريداً للآرتيميزينين Artemisinin، وهو لاكتون سيسكوتيربين Sesquiterpene lactone، أثبتت الدراسات الحديثة أنّه فعال في قتل خلايا سرطان الثدي فضلاً عن كونه مضاداً للملاريا، وهناك بعض الأبحاث الحديثة التي تركّز على تقييم فعاليته كمضاد لفيروس نقص المناعة المكتسبة HIV (Sadiq *et al*., 2014)، وتمتلك الفلافونوئيدات الموجودة في الشيح الحولي فعالية مضادة للأكسدة، وكذلك فعالية مضادة للملاريا والسرطان عند تآزرها مع الآرتيميزينين (Ferreira *et al*., 2010).

وجد أنّ الزيت العطري (0.37% من النبات الرطب) غني بالتربينات الأحاديّة والسيسكوتربينات وأهمها كيتون آرتيميزيا Artemisia Ketone (حتى 68%) و1-8 سينيول Cineole 1-8 (حتى 51.5%) وكامفور Camphor (حتى 48%) (Donato *et al*., 2015) و (Bilia *et al*., 2014).

كذلك سجل وجود التانينات والفلافونوئيدات والغلكوزيدات القلبيّة والقلويدات والفينولات والستيروئيدات والصابونينات والراتنج في خلاصات النبات (Owuna *et al*., 2013) و (Kumar and Rathinam, 2013) و (Pawar *et al*., 2015).

دُرس الزيت العطري وأبدى فعالية مضادة للفطريات (أنواع من *Candida* و*Saccharomyces* و*Aspergillus*)، وللجراثيم موجبة الغرام (أنواع من *Enterococcus* و*Streptococcus* و*Staphylococcus* و*Bacillus* و*Listeria*) وللجراثيم سالبة الغرام (أنواع من *Escherichia* و*Shigella* و*Salmonella* و*Haemophilus* و*Klebsiella* و*Pseudomonas*) (Bilia *et al*., 2014). كما أبدى الزيت العطري فعالية قويّة ضد الجراثيم موجبة وسالبة الغرام. حيث أبدت كل الجراثيم المفحوصة حساسية تجاهه أكبر من حساسيتها لمكوناته منفردة (Donato *et al*., 2015).

أجريت دراسة هندية تمّ فيها فحص الفعاليّة المضادّة للجراثيم لخلاصتي الكلوروفورم وإيثيل أسيتات باستخدام طريقة الإنتشار من الحفر، ووجد أنّها مضادة لنمو الجراثيم المفحوصة (Kumar and Rathinam, 2013).

يعدّ الشيح الحولي آمناً حتى جرعة 30 غ من الأوراق الجافة في اليوم، وبلغت الجرعة نصف المميتة LD50 للفئران 162.5 غ/كغ من الخلاصة النباتية الخام. تمّ الاعتراف به كنبات آمن عموماً GRAS (Wall and Watson, 2017).

أهمية البحث وأهدافه Importance and Aims:

في ظلّ نشوء سلالات متعددة المقاومة من الجراثيم الممرضة، كان لا بدّ من البحث عن نباتات طبية تمتلك خصائص مثبطة أو قاتلة لهذه الجراثيم، للحدّ من انتشار ظاهرة المقاومة المتعددة Multi-Drug Resistance، لعلها تشكل في المستقبل بدائل طبيعية للصادات الحيوية، ومن أحد هذه البدائل المحتملة نبات الشيح الحولي.

لذلك هدف هذا البحث إلى ما يلي:

1- الحصول على الخلاصات الهكسانية والإيثانولية والميثانولية والمائية من أجزاء مختلفة من نبات الشيح الحولي.

2- دراسة فعالية الخلاصات المضادة لبعض للجراثيم الممرضة، متعددة المقاومة للصادات، والتابعة للمكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية والزائفة الزنجارية.

3- تحديد التركيز المثبط الأصغري لهذه الخلاصات.

4- دراسة التأثيرات التآزرية بين كل من الخلاصتين الإيثانولية والميثانولية للأوراق وصادات أميكاسين وكلورامفينيكول وسيبروفلوكساسين وفوسفومايسين وجنتاميسين.

المواد وطرائق العمل Materials and Methods:

1- المادة النباتية Plant Material: تمت زراعة النبات في حديقة النباتات الطبية في كلية العلوم بجامعة حلب منذ عام 2016، وتمّ تصنيفه بالاعتماد على الصفات المورفولوجية، وبالرجوع إلى الفلورا الجديدة لسورية ولبنان (Mouterde, 1983).

جمعت كميات من الأوراق في شهر آب 2017 وكميات من الأجزاء الهوائية المزهرة في شهر تشرين الأول 2017، ثم جففت في الظل وفي درجة حرارة المختبر، ثمّ طحنت للحصول على مسحوق ناعم.

2- تحضير الخلاصات النباتية Preparation of Plant Extracts: تمّ نقع مسحوق الأوراق والأجزاء الهوائية المزهرة في المحلات التالية: الماء والميثانول والإيثانول (70%) والهكسان لمدة ثلاثة أيام، في درجة حرارة الغرفة (Bandiola 2018) مع التحريك، وتمّ التخلص من المذيب باستخدام المبخر الدوار تحت ضغط مخفف ودرجة حرارة 45°م للحصول على الخلاصة الجافة لكل محل. تمّ حلّ الخلاصات الجافة في ثنائي ميثيل سلفوكسيد Dimethysulfoxide (DMSO) للحصول على خلاصة سائلة بتركيز 20% (وزن/حجم W/V)، حفظت في البراد بدرجة 4° م من أجل استخدامها في دراسة الفعالية المضادة للجراثيم الممرضة متعددة المقاومة.

