

ارزیابی اثر های ضد باکتریایی اسانس گیاه (*Cinnamomum Verum*) و گیاه (*Ferula gummosa*) بر روی تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی

ندا سلیمانی^{۱*} نسیم ابراهه^۲

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

چکیده

سابقه هدف: مصرف روز افزون آنتی بیوتیک ها علیه عفونت ناشی از باکتری ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردیده تا مطالعه های وسیعی بر روی ترکیب های گیاهی با خاصیت ضد میکروبی و اثر بخشی بیش تر به عنوان جایگزین آنتی بیوتیکی صورت گیرد. هدف از این تحقیق، ارزیابی اثر های متقابل دارویی و فعالیت ضد باکتریایی اسانس دارچین (*Cinnamomum Verum*) و اسانس باریجه (*Ferula Gummosa*) بر ضد تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی می باشد.

مواد و روش ها: اسانس دارچین از چوب ساقه درختچه آن و اسانس باریجه از شیره ریشه گیاه به دست می آید. برای بررسی عمل کرد ضد باکتریایی اسانس از روش چاهک گذاری و تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) بر روی چندین رده استاندارد باکتریایی استفاده شد.

یافته ها: بر اساس تست چاهک گذاری در آگار بیش ترین میزان هاله عدم رشد در مورد دارچین مربوط به استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با قطر هاله ۴۷ mm و در مورد باریجه مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس با قطر هاله ۳۳ mm مشاهده شد. نتایج MIC نشان داد که اسانس دارچین بیش ترین میزان مهار کنندگی را بر روی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دارد.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی پیشنهاد می کند که اسانس های دارچین و باریجه می توانند به تنهایی یا در ترکیب با سایر عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت های باکتریایی موثر باشد.

کلمات کلیدی: فعالیت آنتی باکتریال، اسانس گیاه دارچین، اسانس گیاه باریجه، باکتری های گرم مثبت و گرم منفی.

مقدمه

منشاء گیاهی فراهم آورده است. در بسیاری از نقاط دنیا ترکیب های گیاهی به شکل سنتی به منظور درمان برخی بیماری ها به خصوص بیماری های عفونی، اسهال، تب، سرماخوردگی، کنترل زاد و ولد و بهداشت دهان و دندان استفاده می شوند. خواص ضد میکروبی گیاهان از دیر باز مورد توجه بوده و گذشتگان بدون اطلاع از وجود میکروب ها و تنها از طریق تجربه های بالینی از این گیاهان در درمان بیماری های عفونی استفاده می کردند (۴-۷). با این حال امروزه مطالعه بر روی گیاهان مورد استفاده در طب سنتی با هدف رسیدن به ترکیبات جدید در اولویت قرار گرفته است (۱۶، ۱۵). گیاه دارچین با نام علمی (*Cinnamomum verum*) درختچه ای است از راسته Laurales تیره برگ بوها Lauraceae از جنس دارچین ها *Cinnamomum*

آنتی بیوتیک های سنتتیک (synthetic) در دهه های گذشته نقش مهمی را در درمان بیماری های عفونی ایفا نمایند (۳-۱)، اما پیدایش مقاومت دارویی در برابر اغلب آنتی بیوتیک ها و بروز عوارض جانبی جدی به دنبال مصرف برخی از آنها، انگیزه زیادی را برای جستجو و ارائه ترکیب های ضد میکروبی جدید به ویژه با

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: Soleimani_neda86@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۷

قرار گرفت. نمونه ها شسته شده و با استفاده از آسیاب پودر گردید. ۱۰۰ گرم از هر کدام از پودر های حاصل به طور جداگانه در یک لیتر آب مخلوط شد و به مدت ۳ ساعت به روش تقطیر با آب (Hydrodistillation) در دستگاه کلونجر (Clevenger) اسانس گیری شد (۵). سپس اسانس جداسازی و تا زمان استفاده برای آزمایش ضد باکتریایی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سویه های آزمایش

از سویه های استاندارد اشریشیا کلی PTCC 1329، سودوموناس آروژینوزا PTCC 1181، کلبسیلا پنومونیه PTCC 1053، انتروباکتر آروژینوزا PTCC 1221، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1114، استرپتوکوکوس پیوژن PTCC 1447، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس PTCC 1440 تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران و موجود در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی جهت ارزیابی اثر آنتی باکتریال اسانس های دارچین و باریجه استفاده شد. سویه های مورد مطالعه با استفاده از محیط های افتراقی، انتخابی، اختصاصی و با استفاده از تست های بیوشیمیایی تایید هویت شدند. سویه ها در محیط کشت TSB به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و از کشت تازه باکتری برای انجام مراحل بعدی استفاده شد.

