

EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE ET ANTIFONGIQUE DE QUATRE ESPECES ALGALES MARINES IN VITRO EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF MARINE ALGAE

R. BEN ABDALLAH^{1,*}, D. FRIKHA², S. MAALEJ² ET S. SASSI³

1: Laboratoire des Biotechnologies Végétales Appliquées à l'Amélioration des Cultures, Faculté des Sciences de Sfax - Tunisie.

2: Unité de la biodiversité et écosystèmes aquatiques, Faculté des Sciences de Sfax - Tunisie.

3 : Unité de Valorisation des Bioressources des zones arides, Faculté des Sciences de Gabes - Tunisie.

*e-mail de l'auteur correspondant : rihab_b86@hotmail.com

Résumé

Objectif: La présente étude a été menée pour évaluer l'activité antimicrobienne et antifongique des extraits d'hexane, d'acétate d'éthyle et du méthanol de quatre algues marines du littoral tunisien (Chebba): deux phéophytea et deux chlorophytea. **Méthodes:** Ces extraits ont été testés contre sept bactéries pathogènes humaines: *Escherichia coli*, *Escherichia coli DH5 (alpha)*, *Listeria monocytogène*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, une levure (*Saccharomyces cerevisiae*) et un champignon (*Aspergillus niger*) **Résultats:** Les résultats de ces extraits naturels d'origine marine ont montré une activité antimicrobienne intéressante contre les bactéries Gram (+), ainsi que les activités inhibitrices maximales ont été observées chez les algues brunes, qui ont été plus actives sur les bactéries que sur les champignons en utilisant la méthode de dosage par diffusion sur disque d'agar. **Conclusion:** Les résultats de la présente étude ont révélé que ces algues marines tunisiennes semblent avoir un potentiel immense en tant que source de composés antibactériens et antifongiques, ils pourraient être utilisés dans le traitement des maladies causées par ces d'organismes.

Mots clés: Algues marines ; Activité antibactérienne ; Activité antifongique ; Méthode de diffusion sur disque.

Abstract

Objective: The present study was conducted to evaluate the antimicrobial and antifungal activity of hexane, ethyl acetate and methanol extracts from four Tunisian littoral marine algae (Chebba): two phéophytea and two chlorophytea. **Methods:** These extracts were tested against seven human pathogenic bacteria: *Escherichia coli*, *Escherichia coli DH5 (alpha)*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and a fungus (*Aspergillus niger*).

Results: The results of these natural extracts of marine origin showed interesting antimicrobial activity against Gram (+) bacteria, as well as maximal inhibitory activities were observed in brown algae, which were more active on bacteria than on fungi using the agar disc diffusion assay method. **Conclusion:** The results of the present study revealed that these Tunisian marine algae seem to have immense potential as a source of antibacterial and antifungal compounds; they could be used in the treatment of diseases caused by these organisms.

Key words: Marine algae; Antibacterial activity; Antifungal activity; Disk diffusion method.

ملخص

الهدف: أجريت هذه الدراسة لتقييم النشاط المضاد للميكروبات ومضاد للفطريات مقتطفات من الهكسان، خلات الإيثيل والميثانول أربعة الساحل التونسي الأعشاب البحرية (الشابة): اثنان فيوخته واثنين من كلوروفته. الطرق: تم يعاير هذه المقتطفات ضد سبعة من البكتيريا المسببة للأمراض البشرية: الإشريكية القولونية، كولاى ده 5 ألفا، المستوحدة الليستيريا، المكورات العنقودية الذهبية، ميكروكوكس لوتس، الخميرة الممرضة الإنسان (خميرة الخباز) والفطريات (الرشاشيات النيجر). النتائج: نتائج هذه مقتطفات الطبيعية المستمدة البحرية أظهرت النشاط البكتيري للاهتمام ضد غرام (+)، وشوهدت الحد الأقصى للأنشطة المثبطة في الطحالب البني، والتي كانت الأكثر نشاطا في البكتيريا كما الفطريات باستخدام أجار طريقة نشر القرص. الخلاصة: أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الطحالب البحرية التونسية يبدو أن لديها إمكانات كبيرة كمصدر للمركبات مضادة للجراثيم والفطريات، وأنها يمكن أن تستخدم في علاج الأمراض التي تسببها هذه الاختبارات الكائنات الحية.

الكلمات المفتاح: النشاط المضاد للبكتيريا ; النشاط المضاد للفطريات ; طريقة نشر القرص.

