بررسی تأثیر عصاره های آبی والکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی اشریشیا کلی انترو هموراژیک

منصور گودرزی[1]، مرتضی ستاری[2]، شهین نجار پیرایه[2]، غلامرضا گودرزی[3]، محسن بیگدلی[4]
1- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی, دانشگاه تربیت مدرس
2- استادیار، عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی
3- دانشجوی کارشناسی ارشد باکتری شناسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
4- استادیار، مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران

یافته / دوره هشتم / شماره 3 / پاییز 85 / مسلسل 29

چکیده

دریافت مقاله: 85/2/4، ***پذیرش مقاله***: 85/5/1

Ø مقدمه: به دلیل مقاومت روز افزون باکتری های بیماریزا به آنتی بیوتیک های جدید محققین در پی یافتن مواد ضد میکروبی با منشأ گیاهی به عنوان جایگزین آنتی بیوتیکهای غیر مؤثر هستند. هدف از انجام این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره آبی و الکلی گیاه آویشن شیرازی بر روی سویه های بالینی واستاندارد اشریشیا کلی انترو هموراژیک می باشد.

Ø مواد و روش ها: برگ های جوان گیاه پس ازخشک شدن به طور جداگانه به میزان 10گرم دردسی لیتربه اتانول 85 درجه وآب مقطر اضافه شده، سپس عصاره ها به روش تقطیر در خلاء استخراج شدند. خواص ضد باکتریایی عصاره ها ابتدا به روش رقت در لوله تعیین و سپس وزن خشک عصاره ها در هر میلی لیتر محاسبه و حداقل غلظت مهار کنندگی وکشندگی آنها بدست آمد. معادل این غلظت ها به چاهک های حفر شده در محیط مولر - هینتون آگار اضافه ومیانگین قطر هاله های عدم رشد برای عصاره ها و سویه ها مقایسه گردید. به منظورشناسایی مواد مؤثره ضد باکتریایی در عصاره های آبی و الکلی از روش کروماتوگرافی با صفحه نازک استفاده گردید.

Ø یافته ها: غلظت های معینی ازعصاره الکلی دارای خواص ضد باکتریایی قابل توجهی بود. در غلظت 0/78 میلی گرم در میلی لیتر دارای اثر مهاری و اثر کشندگی بر روی هر سه سویه بود و از این نظر سویه ها با هم تفاوتی نداشتند. همچنین تأثیر عصاره با کم شدن غلظت آن در چاهک ها کم می شد. این در حالی بود که عصاره آبی در هیچکدام ازغلظت ها بر روی سویه های استاندارد و بالینی مؤثر نبود.

Ø نتیجه گیری: عصاره الکلی آویشن شیرازی دارای اثرات چشمگیری بر روی سویه های اشریشیا کلی انترو هموراژیک می باشد ولی معرفی آن به عنوان یک ترکیب ضد باکتریایی نیاز به تحقیقات وسیع تری دارد.

واژه های کلیدی: آویشن شیرازی، اشریشیا کلی انترو هموراژیک، گیاهان دارویی

آدرس مکاتبه: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه باکتری شناسی، ک پ : 1411/158
پست الکترونیک: rsattarym@yahoo.com

مقدمه

آویشن از قرن 16 رسماً به عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده ودر تمام فارماکوپه های معتبر ثبت شده است (1، 2). آویشن یا آویشم گروهی از گیاهان تیره نعناع[1] راسته لامیلها[2] می باشد که شامل 3 جنس است:

1- جنس زاتاریا[3]: که گونه ای از آن در جنوب ایران موجود است وبه آویشن شیرازی یا پهن برگ معروف است.
2- جنس زیزیفورا[4]: آویشن باریک برگ گونه ای از آن است.
3- جنس تیموس[5]: که بسیار متنوعند. 17 گونه از آن گزارش شده که 14 گونه آنها متعلق به ایران است. گونه ولگاریس[6] از این جنس به نام آویشن[7] یا آویشن باغی و یا آویشن معمولی است (1).

