تأثير المستخلص الكحولي لنبات القرنفل Clove (*Eugenia caryophyllus*) في نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة

Effect of ethanolic extract of Clove (*Eugenia caryophyllus)* on growth of some types of pathogenic bacteria

هدى سهيل عبد
قسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات /جامعة بغداد

Huda Suhail Abid
Dept. of Biology/ College of Science for women/ University of Baghdad

المستخلص :

أجري البحث لدراسة تأثير المستخلص الكحولي للقرنفل Clove (*Eugenia caryophyllus*) في نمو بعض الانواع البكتيرية الممرضة وهي (*Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*) بأستخدام طريقة الانتشار بالاقراص ، وكذلك تحديد التركيز المثبط الادنى MIC ، والتركيز القاتل الادنى MBC للمستخلص ضد هذه الانواع البكتيرية . وقد أظهرت النتائج فعالية المستخلص الكحولي للقرنفل ضد نمو البكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* وكان التأثير يزداد بزيادة تركيز المستخلص ، حيث بلغت قيمة MIC للمستخلص ضدهما 2.0 و 4.0 ملغم/مل على التوالي . وقيمة MBC للمستخلص ضد *Staphylococcus aureus* 4.0 ملغم/مل ، في حين لم يتم تحديد قيمة MBC للمستخلص ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* وأظهرت البكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* مقاومة لتراكيز المستخلص الكحولي ولم يتم تحديد قيمة MIC و MBC للمستخلص ضد هذين النوعين .

Abstract

Effect of ethanolic extract of Clove (*Eugenia caryophyllus)* examined against (4) species of pathogenic bacteria *(،Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Salmonella typhimurium)* using: diffusion method, determination the minimum inhibitory concentration MIC, and minimum bactericidal concentration MBC. The results showed that Clove extract appeared high inhibitory effect on the growth of، ،*Staphylococcus aureus & Pseudomonas aeruginosa*, this inhibition increased with increasing the concentration. The MIC values were, 2.0, 4.0 mg/ml respectively, on the other hand, the MBC value against ،*Staphylococcus aureus* was 4.0 mg/ml. while the MBC value against *Pseudomonas aeruginosa* dose not effective. Further *Escherichia coli* & *Salmonella typhimurium* showed resistance to the activity of Clove extract.

المقدمة :

لقد أزدادت في الاونة الاخيرة ظاهرة انتشار الامراض المنقولة بالغذاء Food- borne diseases فجلبت اهتمام العديد من الباحثين والهيئات المهتمة بسلامة الغذاء Food safty والذين ركزوا على الممرضات المنقولة بالغذاء Food borne pathogens وطرق السيطرة عليها ، ومنها الانواع البكتيرية المستخدمة في هذه الدراسة (*Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli* ، *Salmonella typhimurium*) ، حيث انها اكثر الانواع انتشاراً ، والتي ثبت مسؤوليتها عن العديد من الامراض المنقولة للانسان عبر الاغذية المصنعة او المحضرة في مؤسسات مهمة كالمطاعم والمستشفيات والمدارس وحوانيت الجيش[1] ، أضافة الى اهميتها كمسبب للتسمم الغذائي [2] . وفي الوقت الحاضر قاد التقدم المتعلق بسلامة الغذاء الى استعمال مواد طبيعية كعوامل مضادة للمايكروبات للسيطرة على الممرضات المنقولة بالغذاء ، وتعتبر منتجات نباتات التوابل Spices Plants واحدة من أكثر هذه المنتجات الطبيعية أستعمالاً ، واصبحت تضاف الى الاغذية ليس لتحسين الطعم والرائحة فقط وانما لخواصها المضادة للمايكروبات والتي وثقت من قبل العديد من الباحثين [3 ، 4] . وهناك دراسات أثبتت ان المنتجات الطبيعية المستخلصة من النباتات مثل (الثوم ، البصل ، الدارسين ، الزعتر ، الزنجبيل) ثبطت نمو البكتريا المحمولة بالغذاء الموجبة والسالبة لصبغة غرام ، وبكتريا التعفن ، والخمائر والاعفان [5 ، 6] . وبذلك أصبح الميل الى أستخدام هذه المنتجات بديلاً عن المواد الكيميائية الحافظة Chemical Preservatives والتي أدى الاستعمال الواسع لها ولفترات طويلة الى ظهور سلالات بكتيرية مقاومة ، أضافة الى تأثيراتها الجانبية [2] . ان فعالية التوابل المضادة للمايكروبات قد تختلف بين السلالات التابعة لنفس النوع البكتيري ، او قد تختلف أعتماداً على شكل التوابل المضافة (طازجة ، مجففة ، او بشكل مستخلصات) وتختلف اعتماداً على موسم الحصاد ، او حسب اختلاف مصادرها الجغرافية ، أو حسب المادة الفعالة التي تحتويها ، فقد ثبت ان التوابل التي تحتوي زيوتاً طيارة تكون اكثر تأثيراً من تلك التي لاتحتويها [7 ، 8] .