3- الجراثيم المختبرة Tested Bacteria: تمّ الحصول على الجراثيم المستخدمة من مختبر أبحاث الأحياء الدقيقة في كلية العلوم بجامعة حلب وهي: عزلتين من الإشريكية القولونية *Escherichia coli* (E. c1, E. c2) وعزلتين من الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (P. a1, P. a2) من الجراثيم سالبة الغرام، وعزلتين من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (S. a1, S. a2) من الجراثيم موجبة الغرام.

4- حساسية الجراثيم للصادات Antimicrobial Susceptibility Testing: استخدمت طريقة الانتشار القرصي Disk Diffusion Method لدراسة تحسس ومقاومة الجراثيم المختبرة لعدد من الصادّات الحيويّة العياريّة التي تنتمي إلى زمر متعددة، بحسب (CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018 و (Nasir *et al*., 2015).

5- فعالية الخلاصات المضادة للجراثيم Antibacterial Activity of Plant Extracts:

استخدمت طريقة الانتشار من الحفر Agar Well Diffusion Method حيث تم تحضير معلقات جرثوميّة من الجراثيم المختبرة بتركيز 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/ml)، وذلك بالمقارنة مع أنابيب McFarland العيارية المحضرة مسبقاً، وتم تلقيح وسط مولر هينتون الصلب Mueller-Hinton Agar بالجراثيم باستخدام ماسحة قطنية عقيمة، تم عمل أربع حويضات بقطر 6 مم في كل طبق. أضيفت جرعات متزايدة 25 و50 و75 ميكروليتر (µl) من الخلاصات 20% (وزن/حجم W/V) في كل حويضة باستخدام ماصّة دقيقة Micropipette ذات رؤوس عقيمة، أما الحفرة الرابعة فقد وضع فيها أحجام مختلفة 25 و50 و75 ميكروليتر من الشاهد السلبي وهو DMSO، أو لم تعمل الحفرة الرابعة ووضع في مكانها الشاهد الإيجابي وهو قرص صاد عياري. بعد الانتشار الأولي بالبراد، حضنت الأطباق في درجة حرارة 37º م لمدة 24 ساعة، حُدّدت بعد ذلك فعاليّة الخلاصات المضادة للجراثيم بقياس قطر هالة التثبيط Zone of Inhibition المتشكلة حول الحفر مقدرة بـ مم، تمّ عمل ثلاثة مكررات لكل معاملة (Balouiri *et al*., 2016) و(Nasir *et al*., 2015) و (Pawar *et al*., 2015) و(Owuna *et al*., 2013) و(Das *et al*., 2010).

6- التركيز المثبط الأصغري Minimal Inhibitory Concentration (MIC):

استخدمت طريقة التمديد الدقيق Micro-dilution Method ضمن صفائح المعايرة الدقيقة Microtitration plates الحاوية على 96 حفرة، حيث أضيف 50 ميكروليتر من الخلاصة النباتية وتم تمديدها بالمرق المغذي Nutrient Broth للحصول على تراكيز متدرجة متناقصة من الخلاصة، وأضيف 50 ميكروليتر من المعلّق الجرثومي لكل حفرة، تم عمل مكررين لكل خلاصة، ثم حضّنت الصفائح في درجة حرارة 37º م لمدة 24 ساعة، أضيف 20 ميكروليتر من محلول Tetrazolium Violet كمؤشر للنمو، تقرأ النتائج عيانيّاً بمراقبة تغيّر اللون من الأصفر إلى الأحمر والذي يعدّ دليلاً

على النمو الجرثومي، حيث يعمل ملح التترازوليوم Tetrazolium عديم اللون كمستقبل الكتروني يستقبل الالكترونات الناتجة عن النشاط الحيوي للجراثيم الحيّة متحوّلاً بذلك إلى الفورمازون Formazon ذي اللون الأحمر البنفسجي، وتم تحديد MIC كأقلّ تركيز للخلاصة النباتيّة لم يظهر عنده اللون الأحمر (Balouiri *et al.*, 2016) و(Nasir *et al*., 2015) و(Das *et al*., 2010) و(CLSI, 2012).

7- التأثيرات التآزرية Synergistic Effects (SE) بين الخلاصات النباتية والصادات:

تمّ تلقيح وسط مولر هينتون الصلب بالجراثيم المختبرة، ووضعت أقراص الصادات المراد دراستها على سطح الآغار الملقح بمعدل قرصين لكل صاد، تمّ تشريب أحد القرصين بـ 25 ميكروليتر من الخلاصة النباتية بتركيز 20% ببطء وحذر، وحضنت الأطباق لمدة 24 ساعة، ومن ثم قيست أقطار هالات التثبيط الجرثومية الناتجة ومقارنة قيم هذه الأقطار مع الأقطار الناتجة عن الصادات لوحدها لمعرفة حدوث التآزر من عدم حدوثه (Jouda *et al*., 2016) و(Moussaoui and Alaoui, 2016) و(Elmanama *et al*., 2011).

8- الدراسة الإحصائية Statistical analysis:

تمّ حساب المتوسطات الحسابية، والانحراف المعياري SD باستخدام برنامج Excel Microsoft 2010.