تعیین فعالیت ضد باکتریایی اسانس روی سویه های آزمایش

تست حساسیت به عصاره به روش چاهک گذاری

فعالیت ضد باکتریایی اسانس های دارچین و باریجه با روش چاهک گذاری (۵) و با اندازه گیری هاله مهارتی تعیین شد. به این منظور سوسپانسیون باکتریایی با غلظت $10^8 \times 1/5$ cfu (معادل نیم مک فارلند) روی محیط کشت مولر هینتون آگار توسط سوپ به صورت چمنی کشت داده شد و چاهک ها به وسیله انتهای پیپت پاستور استریل روی سطح آگار ایجاد شد. میزان ۲۵ میکرولیتر از اسانس داخل چاهک ها تزریق شد، سپس پلیت ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. قطر هاله های عدم رشد در اطراف چاهک ها برحسب میلی متر اندازه گیری شد. از سرم فیزیولوژی به عنوان کنترل منفی و آنتی بیوتیک جنتامیسین به عنوان کنترل مثبت کار استفاده شد. آزمون به صورت سه بار تکرار انجام شد.

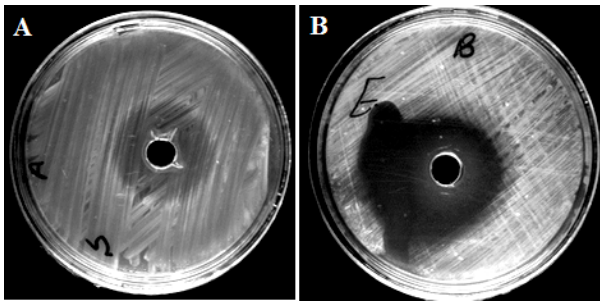
تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) Minimum Inhibitory Concentration

می باشد. گیاه دارچین بومی سری لانکا و جنوب هند است و پوست درختچه آن به عنوان ادویه به کار می رود (۲۰). این گیاه مصارف و کاربردهای متعدد دارد، از جمله برای درمان گرفتگی عضلات، استفراغ، اسهال، عفونت، سرماخوردگی، بی اشتهایی، بیماری آلزایمر و اختلال نعوظ استفاده می شود. هم چنین می تواند در کاهش قندخون در افراد مبتلا به دیابت نوع ۱ و ۲ موثر باشد. از ترکیب های مهم و عمده گیاه دارچین می توان به هیدروکربن ها و ترکیب های اکسیژن دار، برگاموتین، کاریوفیلین اکساید و سینامیل استات اشاره نمود. از جمله خواص درمانی آن خاصیت ضد صرع، کاهش نفخ شکم، دردهای زکام (آنفلوآنزا) و قولنج بوده و به عنوان ضمد برای تورم های اشتعالی، زخم معده، سوختگی، جراحت و ناراحتی های پوستی استفاده می شود (۱۴). از سوی دیگر، خواص گیاه باریجه (*Ferula gummosa*) مطرح است. این گیاه، خودرو و از خانواده چتریان می باشد. این گیاه با گلبرگ های جدا، ساقه ضخیم به ارتفاع ۱ تا ۲ متر برگ هایی به رنگ سبز مایل به خاکستری و پوشیده از تار به طول ۳۰ سانتی متر بوده، رشد گیاه به صورت روزت بوده و از سن ۵ سالگی به بعد با ایجاد ساقه گل دهنده به مراحل زایشی وارد می گردد. گیاه باریجه در طول عمر تنها یک بار به گل نشست و بذر می دهد و پس از آن، از بین می رود. گل های آن زرد و مجتمع بوده و به صورت چترهای مرکب و به طور عمومی به صورت دستجات فراهم در باریک تر از نصف قسمت محتوای دانه می باشد. این گیاه در مناطق کوهستانی مرکزی و شمال شرق ایران می روید (۱۰). این گیاه به عنوان طعم دهنده در محصول های غذایی مانند نوشابه های غیرالکلی و فرآورده های گوشتی و یا معطرکننده و تثبیت کننده عطرها در فرآورده های آرایشی مورد مصرف قرار می گیرد. مصرف روزافزون آنتی بیوتیک ها علیه عفونت ناشی از باکتری ها سبب افزایش مقاومت دارویی شده است. همین امر سبب گردیده تا مطالعه های وسیعی بر روی دارو های ضد میکروبی جدید با اثر بخشی بیش تر صورت گیرد. با توجه به کاربردهای ذکر شده و امکان استفاده مفید آن به صورت بالینی و برای درک مناسب از اثرهای این گیاهان دارویی، فعالیت ضد باکتریایی اسانس گیاه دارچین و باریجه علیه تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار گرفت.