يعتبر نبات القرنفل Clove من أنواع التوابل المهمة لامتلاكه فعالية مضادة للمايكروبات وهو عبارة عن البراعم الزهرية المجففة لنبات *Eugenia caryophyllus* من العائلة الآسية Myrtaceae ، والبراعم تكون بشكل مسامير صغيرة طولها 15- 12 ملم وقطرها 3 ملم ورائحتها عطرية تشبه رائحة الفلفل والقرفة معاً ، والطعم حار لاذع وتحتوي على زيت طيار بنسبة 20%-14 يتألف من خلات اليوجنول Eugenol acetate ويوجنول Eugenol بنسبة 90%- 70 وفانيلين Vanillin بالاضافة الى حامض جاللوتانيك Gallotannic acid ومادة متبلورة تدعى الكاريوفيلين Caryophyllen [9] . ويستعمل القرنفل كمادة عطرية في الطبخ ، الصناعات الغذائية ، صناعة الادوية ، صناعة العطور ومواد التجميل ، وقد استخدم لفترات طويلة في الطب الشعبي كمضاد للحمى ، مقوي للجنس ، فاتح للشهية ، مضاد للقيء ، مريح للعضلات ، مسكن لآلآم الاسنان ، مزيل للتقلص ، مضاد للالتهابات [10] .

ولقد كان الهدف من دراستنا هذه : -

1. تحديد فعالية المستخلص الكحولي لنبات القرنفل خارج الجسم الحي In Vitro ضد بعض أنواع البكتريا الممرضة (*Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli* ، *Salmonella typhimurium*) .
2. تحديد التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى للمستخلص ضد هذه الانواع البكتيرية الممرضة .

وذلك لدراسة أمكانية استعماله كبديل عن المواد الحافظة الكيمياوية في مجال صناعة وحفظ الاغذية ، أو حتى كبديل عن المضادات الحيوية في مجال صناعة الدواء .

المواد وطرائق العمل :

1. **الاوساط الزرعية المستخدمة وتشمل : -**

- وسط المرق المغذي Nutrient Broth (NB) : - وقد أستعمل لتنمية العزلات البكتيرية وتنشيطها .
- وسط الأكار المغذي Nutrient Agar (NA) : - وقد أستعمل لحفظ العزلات البكتيرية .
- وسط مرق مولر - هنتون Mueller- Hinton Broth (MHB) : - وقد أستعمل لتحديد التركيز المثبط الأدنى MIC للمستخلص النباتي ضد العزلات البكتيرية .
- وسط أكار مولر - هنتون Mueller- Hinton Ager (MHA) : - وقد أستعمل لدراسة فعالية المستخلص النباتي المضادة للبكتريا بطريقة الانتشار بالاقراص .