النتائج والمناقشة Results and Discussion:

1- مردود الخلاصات النباتية Yields of Plant Extracts:

بينت النتائج أنّ أعلى مردود لخلاصات النبات كان للخلاصة المائية للأجزاء الهوائية حيث بلغ 27.64%، وأقل مردود كان للخلاصة الهكسانية للأوراق حيث بلغ 1.62%، ويبين الجدول رقم (1) مردود الخلاصات المختلفة للنبات وألوانها وقوامها.

الجدول (1) مردود الخلاصات النباتية للشيح الحولي *Artemisia annua*

الجزء النباتي	الخلاصة	المردود (%)	لون الخلاصة	قوامها
أوراق	LH	1.62	أخضر مصفر	زيتي
	LE	16.37	أخضر غامق	لزج
	LM	13.25	أخضر مسود	لزج
	LW	16.79	بني	صلب
أجزاء هوائية مزهرة	AH	2.21	أخضر مصفر	زيتي
	AE	19.18	أخضر غامق	لزج
	AM	12.49	أخضر مسود	لزج
	AW	27.64	بني	صلب

LH: خلاصة هكسانية للأوراق، LE: خلاصة إيثانولية للأوراق، LM: خلاصة ميثانولية للأوراق، LW: خلاصة مائية للأوراق، AH: خلاصة هكسانية للأجزاء الهوائية المزهرة، AE: خلاصة إيثانولية للأجزاء الهوائية المزهرة، AM: خلاصة ميثانولية للأجزاء الهوائية المزهرة، AW: خلاصة مائية للأجزاء الهوائية المزهرة.

وبشكل عام ازداد مردود الخلاصة مع زيادة قطبية المذيب المستخدم في الاستخلاص، أما زيادة مردود الخلاصة الإيثانولية عن مردود الخلاصة الميثانولية فيفسّر باستخدام الإيثانول المائي بنسبة 70%، وربما يعزى ذلك إلى الأوزان الجزيئية المرتفعة للمواد التي تستخلصها المحلات مرتفعة القطبية مثل الفينولات والقلويدات وهذا يتوافق مع (Bandiola, 2018) و (Tiwari *et al*., 2011).

2- تحسّس ومقاومة الجراثيم المختبرة للصادات الحيوية Susceptibility and Resistance:

درست حساسية ومقاومة الجراثيم المدروسة للصادات الحيوية، حيث كانت الإشريكية القولونية *Escherichia coli* أكثر تحسساً لصاد ميروبينيم MEM وبلغ متوسط قطر هالة التثبيط 33.66 مم للعزلة E. c2، وكانت جراثيم الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* أكثر تحسساً لصاد سيبروفلوكساسين CPR حيث بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 28.33 مم للعزلة P. a2، أما جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* فكانت أكثر تحسساً

لصاد فوسفوميسين FOS حيث بلغ متوسط قطر هالة التثبيط 33.66 مم للعزلة S. a2، كما هو مبين في الجدول رقم (2).

الجدول (2) متوسط أقطار هالات التثبيط للجراثيم المختبرة تجاه الصادات الحيوية

متوسط أقطار هالات التثبيط (مم)±ا لانحراف المعياري						الصاد الحيوي وتركيزه (µg)	الزمرة
S. a2	S. a1	P. a2	P. a1	E. c2	E. c1		
0.00±12	0.75±13.66	0.57±20.66	-	0.57±20.66	0.57±17.33	AK (30)	Aminoglycosides
0.00±20	1.52±17.66	0.57±20.33	-	1.15±20.33	0.00±16	GEN (10)	
0.00±30	N	N	N	-	-	NIT (30)	
N	N	0.75±25.33	-	0.00±21	0.75±19.33	TOB (10)	
N	N	1.00±27	1.15±10.66	-	-	IMP (10)	Carbapenems
N	N	0.00±23	0.00±11	3.21±33.66	0.57±30.33	MEM (10)	
-	N	-	-	0.00±15	0.00±17	CAZ (30)	Cephems (Cephalosporins)
0.00±13	1.00±8	N	N	N	N	CDR (30)	
N	N	0.00±10	-	0.00±22	0.00±23	CPM (30)	
0.00±13	0.00±11	N	N	N	N	CTR (30)	
0.00±19	0.00±10	N	N	N	N	CXM (5)	
0.00±19	1.00±26	–	-	0.57±22.66	0.57±18.33	C (30)	Chloramphenicols
0.57±23.33	1.00±26	1.15±28.33	-	0.57±23.66	0.00±21	CPR (5)	Floroquinolons
N	N	1.15±23.66	-	0.00±21	0.00±22	LEV (5)	
0.00±17	0.00±21	N	N	N	N	VA (30)	Glycopeptides
0.00±21	1.15±17.33	N	N	N	N	AZM (15)	Macrolides
0.00±22	-	N	N	-	-	CLR (15)	
0.00±13	1.00±8	N	N	N	N	AMX (25)	Penicillins
0.00±15	1.15±18.33	N	N	N	N	AUG (30)	
2.82±18	0.57±16.33	N	N	N	N	MET (5)	
1.15±33.66	0.00±33	0.00±11	1.00±9	0.57±26.33	0.57±23.33	FOS (200)	Phosphonic acids
N	N	1.15±12.33	0.00±10	0.00±11	0.00±11	COL (10)	Polymyxins
0.00±13	N	N	N	N	-	FUS (10)	Steroidal
0.00±27	-	-	-	-	-	COT (25)	Sulfanamides
0.00±28	1.52±23.33	N	N	N	N	TET (30)	Tetracyclines

E. c: *Escherichia coli*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, S. a: *Staphylococcus aureus*.

AK: أميكاسين، AMX: أموكسيسيللين، AUG: أوغمنتين، AZM: أزيثروميسين، C: كلورامفينيكول، CAZ: سيفتازيديم، CDR: سيفادروكسيل، COL (CT): كوليستين، COT: كوتريموكسازول، CPM: سيفيبيم، CPR: سيبروفلوكساسين، CTR: سيفترياكسون، CXM: سيفيكسيم، FOS: فوسفومايسين، FUS: فيوزيديك أسيد، GEN: جنتاميسين، IMP: إميبينيم، LEV: ليفوفلوكساسين، MEM: ميروبينيم، MET: ميثيسللين، TET: تتراسيكلين، TOB: توبراميسين، VA: فانكومايسين، NIT: نيتليميسين، CLR: كلاريثروميسين.