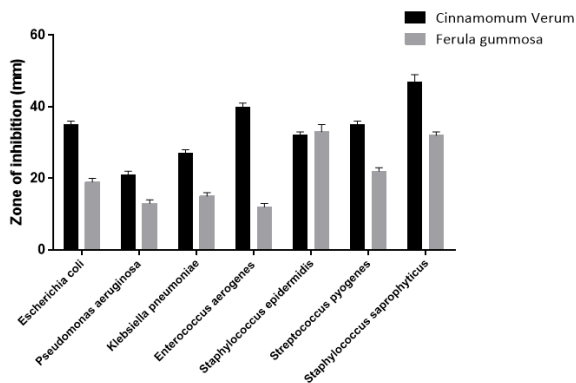
مواد و روش ها

نمونه گیاهی و استخراج اسانس

در طی یک مطالعه تجربی - آزمایشگاهی چوب دارچین و گیاه باریجه تهیه و توسط مرکز تحقیقات کشاورزی ایران مورد تایید



شکل ۱: اثر اسانس باریجه بر سویه باکتریایی در تست انتشار از چاهک. هاله عدم رشد در (A) استافیلوکوکوس ارئوس (B) اشیشیاکلی



نمودار ۱. اثر اسانس های دارچین و باریجه بر قطر هاله عدم رشد سویه های استاندارد باکتریایی. نتایج بصورت انحراف معیار \pm میانگین می باشد.

بررسی نتایج MIC نشان داد اسانس دارچین و باریجه بیش ترین اثر مهار کنندگی را بر روی استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس دارد.

جدول شماره ۱. نتایج آزمون MIC در سویه های باکتری های استاندارد برای اسانس دارچین و باریجه. *بر حسب رقت از استوک (وزن حجمی استوک = 0.1 mg/ml میلی گرم در میلی لیتر)

اثر مهاری در محیط مایع بر حسب mg/ml			باکتری
اسانس باریجه (mg/ml) MIC	اسانس دارچین MIC (mg/ml)	کنترل (Tyrode)	
۰/۰۱	۰/۰۰۱۹	-	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس PTCC 1440
۰/۰۵	۰/۰۳۹	-	استریتوکوکوس پیوژن PTCC 1447
۰/۰۱	۰/۰۱	-	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس PTCC 1114
-	۰/۰۰۸	-	انتروباکتر آئروژینوزا PTCC 1221
-	۰/۰۱۴	-	کلبسیلا پنومونیه PTC 1053
-	۰/۱	-	سودوموناس آئروژینوزا PTCC 1181
۰/۰۵	۰/۰۴۶	-	اشیشیا کلی PTCC 1329

برای تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی اسانس بر روی سویه های آزمایش از روش میکرو برات دایلوشن استفاده شد (۲۳). میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات شد. اسانس در بافر Tyrode به نسبت ۱:۲ رقیق شده و پس از آن در چاهک اول، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱:۲ اسانس اضافه شد و پس از مخلوط کردن، ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم اضافه شد و به همین ترتیب سریال رقت در چاهک ها ایجاد گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون با کتریایی (10^8 کلنی در میلی لیتر) به صورت جداگانه به چاهک ها اضافه شد. به چاهک کنترل منفی بافر Tyrode بدون اسانس اضافه گردید. سپس میکروپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. MIC (حداقل غلظت مهار کنندگی) به عنوان پایین ترین غلظتی که جهت توقف رشد باکتری ها در پایان ۱۸ ساعت گرمخانه گذاری مورد نیاز است، تعریف شد (۲۲).