INTRODUCTION

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multirésistance bactérienne.

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les micro-organismes [1].

La maîtrise des infections bactériennes devient complexe du fait que de nombreuses bactéries ont développé une résistance à la plupart des antibiotiques ce qui a constitué un problème de santé important à l'échelle mondiale.

Cependant, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Les remèdes à base d'algues constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux algues médicinales pour leur richesse en antioxydants naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Le présent travail a été entrepris afin d'évaluer les activités antibactérienne et antifongique des extraits de quatre espèces algales prélevées de la zone de Chebba : deux algues brunes (*Cystoseira crinita* et *Dictyota dichotoma*) et deux algues vertes (*Flabellia petiolata* et *Anadyomene setellata*) vis-à-vis huit souches par le test de diffusion sur l'agar.

MATERIELS ET METHODES

2.1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne et antifongique :

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique a été réalisée par la méthode de diffusion en gélose dite méthode de diffusion sur disques [2].

2.1.1. Méthode de diffusion en milieu solide :

Nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu solide (milieu Muller- Hinton) pour l'activité antibactérienne et (milieu Sabouraud) pour l'activité antifongique. De ce fait, chacun des disques de papier Wattman stérile N° 3 et de diamètre 6 mm est imprégné par 20 µl de chaque extrait algal à une concentration de 50 mg/ml et placé à la surface du milieu de la boîte de pétri en présence des disques imbibés par une solution aqueuse (témoins négatifs). Des disques d'ampicilline commercialisée (à 10µg/ disque) comme témoins positifs, et des disques de cycloheximide (10µg/ disque) qui ont été pris comme antifongique pour les témoins positifs. Les boîtes ont été ensuite incubées 2h à 4°C puis à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30°C pendant 48 h pour les champignons. La mesure des diamètres des zones d'inhibition entourant les disques contenant les échantillons à tester a été réalisée.

2.1.2. Souches microbiennes utilisées :

Notre étude a porté sur 7 souches de référence qui sont les suivantes :

➤ 5 bactéries pathogènes à Gram⁺ et Gram⁻ : *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Escherichia coli* DH5 (alpha), *Listeria monocytogene* (BUG 496), *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Micrococcus luteus* (LB 14110).

➤ 1 espèce de champignon : *Aspergillus niger* (MTCC 281).

➤ 1 espèce de levure : *Saccharomyces cerevisia* (baker's yeast).

Ces souches appartiennent au laboratoire de microbiologie du département des sciences de la vie de la faculté des sciences de Sfax.

2.1.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice :

Afin de mieux évaluer cette activité une étude plus poussée a été menée par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits algaux contre les différentes souches bactériennes selon la méthode de micro-dilution. La CMI est définie comme étant la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance microbienne visible à l'œil nu.

L'activité antimicrobienne contre les micro-organismes analysés dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition, le diamètre de la zone (DD) et la concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport à l'ampicilline et à la cycloheximide utilisés comme des médicaments antibiotique et antifongique de référence.

La méthode de microdilution sur milieu liquide utilisant des plaques Elisa à 96 puits a été utilisée [3]. Des précultures sont préparées de la même façon que celles décrites précédemment pour le test de diffusion. L'inoculum a été préparé afin d'obtenir une densité cellulaire finale d'environ 10^6 CFU/ml.

Dans les plaques à 96 puits, des dilutions en série de l'extrait algal, convenablement solubilisés ont été préparées. En parallèle des contrôles appropriés ont été utilisés comme témoins positifs et négatifs. Les plaques ainsi préparées ont été incubées sous agitation modérée, à la température optimale de croissance du microorganisme : à (37°C) pendant 24 h pour les bactéries et à (30°C) pendant 48h pour les champignons. Les tests ont été réalisés deux fois à raison de 3 puits/échantillon lors de chaque essai.

Suite à une incubation, la CMI a été déterminée en suivant le virage de la coloration rouge brique du phénol à une coloration jaune, en présence de microorganismes en croissance. Une fois la croissance a été bloquée, on remarque que la couleur rouge du phénol persiste. La CMI correspond à la première concentration en échantillon du premier puits rouge et ne présentant ni trouble ni culot bactérien.

ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats des tests effectués *in vitro* sont exprimés en moyenne \pm SD. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey.

Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

RESULTATS

Nos extraits marins ont été testés *in vitro* pour évaluer leur activité antibactérienne et antifongique et leur capacité à stimuler l'expression de médiateurs de l'immunité.

L'activité antimicrobienne contre les micro-organismes analysés dans la présente étude a été évaluée qualitativement et quantitativement en fonction de la présence ou l'absence de zones d'inhibition, le diamètre de la zone (DD) et la concentration minimale inhibitrice (CMI), par rapport à l'ampicilline et à la cycloheximide utilisés comme des médicaments antibiotique et antifongique de référence (Tableau I).

La méthode des disques de diffusion est une technique permettant d'avoir une idée préliminaire sur la capacité d'un extrait à inhiber la croissance microbienne.

Les résultats révèlent que les plus haut niveaux d'activités marqués ont été enregistré par les 2 algues brunes *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira crinita* contre les bactéries Gram(+) *Micrococcus luteus* et *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition de l'ordre de 21.84 mm, 20.66 mm et 19.87 mm, suivi par des activités légèrement moins importante à absente pour les bactéries Gram (-).

Les résultats ont révélé que les bactéries Gram⁺, étaient plus sensibles à ces extraits que les Gram⁻ avec des valeurs des CMI allant de 6,25 à 50 mg/ml (Tableau I).

En ce qui concerne l'activité antifongique, les zones d'inhibition maximale a été observée contre *Aspergillus niger* (14.99 mm et 12.77 mm) suivie de *Saccharomyces cerevisiae* (10.78) (Tableau I).

Pour l'activité antifongique, nos résultats ont montré des diamètres d'inhibition compris entre 9.20 et 14.99 mm, observées pour *Dictyota dichotoma* et *Cystoseira crinita*. Pour les algues vertes étudiées, aucune activité n'a été détectée contre les champignons.

Tableau I: Les diamètres des zones d'inhibition et de la concentration minimale inhibitrice des différents extraits algaux.

	DD (Extraits)	DD (Contrôles)	CMI (mg/ml)
Bactéries Gram (-)			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Hexane (Dd)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Acétate d'éthyle (Dd)</i>	2.01± 1.1	22.00 ± 1.0	06.25
<i>Méthanol (Dd)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Hexane (Cc)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Acétate d'éthyle (Cc)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Méthanol (Cc)</i>	12.96± 0.5	22.00 ± 1.0	25.00
<i>Hexane (As)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Acétate d'éthyle (As)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Méthanol (As)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Hexane (Fp)</i>	-	22.00 ± 1.0	-
<i>Acétate d'éthyle (Fp)</i>	13.31±0.17	22.00 ± 1.0	12.50
<i>Méthanol (Fp)</i>	17.00±0.22	22.00 ± 1.0	06.25
<i>Escherichia coli</i> DH5 (alpha)			
<i>Hexane (Dd)</i>	7.58±0.41	20.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (Dd)</i>	5.84±1.20	20.60 ± 0.5	-
<i>Méthanol (Dd)</i>	8.85±0.24	20.60 ± 0.5	-
<i>Hexane (Cc)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (Cc)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Méthanol (Cc)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Hexane (As)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (As)</i>	4.07±0.11	20.60 ± 0.5	12.50
<i>Méthanol (As)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Hexane (Fp)</i>	-	20.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (Fp)</i>	10.47±0.07	20.60 ± 0.5	12.50
<i>Méthanol (Fp)</i>	8.62±0.20	20.60 ± 0.5	50.00
<i>Listeria monocytogène</i>			
<i>Hexane (Dd)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Acétate d'éthyle (Dd)</i>	17.95	21.50 ± 0.7	50.00
<i>Méthanol (Dd)</i>	12.44	21.50 ± 0.7	06.25
<i>Hexane (Cc)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Acétate d'éthyle (Cc)</i>	10.22	21.50 ± 0.7	12.50
<i>Méthanol (Cc)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Hexane (As)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Acétate d'éthyle (As)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Méthanol (As)</i>	15.59	21.50 ± 0.7	25.00
<i>Hexane (Fp)</i>	7.89	21.50 ± 0.7	06.25
<i>Acétate d'éthyle (Fp)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Méthanol (Fp)</i>	-	21.50 ± 0.7	-
<i>Méthanol (Dd)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Hexane (Cc)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (Cc)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Méthanol (Cc)</i>	10.78	25.60 ± 0.5	06.25
<i>Hexane (As)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (As)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Méthanol (As)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Hexane (Fp)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Acétate d'éthyle (Fp)</i>	-	25.60 ± 0.5	-
<i>Méthanol (Fp)</i>	-	25.60 ± 0.5	-