– عدم وجود منطقة تثبيط جرثومي، N: لم يفحص الصاد.

كانت أكثر العزلات الجرثومية مقاومة هي العزلة الأولى من الزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* (P. a1) حيث كانت مقاومة لتسعة صادات عيارية تنتمي لسبع زمر مختلفة، تلتها العزلة الأولى من الإشريكية القولونية *Escherichia coli* (E. c1) التي كانت مقاومة لسبعة صادات تنتمي إلى سبع زمر، ثم العزلة الأولى من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (S. a1) التي كانت مقاومة لثمانية صادات تنتمي إلى خمس زمر، وأقلها مقاومة العزلة الثانية من المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* (S. a2) حيث كانت مقاومة لسبعة صادات تنتمي لأربع زمر مختلفة، كما هو مبين في الجدول رقم (3).

الجدول (3) تحسّس ومقاومة الجراثيم المختبرة للصادات المفحوصة بالاعتماد على (CLSI, 2018)

S. a2	S. a1	P. a2	P. a1	E. c2	E. c1	الصاد الحيوي وتركيزه (µg)	الزمرة
R	R	S	R	S	S	AK (30)	Aminoglycosides
S	S	S	R	S	S	GEN (10)	
S	N	N	N	R	R	NIT (30)	
N	N	S	R	S	S	TOB (10)	
N	N	S	R	R	R	IMP (10)	Carbapenems
N	N	S	R	S	S	MEM (10)	
R	N	R	R	R	R	CAZ (30)	Cephems (Cephalosporins)
R	R	N	N	N	N	CDR (30)	
N	N	R	R	SDD	SDD	CPM (30)	
R	R	N	N	N	N	CTR (30)	
S	R	N	N	N	N	CXM (5)	
S	S	R	R	S	S	C (30)	Chloramphenicols
S	S	S	R	S	S	CPR (5)	Floroquinolons
N	N	S	R	S	S	LEV (5)	
S	S	N	N	N	N	VA (30)	Glycopeptides
S	I	N	N	N	N	AZM (15)	Macrolides
S	R	N	N	R	R	CLR (15)	
R	R	N	N	N	N	AMX (25)	Penicillins
R	R	N	N	N	N	AUG (30)	
S	S	N	N	N	N	MET (5)	
S	S	R	R	S	S	FOS (200)	Phosphonic acids
N	N	S	R	S	R	COL (10)	Polymyxins
R	N	N	N	N	R	FUS (10)	Steroid
S	R	R	R	R	R	COT (25)	Sulfanamides
S	S	N	N	N	N	TET (30)	Tetracyclines
19	16	13	13	15	16	عدد الصادات المختبرة على الجراثيم	
7	8	5	9	5	7	عدد الصادات التي قاومتها الجراثيم	
4	5	5	7	5	7	عدد الزمر التي قاومتها الجراثيم	

E. c: *Escherichia coli*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, S. a: *Staphylococcus aureus*.

AK: أميكاسين، AMX: أموكسيسيللين، AUG: أوغمنتين، AZM: أزيثروميسين، C: كلورامفينيكول، CAZ: سيفتازيديم، CDR: سيفادروكسيل، COL (CT): كوليستين، COT: كوتريموكسازول، CPM: سيفيبيم، CPR: سيبروفلوكساسين، CTR: سيفترياكسون، CXM: سيفيكسيم، FOS: فوسفومايسين، FUS: فيوزيديك

أسيد، GEN: جنتاميسين، IMP: إميبينيم، LEV: ليفوفلوكساسين، MEM: ميروبينيم، MET: ميثيسللين، TET: تتراسيكلين، TOB: توبراميسين، VA: فانكومايسين، NIT: نيتليميسين، CLR: كلاريثروميسين.

R: مقاوم، I: متوسط الحساسية، S: حساس، SDD: حساس بالاعتماد على الجرعة، N: لم يفحص الصاد.

ويمكن أن يعزى اختلاف مقاومة العزلات للصادات إلى اختلاف النمط الوراثي للعزلة، واختلاف العينات المرضية التي عزلت منها.

3- فعالية الخلاصات النباتية Antibacterial Activity of Plant Extracts:

أعطت الخلاصة الميثانولية للأوراق والخلاصة الميثانولية للأجزاء الهوائية أقوى فعالية مضادة للجراثيم وأوسع طيف، حيث بلغت أقطار هالة التثبيط 12.33 و14 و10.66 و13.33 و17.66 و19.33 مم للجراثيم (E. c1) *Escherichia coli* و (E. c2) *Escherichia coli* و (P. a1) *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas aeruginosa* (P. a2) و (S. a1) *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus aureus* (S. a2) على التوالي عند استخدام 75 ميكروليتر من الخلاصة الميثانولية للأوراق، أما الخلاصة الهكسانية للأوراق والخلاصة الهكسانية للأجزاء الهوائية فكانت فعالة فقط على المكورات العنقودية الذهبية، ووصل متوسط قطر هالة التثبيط إلى 19 و18 مم على (S. a1) *Staphylococcus aureus* و (S. a2) *Staphylococcus aureus* على الترتيب عند استخدام 75 ميكرولتر من الخلاصة الهكسانية للأوراق، كما هو مبين في الجدول رقم (4) والشكل رقم (1) والشكل رقم (2).