آنالیز آماری

داده ها به صورت انحراف معیار \pm میانگین گزارش شد و آنالیز آماری داده ها، با استفاده از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون توکی (Tukey) بررسی گردید. نتایج با نرم افزار Prism6 بررسی و $P \leq 0.05$ به صورت معنی دار تفسیر گردید.

یافته ها

فعالیت ضد باکتریایی اسانس (نتایج آزمون های انتشار از چاهک و MIC)

نتایج آزمون های ضد باکتریایی در جدول شماره ۱ آورده شده است. بر اساس تست چاهک گذاری در آگار، بزرگ ترین هاله عدم رشد مربوط به استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس با قطر هاله ۴۷ mm در مورد اسانس دارچین و بزرگ ترین هاله عدم رشد در مورد باریجه مربوط به استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با قطر ۳۳ mm بود. برای دارچین کم ترین قطر هاله عدم رشد مربوط به سودوموناس آئروژینوزا (۲۱ mm) و برای باریجه قطر هاله عدم رشد در ارتباط با انتروباکتر ائروژن مشاهده گردید (نمودار شماره ۱). تست انتشار از چاهک هاله عدم رشد در مورد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشیشیاکلی در شکل ۱ قابل مشاهده است. بررسی نتایج MIC نشان داد که اسانس دارچین بیش ترین اثر مهار کنندگی را بر روی استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دارد (جدول شماره ۱).

بحث

باریجه در مورد سه باکتری گرم مثبت: استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و باسیلوس سوبتیلیس و هم چنین سه باکتری گرم منفی: اشرشیاکلی، سالمونلا تیفی و سودوموناس آئروژینوزا و قارچ کاندیدا آلبیکنس به اثبات رسید (۲۴). در تحقیقی دیگر اثر ضد باکتریایی باریجه روی باکتری های پاتوژن عامل گاستروانتریت تایید شد، که در مورد باکتری های پروتئوس میرابیلیس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و سودوموناس تاثیر بیش تری مشاهده شد (۸). ابراهیم زاده و همکارانش نیز حساسیت سالونلا تیفی و شیگلا دیسانتری به باریجه را اثبات کردند (۷). آزمون MIC نیز حاکی از آن بود که اسانس دارچین در مورد استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس حتی تا رقت ۱/۴۰۰ (۰/۰۰۱۹ میلی گرم در میلی لیتر) از اسانس نیز اثر مهاری دارد. در مورد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و اشرشیاکلی نیز تا چند رقت اثر مهاری مشاهده شد. لیکن در مورد سویه های کلبسیلا و سودوموناس آئروژینوزا در رقت های بیش تر اسانس ممانعت از رشد باکتری مشاهده نشد. آزمون MIC در مورد اسانس باریجه نیز حاکی از آن بود که در مورد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حتی تا (۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر) از اسانس نیز اثر مهاری دارد. نتایج به دست آمده در این پژوهش در مقایسه با نتایج سایر مطالعه ها اثرهای واضح تری را در مورد اسانس گیاه باریجه بر روی هر دو باکتری گرم مثبت و منفی نشان می دهد. این اختلاف می تواند به دلیل نوع گیاه بومی به کار رفته، مقدار ماده موثره موجود در گیاه مورد مطالعه، تکنیک تهیه اسانس، تازه بودن اسانس و اختلاف در سویه مورد مطالعه باشد.

نتیجه گیری

از آنجائی که مقاومت باکتریایی در حال افزایش است و انتقال مقاومت از باکتری های مقاوم به باکتری های حساس از طرق مختلف به آسانی صورت می گیرد و موجب مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های مصرفی معمول می گردد، لذا اسانس دارچین و باریجه هم چون دیگر مشتقات گیاهان داروئی با خواص آنتی باکتریال می تواند به عنوان ترکیب جایگزین و یا مکمل در درمان عفونت های باکتریایی به کار رود. در حال حاضر یکی از عمده مشکلاتی که در درمان عفونت ها و استفاده از آنتی بیوتیک ها مطرح می باشد، ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی است که توجه خاصی را برای حل این مشکل می طلبد. نتایج این بررسی پیشنهاد می کند که اسانس گیاه دارچین و باریجه می تواند به تنهایی یا همراه با سایر عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت های باکتریایی مفید باشد. با این حال آزمایش های تکمیلی و *in vivo* برای ارزیابی سمیت احتمالی اسانس، بررسی خواص و