آویشن اثرات ضدعفونی کننده دارد.گاهی از اسانس آن بعنوان داروهای ضد تشنج وضد روماتیسم ، از طعم تند و گرم آن در صنایع غذایی و از اثرات ضد عفونی کننده آن در صنایع بهداشتی در تهیه صابونهای معطر یا در فرمول خمیر دندانها و محلولهای دهان شویه استفاده می شود (2، 5). اسانس آن مایعی زرد رنگ یا زرشکی است، بوی مطبوع و طعم تند دارد. تیمول ترکیبی فنلی و مهمترین ماده مؤثره آن بوده و ترکیب مهم دیگر آن کارواکرول است که به خوبی در الکل و حلالهای آلی حل می شوند و این مواد عمدتاً در طی رشد گیاه در برگهای جوان ذخیره می شوند. از برگهای گیاه به صورت دم کرده برای التیام سرفه استفاده می شود. عصاره الکلی آن اثر ضد عفونی کننده و خلط آور دارد. داروهای متعددی از مواد مؤثره آن به صورت شربت،پماد،قطره و ... در بازارهای دارویی دنیا عرضه می شود. شربت تیمیان که نوعی خلط آور است در ایران تهیه و مصرف دارویی دارد (3، 4).

اشریشیا کلی انتروهموراژیک[8] باکتری بیماری زای انسانی است که از طریق اغذیه آلوده منتقل می شود. بیماری ناشی از این باکتری به صورت انفرادی و اپیدمی در نقاط مختلف دنیا گزارش می شود (6). علائم و نشانه های بیماری عبارتند از اسهال، تهوع ،کولیت خونریزی دهنده و دل پیچه های شدید. در مواردی این بیماری به صورت سندرم همولیتیک اورمیک بویژه در کودکان بروز می کند و موجب نقص کلیه ها می شود که در صورت عدم درمان به مرگ منتهی می گردد (7). دوره نقاهت بیماری بین 6-1 روز و گاهی تا 14 روز گزارش شده است (8).

عامل اصلی ایجاد بیماری سم وروتوکسین است که توسط این باکتری در شرایط مساعد تولید می شود. چون باکتری عمدتاً از طریق اغذیه آلوده منتقل می شود ، لذا روشهای طبخ و نگهداری مواد غذایی در جلوگیری از شیوع بیماری نقش مهمی ایفا می کند.

اثرات مواد شیمیایی مختلف به عنوان مواد نگهدارنده بر روی رشد اشریشیا کلی انتروهموراژیک مورد مطالعه قرار گرفته است (9) و گیاهان نیز به عنوان افزودنی های غذایی نقش مهمی در بازدارندگی فلور میکروبی دارند.

در این تحقیق اثر عصاره های الکلی وآبی آویشن بر روی مهار رشد اشریشیا کلی انتروهموراژیک مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

عصاره‌گیری

گیاه آویشن شیرازی پس از تأیید از باغ کشاورزی مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران به محل انجام تحقیق در گروه باکتری شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد و پس از خشک کردن کامل گیاه در محل تاریک و بدون رطوبت، برگ‌های جوان گیاه از سایر قسمت‌ها جدا شده و سپس کاملاً خرد گردید (10).

تهیه عصاره آبی و الکلی

10 گرم از برگ‌های جوان گیاه خرد شده آویشن به طور جداگانه به 100 میلی‌لیتر هیدرواتانول 85 درجه و آب مقطر

1. Lamiaceae
2. lamhiales
3. Zataria
4. Ziziphora
5. Thymus
6. Vulgaris
7. Thyme
8. Entro Hemorrhagic Escherichia Coli (EHEC)

اضافه گردید و به مدت 72 ساعت بر روی دستگاه چرخاننده به آرامی مخلوط گردیده تا استخراج به خوبی صورت گیرد[1].

سپس مخلوط حلال و گیاه توسط صافی از هم جدا تا عصاره های اولیه[2] بدست آید. عصارهٔ اولیه وارد دستگاه تقطیر در خلاء گردیده و در دمای 80 درجه سانتیگراد حلال آنها به مدت یک ساعت به آرامی تبخیر گردید و عصاره تغلیظ شده بدست آمد (11) .

تعیین وزن خشک عصاره‌ها

جهت استاندارد کردن روش و تکرارپذیری آن وزن خشک عصاره‌ها تعیین گردید. بدین صورت که برای هر عصاره به طور جداگانه سه لوله خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد. سپس از هر کدام از عصاره‌های آبی و الکلی 1 میلی‌لیتر به هر لوله اضافه شد. پس از انکوباسیون 24 ساعته لوله‌ها در 50 درجه سانتی‌گراد عصاره ها کاملاً خشک شده، سپس سه لوله مربوط به هر کدام از عصاره‌ها مجدداً توزین گردیده و با کم کردن وزن لوله های خالی، میانگین وزن خشک عصاره های آبی و الکلی در میلی‌لیتر بدست آمد (11).