Bactéries Gram (+)			
<i>Staphylococcus aureus</i>			
Hexane (Dd)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Dd)	15.74	25.60 ± 0.5	50.00
Méthanol (Dd)	21.84	25.60 ± 0.5	50.00
Hexane (Cc)	6.84	25.60 ± 0.5	06.25
Acétate d'éthyle (Cc)	17.84	25.60 ± 0.5	50.00
Méthanol (Cc)	20.66	25.60 ± 0.5	50.00
Hexane (As)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (As)	6.84	25.60 ± 0.5	06.25
Méthanol (As)	16.84	25.60 ± 0.5	12.50
Hexane (Fp)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Fp)	18.74	25.60 ± 0.5	50.00
Méthanol (Fp)	20.44	25.60 ± 0.5	25.00
<i>Micrococcus luteus</i>			
Hexane (Dd)	12.84	20.00 ± 0.5	12.50
Acétate d'éthyle (Dd)	19.87	20.00 ± 0.5	12.50
Méthanol (Dd)	12.80	20.00 ± 0.5	50.00
Hexane (Cc)	-	20.00 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Cc)	-	20.00 ± 0.5	-
Méthanol (Cc)	14.45	20.00 ± 0.5	12.50
Hexane (As)	8.74	20.00 ± 0.5	06.28
Acétate d'éthyle (As)	11.55	20.00 ± 0.5	06.25
Méthanol (As)	-	20.00 ± 0.5	-
Hexane (Fp)	-	20.00 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Fp)	-	20.00 ± 0.5	-
Méthanol (Fp)	10.47	20.00 ± 0.5	06.25
Champignons			
<i>Aspergillus niger</i>			
Hexane (Dd)	-	21.00 ± 1.0	-
Acétate d'éthyle (Dd)	-	21.00 ± 1.0	-
Méthanol (Dd)	12.77	21.00 ± 1.0	12.50
Hexane (Cc)	-	21.00 ± 1.0	-
Acétate d'éthyle (Cc)	09.20	21.00 ± 1.0	-
Méthanol (Cc)	14.99	21.00 ± 1.0	12.50
Hexane (As)	-	21.00 ± 1.0	-
Acétate d'éthyle (As)	-	21.00 ± 1.0	-
Méthanol (As)	-	21.00 ± 1.0	06.25
Hexane (Fp)	-	21.00 ± 1.0	-
Acétate d'éthyle (Fp)	-	21.00 ± 1.0	-
Méthanol (Fp)	-	21.00 ± 1.0	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			
Hexane (Dd)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Dd)	-	25.60 ± 0.5	-
Méthanol (Dd)	-	25.60 ± 0.5	-
Hexane (Cc)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Cc)	-	25.60 ± 0.5	-
Méthanol (Cc)	10.78	25.60 ± 0.5	06.25
Hexane (As)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (As)	-	25.60 ± 0.5	-
Méthanol (As)	-	25.60 ± 0.5	-
Hexane (Fp)	-	25.60 ± 0.5	-
Acétate d'éthyle (Fp)	-	25.60 ± 0.5	-
Méthanol (Fp)	-	25.60 ± 0.5	-

Les données sont exprimées en moyenne ± SD (n = 3 essais pour chaque échantillon)

DD (extraits): diamètre des disques d'inhibition (mm) des extraits algaux (100 µg/disc) de *Dd* (*Dictyota dichotoma*), *Cc* (*Cystoseira crinita*), *Fp* (*Flabellia petiolata*) et *As* (*Anadyoméne stellata*); DD (contrôles): diamètre des disques d'inhibition (mm) de l'ampicilline (10 µg/disc) et du cycloheximide (10 µg/disc), utilisés comme contrôles positifs pour les bactéries et les champignons, respectivement. CMI: concentration minimale inhibitrice (mg/ml), (-) pas d'activité.

DISCUSSION

Les substances antimicrobiennes sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et d'autres agents antibactériens et antifongiques. Cependant, en raison du souci croissant des consommateurs aux denrées contenant de tels additifs synthétiques, la recherche des additifs naturels, particulièrement d'origine marine, a notamment augmenté ces dernières années.

Par conséquent, le développement des produits naturels possédant une activité antibactérienne s'avère nécessaire et utile [4].