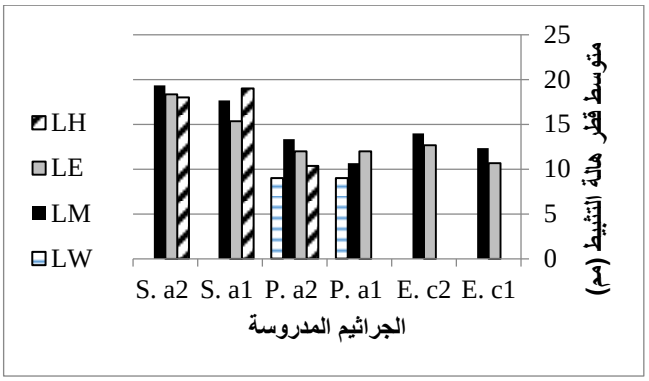
الجدول (4) الفعالية المضادة للجراثيم متعددة المقاومة لخلاصات نبات الشيح الحولي *Artemisia annua*

متوسط أقطار هالات التثبيط (مم)±الإنحراف المعياري							
S. a2	S. a1	P. a2	P. a1	E. c2	E. c1	الجرعة (µl)	الخلاصة
1.15±14.33	0.00±15	–	–	–	–	25	LH
0.00±17	0.00±18	–	–	–	–	50	
0.00±18	0.00±19	0.57±10.33	–	–	–	75	
1.00±11	1.15±10.66	–	–	–	–	25	LE
1.15±15.66	2.08±12.66	0.57±10.33	0.00±11	1.15±9.66	–	50	
0.57±18.33	2.30±15.33	0.00±12	0.00±12	0.57±12.66	1.15±10.66	75	
2.08±12.33	1.00±11	–	–	–	–	25	LM
1.73±17	0.00±14	0.00±10	0.57±9.66	2.51±9.66	1.00±11	50	
1.15±19.33	1.52±17.66	1.52±13.33	0.57±10.66	1.00 ±14	0.57±12.33	75	
–	–	–	–	–	–	25	LW
–	–	–	–	–	–	50	
–	–	0.00±9	0.00±9	–	–	75	
0.00±13	1.15±11.66	–	–	–	–	25	AH
0.57±15.66	0.57±13.66	–	–	–	–	50	
0.57±16.66	0.57±15.33	–	–	–	0.00±7	75	
2.64±12	2.30±11.33	–	–	–	–	25	AE
3.05±14.66	1.15±12.66	0.00±11	0.00±10	–	–	50	
3.51±16.33	1.52±13.66	0.00±12	0.00±11	–	0.57±9.33	75	
0.57±12.33	0.00±12	0.00±7	–	–	–	25	AM
1.52±15.33	2.88±16.66	0.57±10.66	0.00±9	1.15±10.66	0.57±10.33	50	
1.73±18	2.88±18.66	0.00±12	0.00±10	0.57±15.33	0.00±13	75	
–	–	–	–	–	–	25	AW
–	–	–	–	–	–	50	
1.00±10	–	–	–	–	0.00±7	75	
–	–	–	–	–	–	25	DMSO
–	–	–	–	–	–	50	
–	–	–	–	–	–	75	

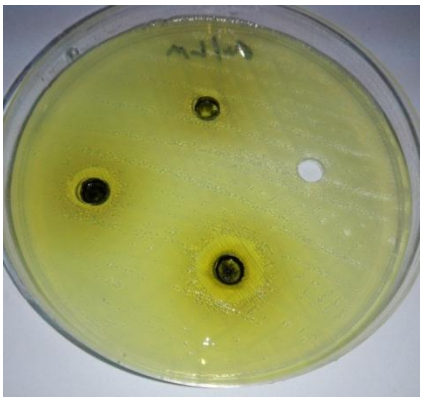
E. c: *Escherichia coli*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, S. a: *Staphylococcus aureus.*

LH: خلاصة هكسانية للأوراق، LE: خلاصة إيثانولية للأوراق، LM: خلاصة ميثانولية للأوراق، LW: خلاصة مائية للأوراق، AH: خلاصة هكسانية للأجزاء الهوائية المزهرة، AE: خلاصة إيثانولية للأجزاء الهوائية المزهرة، AM: خلاصة ميثانولية للأجزاء الهوائية المزهرة، AW: خلاصة مائية للأجزاء الهوائية المزهرة.

DMSO: ثنائي ميثيل سلفوكسيد. – عدم وجود منطقة تثبيط جرثومي.



الشكل (1) متوسط أقطار هالات التثبيط للجراثيم المختبرة عند استخدام خلاصات الأوراق (75 µl)



أ– فعالية الخلاصة الميثانولية للأوراق على العزلة P. a2

ب– فعالية الخلاصة الهكسانية للأوراق على العزلةS. a2

الشكل (2) فعالية الخلاصات النباتية المضادة للجراثيم

وبالمقارنة مع الأبحاث العالمية في هذا المجال فقد وجد (Kumar and Rathinam, 2013) أن قطر هالة التثبيط للخلاصة الكلوروفورمية 30 مم على المكورات العنقودية الذهبية و35 مم على الاشريكية القولونية، أما بالنسبة لخلاصة خلات الإيثيل فقد بلغ 22 و24 مم على التوالي، وتفوقت الخلاصة الكلوروفورمية على Levofloxacin. ويعزى اختلاف الفعالية لاختلاف الخلاصات المفحوصة، واختلاف العزلات الجرثومية المختبرة حيث استخدمت في الدراسة الحالية جراثيم متعددة المقاومة.