سویه‌های مورد آزمایش

در این تحقیق از دو سویه استاندارد و بالینی اشریشیاکلی انتروهموراژیک استفاده شد. سویه استاندارد اشریشیاکلی انتروهموراژیک ATCC 33150 از مرکز رفرانس بیمارستان بوعلی و سویه بالینی از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. هر دوسویه پس از تعیین هویت نهایی توسط آزمایش های بیوشیمیایی، به روش انتشار در آگار توسط دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ساخت شرکت پادتن طب، تعیین حساسیت دارویی شدند. جهت انجام آزمایشات حساسیتی و رسیدن باکتری به تعداد استاندارد و فاز رشد لگاریتمی، از دوسویه فوق سوسپانسیون باکتریایی با کدورت 0/5 مک‌فارلند در محیط مولر- هینتون براث تهیه و سپس از هر لوله روی محیط جامد کشت داده شد تا تعداد باکتری‌های زنده و فعال در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌ها مشخص گردد (12) .

بررسی کمی حساسیت به روش سریال‌های رقتی

در این روش جهت تعیین نسبی حداقل غلظتی که باعث مهار رشد باکتری‌ها[3] (MIC) و حداقل غلظتی که باعث مرگ باکتری‌ها[4] (MBC) می‌گردد، از عصاره آبی و عصاره تغلیظ شده الکلی سریال‌های رقتی $1/2$, $1/4$، $1/8$, $1/16$,$1/32$ و ..... در محیط مولر- هینتون براث تهیه گردید . سپس به هر کدام از رقت‌ها به ازای هر میلی‌لیتر محیط مایع، 5×10^5 باکتری فعال اضافه گردید. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری، بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت بدون باکتری) استفاده گردید. در نهایت لوله‌ها به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید.

برای هر کدام از رقت‌های عصاره آبی و الکلی، آخرین رقتی که در آن هیچگونه کدورتی مشاهده نگردید (عدم رشد) به عنوان MIC در نظر گرفته شد و از تمام لوله‌های بدون کدورت روی محیط مولر- هینتون براث آگار کشت داده شد. آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ 99/9% درصد از باکتری‌های زنده اولیه بود، به عنوان MBC عصاره‌ها در نظر گرفته شد (12-11).

تعیین MIC و MBC براساس وزن خشک عصاره‌ها

با توجه به وزن خشک عصاره‌ها در هر میلی‌لیتر، رقت‌هایی که به عنوان MIC و MBC نسبی عصاره‌ها تعیین گردید به مقادیر وزنی عصاره‌ها تبدیل شد. در نتیجه به منظور تعیین دقیق MIC و MBC به وسیله ترازوی حساس مقادیر وزنی معادل با MIC و MBC به روش سریال رقتی، از پودر عصاره‌ها توزین و در 1 میلی‌لیتر از محیط مولر- هینتون براث حل شد. همانند روش قبل 5×10^5 باکتری به هر لوله اضافه وپس از انکوباسیون 24 ساعته در 37 درجه سانتیگراد مقادیر

1. Macceration method
2. Crude extract
3. Mean Inhibitory concen tration
4. Mean Bactriocidal concentration

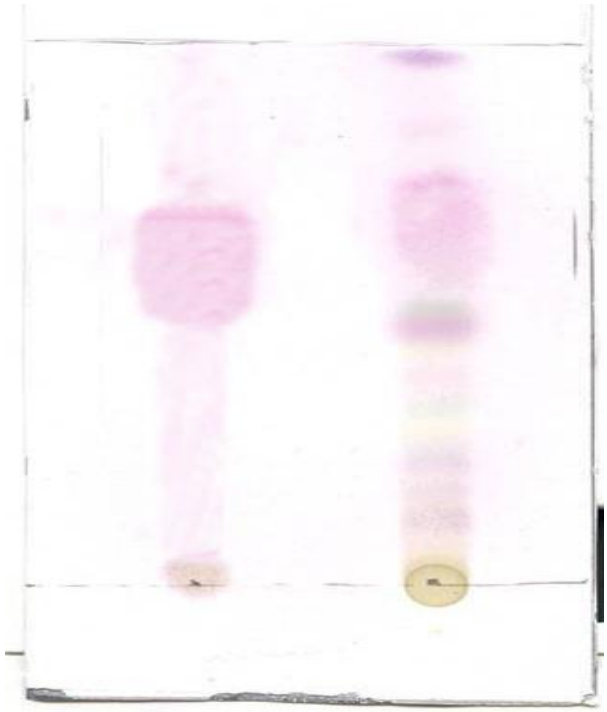
MIC و MBC بر حسب میلی گرم در میلی لیترعصاره ها برای هر سویه تعیین گردید (11).