وقد حضرت كل الاوساط حسب تعليمات الشركات المجهزة وضبط الرقم الهدروجيني المناسب لها ، ثم عقمت جميع الاوساط بالمؤصدة Autoclave عند درجة حرارة 121 م وضغط 15 باوند/أنج^2 ولمدة 15 دقيقة [11] .

2. جمع العزلات البكتيرية

تم الحصول على العزلات البكتيرية من مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة ، حيث تم عزل الانواع البكتيرية من عينات مرضية، وشخصت من قبل مختبر الصحة المركزي .

3.تحضير المستخلص الكحولي

تم الحصول على البراعم الزهرية المجففة Flower buds لنبات القرنفل Clove (*Eugenia caryophyllus*) من الاسواق المحلية ، وقد تم تشخيصها حسب ماورد في [12] . وقد طحنت النماذج بواسطة طاحونة للحصول على مسحوق ناعم متجانس ، وحضر المستخلص الكحولي بأستخدام جهاز Soxhlet extractor ، حيث تم وزن 50 غم من مسحوق النبات الجاف وأضيف اليه 250 مل من الكحول الاثيلي 95% بنسبة 1:5 وزن/حجم ، وأستمرت عملية الاستخلاص لمدة 6 ساعات وبدرجة حرارة 70- 60 مْ ، ثم رشح المستخلص بأستخدام ورق الترشيح (Whatman No.1) ، وبعد الترشيح وزع المستخلص على أطباق ثم وضعت هذه الاطباق في الحاضنة بدرجة 37 مْ لتركيز المستخلص ، حفظ المستخلص في الثلاجة بدرجة 4 مْ لحين الاستخدام [13] .

وقد تم تحضير وتعقيم المستخلص الكحولي للقرنفل ، وذلك بأذابة 2 غم من المستخلص النباتي في 5 مل من مادة Dimethyl Sulfoxide (DMSO) وبذلك اصبح لدينا مستخلص بنسبة 400 ملغم/ مل كتركيز قياسي ، وقد تم تعقيم المزيج بطريقة البسترة بدرجة حرارة 62 م ولمدة 10 دقائق وبذلك تم الحصول على المركز القياسي للمستخلص الكحولي والمستخدم في تحضير التخافيف اللاحقة وهي (200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 ، 3.125) ملغم/ مل [14] .

4. تحضير العالق البكتيري

للحصول على العالق البكتيري بتركيز 1.5 × 10^8 خلية/ مل ، اختيرت 4 - 5 مستعمرات معزولة نامية على وسط الأكار المغذي (NA) ونقلت الى أنبوبة أختبار تحتوي على 10 مل من مرق مولر - هنتون (MHB) ، وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 5 - 6 ساعات لحين ظهور العكورة ، وقد تمت مقارنة هذه العكورة مع عالق قياسي هو أنبوبة ماكفرلاند Mcfarland tube 0.5 [15] .

3. دراسة تأثير المستخلص الكحولي للقرنفل Clove في نمو البكتريا

تم أختبار تأثير المستخلص الكحولي للقرنفل عى نمو الانواع البكتيرية بأستخدام الطرق الاتية : -

أختبار الحساسية بطريقة الانتشار بالاقراص . Antibacterial Sensitivity testing (Disc- diffusion method) و تحديد التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى . Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) & Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