كما درس (Jhansi Rani *et al*., 2015) الفعالية المضادة للجراثيم والمضادة للفطريات للشيح الحولي في مرحلتي ما قبل وما بعد الإزهار، فحصت فعالية خلاصات الإيثانول والميثانول والهكسان بتركيز 20 مغ/مل، ضد ثلاثة جراثيم الكليبسيلة الرئوية *Klebsiella pneumoniae* والشيجيلة الزحارية *Shigella dysenteriae* والمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus areus* أشارت النتائج إلى فعالية أقوى للنبات في مرحلة الإزهار، بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية أعطت الخلاصة الإيثانولية الفعالية الأقوى ووصل قطر هالة التثبيط إلى 23.5 مم. وهذا يختلف إلى حدّ ما مع الدراسة الحالية حيث تفوقت الخلاصة الميثانولية بسبب اختلاف المحلّ وبالتالي اختلاف نوعية المواد الفعالة التي يستخلصها، وتقاربت فعالية الأوراق مع فعالية الأجزاء الهوائية المزهرة.

استخدم (Pawar *et al*., 2015) طريقة الانتشار من الحفر، واستخدم Erythromycin كشاهد إيجابي وDMSO كشاهد سلبي وأظهرت الخلاصة الميثانولية للشيح الحولي بتركيز 75 ملغ/5 مل من DMSO فعالية قوية مضادة للجراثيم، حيث بلغ قطر هالة التثبيط 16 مم للكليبسيلة الرئوية و17 مم للمكورات العنقودية الذهبية وتقاربت مع فعالية Erythromycin حيث وصلت إلى 19 مم.

درس (Owuna *et al*., 2013) فعالية الخلاصة الإيثانولية للشيح الحولي المضادة لستة أنواع من الأحياء الدقيقة بطريقة الانتشار من الحفر، تراوح قطر هالة التثبيط

من 16–28.5 مم عند التركيز 500 مغ/مل (22 مم للإشريكية القولونية، و20 مم للزائفة الزنجارية و21 مم للمكورات العنقودية الذهبية)، ومن 12.5–24 مم عند التركيز 250 مغ/مل (18 مم للإشريكية القولونية و18.5 مم للزائفة الزنجارية و20 مم للمكورات العنقودية الذهبية)، ومن 10–22 مم عند التركيز 125 مغ/مل (16 مم لكل من الإشريكية القولونية والمكورات العنقودية الذهبية و20 مم للزائفة الزنجارية)، بالمقارنة مع قطر من 20–40.5 مم عند استخدام 4 مغ/مل من جنتاميسين. ويلاحظ هنا استخدام تركيز مرتفع من الخلاصة 500 مغ/مل أي (50%) وهو أكبر بكثير من التركيز المستخدم في الدراسة الحالية (20%).

وفي دراسة إيرانية (Tajehmiri *et al*., 2014) أبدت الخلاصتين الميثانولية والإيثانولية للأوراق فعالية مضادة لخمسة أنواع جرثومية باستخدام طريقة الانتشار من الحفر، أعطت الخلاصة الإيثانولية للأوراق أقطار منطقة تثبيط 15، 12 ،13، 13.5، 13 مم وأعطت الخلاصة الميثانولية أقطار 16.5 ، 11.5، 13، 15.5، 12.5 مم على المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية والكليبسيلة الرئوية والسلمونيلة والشيجيلة الزحارية على التوالي.

4- التركيز المثبط الأصغري Minimal Inhibitory Concentration (MIC):

تراوح التركيز المثبط الأصغري MIC بين 1.56 مغ/مل للخلاصة الهكسانية للأوراق و25 مغ/مل للخلاصة المائية للأوراق وللأجزاء الهوائية بالنسبة للإشريكية القولونية *Escherichia coli*، وتراوح التركيز المثبط الأصغري MIC بين 0.78 مغ/مل لخلاصات الهكسان للأوراق والهكسان والميثانول للأجزاء الهوائية و25 مغ/مل للخلاصة المائية للأوراق بالنسبة للزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* ، وتراوح التركيز المثبط الأصغري MIC بين 0.39 مغ/مل لخلاصات الهكسان للأوراق وللأجزاء الهوائية والإيثانول والميثانول للأوراق و12.5 مغ/مل للخلاصة

المائية للأوراق وللأجزاء الهوائية بالنسبة للمكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، كما هو مبين في الجدول رقم (5).

الجدول (5) التركيز المثبط الأصغري MIC للخلاصات النباتية على الجراثيم المفحوصة مقدراً بـ مغ/مل

S. a2	S. a1	P. a2	P. a1	E. c2	E. c1	الخلاصة
0.39	0.39	3.12	0.78	3.12	1.56	LH
1.56	0.39	3.12	1.56	3.12	3.12	LE
0.39	0.78	6.25	1.56	6.25	6.25	LM
12.5	12.5	25	25	12.5	25	LW
0.39	0.78	6.25	0.78	12.5	3.12	AH
3.12	1.56	6.25	1.56	12.5	6.25	AE
0.78	3.12	6.25	0.78	12.5	3.12	AM
12.5	12.5	12.5	6.25	12.5	25	AW

E. c: *Escherichia coli*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, S. a: *Staphylococcus aureus*.

LH: خلاصة هكسانية للأوراق، LE: خلاصة إيثانولية للأوراق، LM: خلاصة ميثانولية للأوراق، LW: خلاصة مائية للأوراق، AH: خلاصة هكسانية للأجزاء الهوائية، AE: خلاصة إيثانولية للأجزاء الهوائية، AM: خلاصة ميثانولية للأجزاء الهوائية، AW: خلاصة مائية للأجزاء الهوائية.