تعیین قطر هاله‌های عدم رشد برای مقادیر MIC و MBC

برای تعیین قطر هاله‌های عدم رشد، چاهک‌هایی به حجم 100 میکرولیتر بر روی محیط مولر- هینتون آگار (قطر4 mm) به طورجداگانه برای هر عصاره حفر شده و با حفظ شرایط استاندارد درانجام تست‌های حساسیتی، از سوسپانسیون 0/5 مک فارلند هر سویه به طور جداگانه به روش کشت سفره‌ای بر روی محیط، کشت داده شد. سپس مقادیر معادل با MIC و MBC بدست آمده در روش های قبل در درون چاهک‌ها ریخته شد وپس از 24 ساعت انکوباسیون، قطر هاله‌های عدم رشد به طور دقیق اندازه گیری شدند (13).

بررسی مواد مؤثره

به منظور شناسایی مواد مؤثره ضد باکتریایی در عصاره های آبی و الکلی از روش کروماتو گرافی با صفحه نازک (TLC) استفاده شد. در این روش از صفحات سیلیکاژل ساخت شرکت مرک آلمان به عنوان فاز ثابت استفاده گردید و مقادیر 5 میکرولیتر از عصاره های آبی و الکلی به طور جداگانه روی صفحات سیلیکاژل قطره گذاری شد. در کنار عصاره ها از ماده کارواکرول حل شده در اتانول 96 درجه (10 گرم در 10 میلی لیتر) به عنوان شاهد استفاده گردید. فاز متحرک به کار برده شده در این روش مخلوطی از دو حلال تولوئن و اتیل استات (93/7) بود که پس از اشباع شدن تانک از فاز متحرک، صفحات لکه گذاری شده در درون تانک حلال قرار گرفته وپس از گذشت 45-30 دقیقه در دمای محیط، کروماتوگرام ها از تانک خارج و در یک جریان هوای خنک، خشک گردیدند. به منظور آشکار کردن باندهای مختلف مواد از معرف وانیلین سولفوریک اسید (1گرم در 100 میلی لیتر اسید 30%) استفاده گردید که پس از اسپری صفحات با معرف مذکور، کروماتوگرام ها به مدت کوتاهی در فور 105درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از فرایند آشکارسازی باندها مورد مقایسه قرار گرفتند (14).



شکل شماره 1- کروماتوگرام حاصل ازعصاره الکلی آویشن (سمت راست) درکنارکارواکرول تجاری(سمت چپ) 94 درصد

یافته ها

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های استاندارد و بالینی با برخی از آنتی بیوتیک های رایج نشان داد که دو سویه از نظر تست های آنتی بیوگرام تفاوت چندانی ندارند (جدول1).

ازعصاره های آبی والکلی پس از تغلیظ در دستگاه تقطیر در خلاء در نهایت 3میلی لیتر عصاره غلیظ بدست آمد که در تعیین MIC وMBC به روش سریال رقتی و وزن خشک عصاره از آنها استفاده گردید.

در تعیین MIC وMBC به روش سریال رقتی، هیچکدام از رقت های عصاره آبی (حتی رقت صفر) قادر به مهار رشد سویه های استاندارد و بالینی نبود (جدول3). ولی در این روش عصاره الکلی در رقت 1/64 باعث مهار رشد و مرگ باکتری ها و به عنوان MIC وMBC بر روی سویه استاندارد و بالینی مؤثر بود و دو سویه از نظر MIC وMBC با هم تفاوتی نداشتند.