گیاهان داروئی در طب سنتی و خوراکی کاربردهای گسترده ای دارد. استفاده از آنها به عنوان چاشنی، طعم دهنده و حتی نگهدارنده در صنعت مطرح می باشد. با توجه به خواص گیاهان دارویی، امروزه این گیاهان و مشتقات آنها به عنوان مکمل های درمانی در درمان بیماری های مختلف بکار رفته است (۱۴،۱۱). جستجو برای کشف عوامل ضد میکروبی سالم و موثر ادامه دارد که می تواند هم از لحاظ درمانی و هم از لحاظ پیشگیری، در مورد طیف وسیعی از عفونت های باکتریایی استفاده شود. این نیاز در سال های اخیر با ظهور میکروارگانیزم های مقاوم به چند دارو نمایان تر شده است (۱۸). بنابراین شرکت های داروسازی در حال حاضر به دنبال داروهای جایگزین از سایر منابع از جمله گیاهان هستند، زیرا مشخص شده گیاهان دارویی موادی با فعالیت ضد میکروبی تولید می کنند. در مورد اثر ضد میکروبی اسانس گیاه دارچین گزارش هایی صورت گرفته است (۲۱،۱۹). مطالعه ی Suree و همکاران نشان داد که، اسانس دارچین اثر ضد میکروبی قابل قبولی را نسبت به سویه های مختلف اشرشیاکلی دارد (۱۷). در تحقیقاتی که توسط Ranasinghe و همکارانش روی عصاره دارچین و چند گیاه دیگر بر روی قارچ ها انجام شد اثر های ضد قارچی این گیاه به اثبات رسید (۱۶). در پژوهشی دیگر، اثر ضد میکروبی دارچین بر ضد باکتری های اشرشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم بررسی و اثبات شد (۴).

در بررسی حقیقی و همکاران که فعالیت ضد قارچی اسانس های آویشن باغی، جعفری، زیره سبز و زیره سیاه روی کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با فلوکونازول را مورد ارزیابی قرار بود، اسانس هر ۴ گیاه، روی رشد باکتری و قارچ کاندیدا آلبیکنس دارای اثر مهاری بوده که بیشترین اثر به ترتیب مربوط به آویشن و جعفری بوده است (۱۲). نتایج تحقیق حاضر در مقایسه با سایر مطالعه های انجام گرفته خاصیت آنتی باکتریال قوی تری را در مورد اسانس دارچین نشان می داد، این اختلاف شاید به دلیل تفاوت در گونه گیاه بومی و اختلاف در میزان ماده موثره آن باشد. در تحقیقی که توسط John, M و همکارانش انجام شد نقش موثر عصاره دارچین بر روی گونه های مختلف کاندیدا و بیماری کاندیدایزیس مورد تایید قرار گرفت (۱۳). ضمناً اثر های آنتی اکسیدانی دارچین هم توسط Guddadaran و همکارانش نیز به اثبات رسید (۹). روی اثر های ضد میکروبی باریجه نیز تحقیقات زیادی صورت گرفته که همه آنها اثر های ضد میکروبی این گیاه را تایید می کنند، از آن جمله در بررسی که توسط ghasemi و همکارانش انجام شد اثر ضد میکروبی

تازه های بیو تکنولوژی سلولی - مولکولی دوره ششم، شماره بیست و سوم، ندا سلیمانی و همکاران

اثر آن و به دست آوردن غلظت های مناسب آن برای استفاده در بدن موجود زنده لازم است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله بدین وسیله از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی تهران، که در به ثمر رساندن این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