وبالمقارنة مع الدراسة النيجيرية (Owuna *et al*., 2013) حيث بلغ التركيز المثبط الأصغري MIC 125 مغ/مل على كل الأحياء الدقيقة المفحوصة، فإن القيم التي تمّ الحصول عليها في الدراسة الحالية هي أفضل بكثير وتراوحت بين 0.39 و25 مغ/مل، ويمكن أن يفسّر ذلك باختلاف حساسية العزلات الجرثومية واختلاف بيئة النبات.

5- التأثيرات التآزرية Synergestic Effects:

حدث التآزر بين بعض الصادات الحيوية وبعض الخلاصات النباتية، فمثلاً ازداد قطر هالة التثبيط الجرثومي لجراثيم *Staphylococcus aureus* (S. a2) من 12 مم

عند استخدام صاد أميكاسين AK إلى 22 مم عند استخدام قرص أميكاسين المشرب بالخلاصة الميثانولية للأوراق، وازداد قطر هالة التثبيط الجرثومي لجراثيم *Escherichia coli* (E. c1) من 23 مم عند استخدام صاد فوسفومايسين FOS إلى 28 مم عند استخدام قرص فوسفومايسين المشرب بالخلاصة الميثانولية للأوراق، بينما حدث التضاد بين بعض الصادات وبعض الخلاصات، فمثلاً انخفض قطر هالة التثبيط الجرثومي لجراثيم *Escherichia coli* (E. c2) من 23 مم عند استخدام صاد كلورامفينيكول C إلى 17 مم عند استخدام قرص كلورامفينيكول المشرب بالخلاصة الميثانولية للأوراق، الجدول رقم (6) والشكل رقم (3).

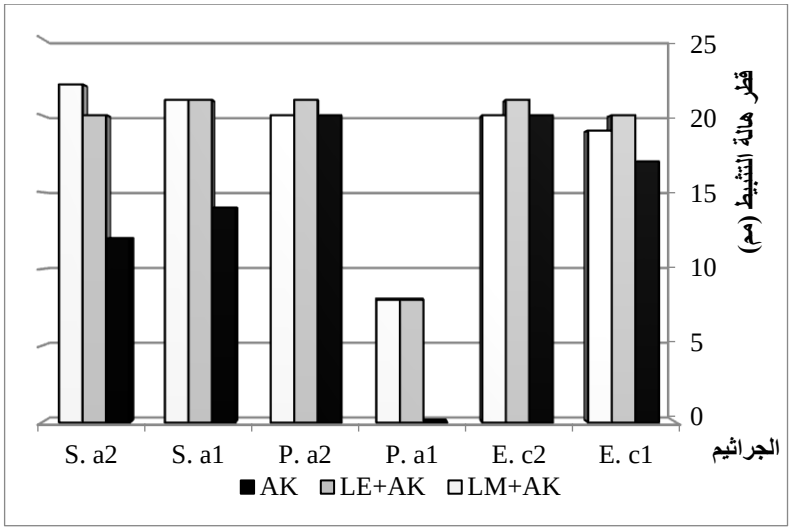
الجدول (6) التآزر بين بعض الخلاصات النباتية وبعض الصادات الحيوية

S. a2	S. a1	P. a2	P. a1	E. c2	E. c1	الصاد الحيوي/الصاد+الخلاصة
12	14	20	-	20	17	AK
20	21	21	8	21	20	AK+LE
22	21	20	8	20	19	AK+LM
19	26	10	-	23	19	C
24	26	9	8	18	18	C+LE
25	26	8	8	17	19	C+LM
23	26	29	–	24	21	CPR
26	27	29	–	22	20	CPR+LE
26	27	28	–	22	20	CPR+LM
34	33	11	9	26	23	FOS
34	33	9	-	27	26	FOS+LE
35	34	8	-	28	28	FOS+LM
20	17	20	-	20	16	GEN
22	21	19	9	20	18	GEN+LE
25	21	20	8	21	18	GEN+LM

E. c: *Escherichia coli*, P. a: *Pseudomonas aeruginosa*, S. a: *Staphylococcus aureus*.

AK: أميكاسين، C: كلورامفينيكول، CPR: سيبروفلوكساسين، FOS: فوسفومايسين، GEN: جنتاميسين.

LE: خلاصة إيثانولية للأوراق، LM : خلاصة ميثانولية للأوراق، -: لا يوجد هالة تثبيط.



الشكل (3) تآزر صاد أميكاسين AK مع الخلاصتين الإيثانولية والميثانولية للأوراق

ويلاحظ أن التأثيرات التآزرية بين الصادات والخلاصات النباتية قد حدثت بصور مختلفة، إما على شكل تآزر Synergy أو تضاد Antagonism أو حياد Indifferent، وإن طبيعة هذه التأثيرات تتعلق بالصاد الحيوي والزمرة التي ينتمي إليها، وبنوع الخلاصة النباتية وما تحتويه من مكونات فعالة، وبالعزلة الجرثومية المختبرة ومدى مقاومتها.

الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations:

1- أعطت الخلاصة الميثانولية للأوراق والأجزاء الهوائية أقوى فعالية مضادة للجراثيم متعددة المقاومة المختبرة مع أوسع طيف.

2- ينصح باستخدام الخلاصة الميثانولية كمضاد لبعض الجراثيم الممرضة متعددة المقاومة، وخاصة المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus*، لوحدها أو بشكل تآزري مع بعض الصادات الحيوية.

3- يوصى بدراسة تأثير خلاصات الشيح الحولي على أنواع جرثوميّة أخرى ممرضة ومقاومة للصادّات الحيويّة.

4- عزل المكوّنات الفعّالة من الشيح الحولي وتنقيتها ودراسة فعاليتها المضادة للجراثيم.

5- الاستمرار في دراسة الفعاليّة المضادّة للجراثيم لنباتات أخرى من الفلورا السوريّة.

المراجع References:

1. Balouiri M., Sadiki M. and Koraichi Ibnsouda S., (2016)- Methods for in vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
2. Bandiola T. M. B., (2018)- Extraction and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants: A Brief Summary. *Int. J. Pharm*, 8(1): 137-143.
3. Bilia A. R., Santomauro F., Sacco C., Bergonzi M. C., and Donato R. (2014)- Essential Oil of *Artemisia annua* L.: An Extraordinary Component with Numerous Antimicrobial Properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Hindawi Publishing Corporation, Volume 2014, Article ID 159819, 7 pages.
4. CLSI 2012- Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically;Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 68 pages.
5. CLSI 2018- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 258 pages.
6. Das K., Tiwari R. K. S. and Shrivastava D. K. 2010- Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 104-111.
7. Donato R., Santomauro F., A. Bilia R., Flamini G., Sacco C. (2015)- Antibacterial activity of Tuscan *Artemisia annua* essential oil and its major components against some foodborne pathogens. LWT - *Food Science and Technology*, Volume 64, Issue 2, pp.: 1251-1254.
8. Elmanama A. A., Alyazji A. A. and Abu Gheneima N. A., (2011)- Antibacterial, Antifungal and Synergistic Effect of *Lawsonia inermis*, *Punica granatum* and *Hibiscus sabdariffa*. *Annals of Alquds Medicine*, Volume/Issue 7:33-41.
9. Ferreira J. & Janick J. (2009)- Annual Wormwood (*Artemisia annua* L.). New Crop Fact SHEET, Copyright ©, www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/artemisia.pdf

10. Ferreira, Jorge F. S.; Luthria, Devanand L.; Sasaki, Tomikazu; Heyerick, Arne (2010)- Flavonoids from *Artemisia annua* L. as Antioxidants and Their Potential Synergism with Artemisinin against Malaria and Cancer. *Molecules*. 15 (5): 3135–3170.
11. Jhansi Rani, S., Supraja, P., Sujitha, A., Kiranmayee, P. and Usha, R. m., (2015)- Evaluation of Antibacterial and Antifungal Activity of *Artemisia Annua* During Pre and Post Flowering Stages. *International Journal of Current Research*, Vol. 7, Issue, 10, pp.21581-21587.
12. Jouda M. M., Elbashiti T., Masad A. and Albayoumi M., (2016)- The Antibacterial Effect of some Medicinal Plant Extracts and their Synergistic Effect with Antibiotics. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Volume 5, Issue 2, 23-33.
13. Kumar A. R. and Rathinam KM. S. (2013)- Antibacterial Activity of Extracts of *Artemesia annua*. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* (IJRPC), 3(2) pp. 376-377.
14. Moussaoui F. and Alaoui T., (2016)- Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pac J Trop Biomed*; 6(1): 32–37.
15. Mouterde, P. (1983)- Nouvelle flora du Liban et de la Syrie. Tome 3. Texte & Atlas. Dar el-Machreq SARL, Beyrouth, 578 pages.
16. Nasir B., Fatima H., Ahmed M. and Haq I. U., (2015)- Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol*.;1(1): 1002.
17. Owuna G, Mustapha AA, Ogbonna CIC, Kaladi, PH (2013)- Antimicrobial effects and Phytoconstituents of ethanolic extract of leaves of *Artemisia annua* L.. *Journal of Medicinal Plants Studies*, Vol. 1 Issue. 5, pp.: 97-101.
18. Pawar S. B, Nirgude M. S. and H. S. Shinde (2015)- Antimicrobial Investigation of *Artemisia annua* Leaf Extract against Human Pathogenic Microorganisms. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, Volume 3, Issue 6, 2319-1473.
19. Sadiq A., Hayat M.Q., Ashraf M. (2014)- Ethnopharmacology of *Artemisia annua* L.: A Review. In: Aftab T., Ferreira J., Khan M., Naeem M. (eds) Artemisia annua - Pharmacology and Biotechnology. Springer, Berlin, Heidelberg.

20. Tajehmiri A., Issapour F., Moslem M. N., Lakeh M. T. and Kolavani M. H., (2014)- In vitro Antimicrobial Activity of Artemisia annua Leaf Extracts against Pathogenic Bacteria. *Advanced Studies in Biology*, Vol. 6, , no. 3, 93-97.
21. Tiwari P., Kumar B., Kaur M., Kaur G., and Kaur H., (2011)- Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*. (1)1, 98-106.
22. Wall R. and Watson J. (2017)- *Artemisia annua* L. GRAS Research. Worcester Polytechnic Institute, FDA GRAS *Artemisia*, 27 pages.
23. WHO 2006- WHO Monograph on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Artemisia annua L. © World Health Organization, Switzerland, 49 pages.