میانگین وزن خشک عصاره های الکلی و آبی به ترتیب 80 و 50 میلی گرم در میلی لیتربود که با توجه به این اوزان

رقت های مختلف عصاره ها به پارامتر های وزنی تبدیل شد. بر این اساس مقادیر 25، 12/5، 6/25، 3/12، 1/56، 0/780، 0/390 و 0/195میلی گرم از پودر خشک شده عصاره الکلی و مقادیر 40، 20، 10، 5، 2/5، 1/25، 0/625 و 0/312 میلی گرم ازپودر خشک شده عصاره آبی توزین و به چهار سری لوله حاوی 1 میلی لیتر محیط مولر - هینتون براث و5×10^5 باکتری ازسویه های استاندارد و بالینی اضافه گردید.

در تعیینMIC وMBC بر اساس وزن خشک عصاره الکلی مقادیر780µg/ml از پودر خشک شده عصاره به عنوانMIC و MBC برای هر دو سویه بدست آمد که نتایج مذکور دقیقاً مطابق و مؤید نتایج حاصل از سریال های رقتی بود (جدول2). میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر در رقت های مختلف عصاره الکلی نشان داد که با افزایش غلظت عصاره در چاهک ها هاله عدم رشد افزایش پیدا میکند و سویه استاندارد نسبت به سویه بالینی به صورت نامحسوس حساس تر میباشد (جدول4).

بین قطر هاله های عدم رشد در طی چهارماه آزمایش اختلاف معنی داری مشاهده نشد که بیانگر پایداری عصاره ها در دمای محیط و یخچال می باشد .

جهت حصول اطمینان از نتایج بدست آمده برای عصاره های آبی و الکلی، آزمایشات فوق برای هر سویه سه بار تکرار و داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه وتحلیل شد.

جدول شماره 1- نتایج حاصل از آنتی بیوگرام سویه های استاندارد و بالینی با برخی از آنتی بیوتیکهای رایج

آنتی بیوتیک (mg)	پنی سیلین	اگزاسیلین	سیپروفلواکساسین	تتراسیکلین	جنتامایسین	سفتی	آمیکاسین	سولفامتوکسازول-
	10	1	5	30	10	زوکسیم	30	تریمتوپریم
سویه						30		30/75
سویه استاندارد	R	R	S	IM	S	IM	S	S
سویه بالینی	R	R	S	IM	S	IM	S	S

R= مقاوم S= حساس IM= نیمه حساس

جدول شماره 2- مقایسه رشد سویه ها در مجاورت با غلظت های (mg/ml) مختلف عصاره الکلی

غلظت (mg/ml)	12/5	6 / 25	3/12	1/56	0/ 780	0/ 390	0/195
سویه					MIC&MBC		
سویه استاندارد	-	-	-	-	-	+	+
سویه بالینی	-	-	-	-	-	+	+

(-) عدم رشد باکتری (+) رشد باکتری

جدول شماره 3- مقایسه رشد سویه ها در مجاورت با غلظت های(mg/ml) مختلف عصاره آبی

غلظت (mg/ml)	40	20	10	5	2/5	1/25	0/625
سویه							
سویه استاندارد	-	-	-	-	-	-	-
سویه بالینی	-	-	-	-	-	-	-

(-) عدم رشد باکتری (+) رشد باکتری

جدول شماره 4- میانگین قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر در غلظت های مختلف عصاره الکلی

غلظت (mg/ml)	12/5	6 /25	3 /12	1/56	0/780	0/390	0/195
سویه							
سویه استاندارد	23	21	19	17	13	11	9
سویه بالینی	22	20	18	16	12	10	8

نتیجه گیری

گیاهان دارویی از دیرباز مورد استفاده قرار می گرفته اند .در دهه اخیر به دلیل بروز مقاومت های دارویی به این منابع به عنوان مخازن طبیعی توجه شده است. بسیاری از گیاهان به صورت خوراکی در جیره غذایی انسان ودام استفاده روزمره دارند و به صورت تجربی ثابت شده است که اثرات سوءندارند. میزان و نوع متابولیتهای موجود در اندام های مختلف گیاه بر حسب شرایط اکولوژیکی متفاوت است. بر این اساس ارزیابی مواد مؤثره گیاهان داروئی بر حسب مناطق جغرافیائی تحت کشت آنها ضروری به نظر می رسد که از جمله آنها گونه های آویشن است که تحت شرایط اقلیمی متفاوت مواد موثره آنها تغییر می کند (2).