Archive of SID

- 1) Ayfer D, Turgay O. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turk J Biol 2003; 27:157-162.
- 2) Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol 2004; 94:223-253.
- 3) Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev 1999; 12(4):564-582.
- 4) Cimanga K, Kambu K, Antimicrobial Activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from The Chinese medicinal herb cinnamomum cassia Blume ,The American J. chinese Medicine ,January 2006 /Vol34/No.03 :pp.511-522 .
- 5) Daneshmandi S, Soleimani N, Pourfathollah AA, Sattari M. Evaluation of the drug synergistic and antibacterial effects of cuminum cyminum essential oil. Arak Medical University Journal 13 (2), 75-82.
- 6) Essawi T and Srour M. Screening of Some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. J Ethnopharmacol 2000; 70(3):343-349.
- 7) Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM, Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of Ferula gummosa ,Boiss roots Eur Rev.med pharmocol sci ,2011”15(6):658-64.
- 8) Fariba fayas et,al.The antimicrobial activity of Ferula gummosa on bacterial strains isolated from patients with gastroenteritis.Iran J clin infect Dis 2011.
- 9) Guddadarangavvanahally K .Jayaparkasha,et.al.,Volatile constituent from cinnamomum zeylanicum fruit stalks and their antioxidant activities.J.Agric.food chem.2003: 51(5): 4344-4348.
- 10) Gruenwald J, Freder J, Armbruester N: Cinnamon and health. Crit Rev Food Sci Nutr 2010, 50:822–834.
- 11) Han SY, Li PP. Progress of research in antitumor mechanisms with Chinese medicine. Chin J Integr Med 2009; 15(4):316-20.
- 12) Haghghi F, Roudbar Mohammadi S, Soleimani N, Sattari M. Evaluation of antifungal activity of essential oils of Thymus vulgaris, Petroselinum Crispum, Cuminum cyminum and Bunium persicum on candida albicans in comparison with Fluconazole Modares J. Medical Sciences: Pathobiology 14 (1), 29-35.
- 13) John M ,et al .,In vitro Activity of cinamomum zeylanicum Against azole resistant and sensitive candida species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis,The American J. Chinese medicine,January 1996,Vol.24,No.02:pp:103-109.
- 14) Jayaparkasha GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Chemical composition of the flower oil of Cinnamomum zeylanicum blume. J Agric Food Chem. 2000; 48 (9):4294-5 .
- 15) Kudi AC, Umoh JU, Eduvie LO, Gefu J. Screening of Nigerian medicinal plants for antibacterial activity, J Ethnopharmacol 1999; 67(2):225-228.
- 16) L.Ranasinghe,B.Jayawardena,Fungicidal activity of essential oils of Cinnamomum Zeylanicum(L.) and Syzygium aromaticum (L) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana .Letteres in APPLIED Microbiology 2002,35,208-211.
- 17) Nanosombat Suree,Lohasup thawee Pana 2005, ”Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts

and essential oils of spices against salmonellae and other entrobacteria “ KMITL.Sci.Tec.J.Vol5 No.30

- 18) Preuss HG, Echard B, Brook I, Elliott TB. Minimum inhibitory concentrations of herbal essential oils and monolaurin for gram-positive and gram-negative bacteria. *Mol Cell Biochem* 2005; 272(1-2):29-34.
- 19) Spratt BG, Resistance to antibiotics mediated by target alterations, *Science* 1994; (264):388-393.
- 20) Shen Q, Chen F, Luo J: Comparison studies on chemical constituents of essential oil from ramulus cinnamomi and cortex cinnamomi by GC-MS. *Zhong Yao Cai* 2002, 25:257-258.
- 21) Song W, Studies on traditional Chinese medicines against bacterial infections, *J Beijing Tradit Chin Med* 2002; (21):249-2
- 22) Soleimani N, Sattari M, Sepehriseresht S, Daneshmandi S. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effects and antibacterial activity of Bunium persicum essential oil against some Gram positive and Gram negative bacteria. *Iran J Med Microbiol.* 26-34.
- 23) Soleimani N, Mobarez A, Jafari Olia M, Atyabi F. Synthesis, Characterization and Effect of the Antibacterial Activity of Chitosan Nanoparticles on Vancomycin- Resistant Enterococcus and Other Gram Negative or Gram Positive Bacteria. *International J. Pure & Applied Sciences & Technology.* 2015: 26(1): 14-23.
- 24) Y.ghasemi et al, Ferula gummosa FRVITS:AVAROMATICANTIMICROBIALAGANT,chemistry of natural compounds. 2005: 41 (3): 42-55.