Les résultats ont révélé que les bactéries Gram⁺, étaient plus sensibles à ces extraits que les Gram⁻ avec des valeurs des CMI allant de 6,25 à 50 mg/ml. Ce qui est en cohérence avec les études récentes qui ont montré des activités antibactériennes marquées contre les deux types de bactéries avec une inhibition élevée contre les Gram (+) [5, 6] ayant des CMI similaires à celles rapportées dans cette étude.

La grande sensibilité de *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* pourrait être due à la structure de la membrane et de la paroi cellulaire extérieure.

La résistance importante des bactéries Gram (-) pour nos extraits pourrait probablement être attribuée à leurs membranes extérieures qui entourent la paroi de la cellule et qui limitent la diffusion des composés hydrophobes par les lipopolysaccharides de couverture.

Par contre, pour les bactéries Gram (+), l'absence de cette barrière permet le contact direct des constituants des composés phénoliques isolés avec les phospholipides bicouches de la membrane cellulaire, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité aux ions et le passage des constituants ou une altération des systèmes enzymatiques bactériens intracellulaires vitaux [7].

Selon Candan et ses collaborateurs [8], les substances hydrosolubles exercent un effet plus faible comparé à celui des substances non hydrosolubles. Cela réfère probablement à la capacité des molécules liposolubles de s'insérer dans les membranes des cellules bactériennes et les endommager.

Il a été rapporté que les composés responsables de l'action antibactérienne semblent vraisemblablement être les diterpénoïdes phénoliques, qui sont les composés principaux de la fraction apolaire des extraits des plantes [9]. Ces composés sont de nature hautement lipophile est

par conséquent sont extraits par des solvants de faible polarité tel que l'hexane [10]. Ceci pourrait expliquer la modeste activité de l'extrait méthanolique envers les bactéries Gram⁺.

Concernant l'activité antifongique, nos résultats ont montré que parmi les espèces testées, celles qui appartiennent à Phéophyceae étaient les plus actives par rapport aux Chlorophyceae. Les algues appartenant au genre de *Cystoseira* possèdent une grande variété de composés avec différentes activités biologiques. Ces résultats sont intéressants car nous traitons avec un extrait et non un produit pur; par conséquent, l'activité antimicrobienne peut être due à des composés différents et liés à la présence de métabolites bioactifs.

De ce fait, une étude plus approfondie sera nécessaire sur la purification du principe actif de cet extrait, afin d'ouvrir la voie au développement de nouveaux médicaments potentiels pour traiter des infections fongiques opportunistes résistantes.

CONCLUSION

Les organismes marins ont plusieurs produits chimiques actifs tels que des composés antioxydants et antimicrobiens. Les organismes marins font actuellement l'objet d'investigations détaillées dans le but d'isoler des molécules biologiquement actives ainsi que de rechercher de nouveaux composés.

Cette étude rapporte la présence de composés antibactériens et antifongiques dans des algues marines collectés sur la côte de la Chebba.

Cystoseira crinita, *Dictyota dichotoma*, *Flabellia petiolata* et *Anadyomene setellata* sont une source prometteuse d'agents antibactériens ce qui est expliqué par la nature des composés présents dans ces algues.

REFERENCES

- [1] Yala D, Merad A S, Mohamedi D and Ouar Korich M N (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, n° 91.
- [2] Rahal, J. J (2006). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical infectious diseases*, 43(Supplement 2), S95-S99.
- [3] Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A& Ozkan, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food chemistry*, 103: 1449-1456.
- [4] Bougherra, H. H., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., & Conti, B. (2015). Pistacia lentiscus essential oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. *Industrial Crops and Products*, 63: 249-255.

- [5] Krichen, F., Karoud, W., Sila, A. d., Abdelmalek, B. E., Ghorbel, R., Ellouz-Chaabouni, S& Bougatef, A. (2015). Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. *International journal of biological macromolecules*, 75, 283-289.
- [6] Vijayabaskar, P., Vaseela, N& Thirumaran, G. (2012). Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassumswartzii*. *Chin. J. Nat. Med*, 10 : 421-428.
- [7] Kontiza, I., Stavri, M., Zloh, M., Vagias, C., Gibbons, S& Roussis, V. (2008). New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron*, 64: 1696-1702.
- [8] Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A and Akpulat H A (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
- [9] Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez J A and Kuri V (2005). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.
- [10] Albano S M and Miguel M G (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6.