درسال2002 مطالعات ان ساینگ و ار کی ساینگ[1] نشان دادکه اسانس گیاه آویشن بر روی انترو هموراژیک اشریشیا کلی اثر بازدارندگی دارد. از بین ترکیبات اسانس بکار رفته تیمول و کارواکرول به عنوان عوامل مؤثر نام برده شده است واین عوامل بر روی باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اثر دارند (15). در تحقیق ما نیز اثر عصاره الکلی حاوی مواد مؤثره آویشن بر روی انترو هموراژیک اشریشیا کلی به اثبات رسید. آنچه که از بررسی تحقیقات انجام شده در دست است عمدتاً مطالعاتی است که بر روی اسانس آویشن انجام گرفته اند اما در تحقیق حاضر اثرات عصاره الکلی وآبی مورد توجه قرار گرفت و نشان داده شد که مواد مؤثره تیمول وکارواکرول (روش TLC) در ترکیبات اصلی گونه آویشن شیرازی پرورش داده شده در باغ گیاه شناسی جهاد کشاورزی استان تهران نیز وجود دارد و می تواند به عنوان منبع دارویی مورد استفاده قرار گیرد. (شکل 1)

اگرچه کاربرد بالینی عصاره ها و اسانس های گیاهی در شرایط خاص امکان پذیر است اما به نظر می رسد کاربرد بالینی آویشن شیرازی مستلزم مطالعات وتحقیقات بیشتری در زمینه مکانیسم عمل این متابولیت ها بویژه درزمینه باز دارندگی عوامل میکروبی و بروز اشکال مقاوم باکتریایی (نتایج این بخش انتشار نیافته است) مطالعه گسترده تری انجام شود.

1. Singh N, Singh RK

References

1- جم زاد م. آویشن ، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران،1373 ، صص: 1 و 7-5

2- زرگری ع. گیاهان دارویی، جلد چهارم، انتشارات دانشگاه تهران، 1372، صص: 38-2

3- مومنی ت، نوبهار شاهرخی ن. اسانس های گیاهی و اثرات درمانی آنها، انتشارات دانشگاه تهران، 1370، صص: 12-8

4. Hornok L. Effect of environmental factors on the production of some essential oil plants. Horticultural Abstracts. 1997; 3075: 23-27
5. Deans SG, James CP, Ross ZM. Natural antioxidant from thymus vulgaris (thyme) volatile oil. Acta Horticulture. 1992; 322: 171-182
6. Armestrong GL, Hollingworth J, Morris JG. Emerging food born pathogens. Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of developed world. Epidemiol. Rev. 1996; 18: 29-51
7. Macrae M, Rebate T, Johnston M, Ogden D. The sensitivity of Escherichia O157 to some antimicrobials by conventional and conductance assays. Lett. Appl. Mirobiol. 1997; 25: 135-137
8. Marsh J, Macleod AF, Hanson MF, Emmanuel FXS, Frost Thomas AA. Restaurant-associated outbreak of E.coliO157 infection. Public. Health Med. 1992; 14: 78-83
9. Yamamura A, Murai A, Takamatsu H, Watabe K. Antimicrobial effect of chemical pereservative on E.coli O157:H7. J. Health sci. 2000; 46: 204-208

10- صمصام شریعت ه. عصاره گیری واستخراج مواد مؤثره گیاهان داروئی و روش های شناسایی و ارزشیابی آنها. چاپ اول. انتشارات مانی. 1371، صص: 8-20

11- خسروی آ، ملکان م ع. اثر عصاره الکلی و آبی لاواندولااستوکاس بر روی استافیلوکوکوس اورئوس وسایر باکتری های گرم منفی . مجله دانشگاه علوم پزشکی قزوین . 1382، شماره 29، صفحات 3-9

12. Baron E, Finegold S. Bailey & Scott's Diagnostic MICrobiology. 8th ed. Mosby Co. USA .1990: 171-194
13. Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 1999; 4: 567-582
14. Pothier J. Galand N, Ouali MEI, Viel Cs. Comparison of planar chromatographic method (TLC, OPLC, AMD) applied to essential oils of wild thyme and seven chemotypes of thyme. II Farmaco. 2001; 56: 501-511
15. Singh N, Singh RK. Efficant of inoculation and washing methods on the efficacy of different sanitizers against E.coli O157: H7 on lettce. Food microbiology. 2002; 19: 183-193