1. طريقة الانتشار بالاقراص

أستخدمت طريقة [16] حيث حضرت اقراص من ورق الترشيح (Whatman No.1) بقطر 6 ملم ، وبعد تعقيمها شبعت بالتراكيز 50 ، 100 ، 200 ، 400 ملغم / مل من المستخلص النباتي ، غمرت مسحة قطنية معقمة Sterile cotton swab بالعالق البكتيري بتركيز 1.5 × 10^8 خلية / مل ، وزرعت على وسط أكار مولر - هنتون (MHA) بالتخطيط بثلاثة اتجاهات للحصول على نمو متجانس ، ترك الطبق لمدة 15 دقيقة ليجف ، ثم اضيفت الاقراص المشبعة بالتراكيز المختلفة بأستعمال ملقط معقم وثبتت على سطح الوسط بالضغط الخفيف عليها ، وقد استخدمت اقراص مشبعة بالمذيب المستخدم في تحضير التراكيز وهو DMSO بتركيز 10% كسيطرة سالبة ، وقد تم عمل 3 مكررات لكل تركيز . حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة . وسجلت النتائج بقياس قطر منطقة التثبيط (Inhibition Zone) حول كل قرص .

2. تحديد التركيز المثبط الادنى والتركيز القاتل الادنى

أستخدمت طريقة التخفيف بالانابيب لتحديد MIC لمستخلص القرنفل ضد الانواع البكتيرية . اذ تم تحضير تخافيف نصفية متسلسلة من التركيز القياسي 400 ملغم / مل وبالتراكيز التالية : -

400 ، 200 ، 100 ، 50 ، 25 ، 12.5 ، 6.25 ، 3.125 ملغم / مل وبأستخدام وسط مرق مولر - هنتون MHB .

أضيف 0.1 مل من المستخلص الكحولي للقرنفل وبالتراكيز المختلفة المحضرة اعلاه الى انابيب تحتوي 9.8 مل من مرق مولر - هنتون MHB , ثم لقحت هذه الانابيب بـ 0.1 مل من العالق البكتيري بتركيز1.5× 10^8 خلية / مل ،

وبذلك اصبح تخفيف المستخلص الكحولي(4.0 ، 2.0 ، 1.0 ، 0.5 ، 0.25 ، 0.125 ، 0.0625 ، 0.03125) ملغم / مل . حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة وتمت مقارنة النتائج مع نتائج انبوب السيطرة القياسية التي تتكون من[9.8 مل من وسط MHB + 0.1 مل من العالق البكتيري + 0.1 مل من المذيب المستخدم DMSO [14] . وتم تحديد التركيز المثبط الادنى MIC على أنه اقل تركيز من المستخلص النباتي الذي يمنع نمو البكتريا بالمقارنة مع السيطرة . اما لتحديد التركيز القاتل الادنى MBC فقد تم بأخذ 0.1 مل من الانابيب خالية العكورة وزرعها على سطح أكار مولر - هنتون MHA بطريقة النشر ثم حضنت الاطباق بدرجة حرارة 37 مْ ولمدة 24 ساعة . وحددت قيمة MBC على أنه اقل تركيز من المستخلص الذي يقلل عدد المستعمرات النامية بمقدار 99.9% من المزروع الاصلي [14] .

4. التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم تحليل نتائج دراسة الفعالية المضادة للمستخلص ضد العزلات البكتيرية بواسطة البرنامج الاحصائي (SAS) Statistical Analysis System [17] ، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات بأختبار اقل فرق معنوي Least Significant difference (LSD) وتحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$) .

النتائج والمناقشة :

أختبر تأثير المستخلص الكحولي للقرنفل على نمو 4 انواع بكتيرية ممرضة مختلفة موجبة وسالبة لصبغة غرام ومن مصادر مجهولة (*Staphylococcus aureus* ، *Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*) . بينت نتائج التحليل الاحصائي الموضحة في جدول (1) وجود فروق معنوية بين تراكيز المستخلص الكحولي للقرنفل والانواع البكتيرية الممرضة تحت مستوى احتمالية ($P < 0.05$) .

أشارت النتائج الى أن المستخلص الكحولي كان فعالاً ضد نمو بكتريا *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aeruginosa* ، حيث تراوح قطرمنطقة التثبيط بين (12.15 ± 0.05 و 28.00 ± 0.00) ملم و (11.00 ± 0.10 و 22.75 ± 0.35) ملم على التوالي وبالاعتماد على تركيز المستخلص ، أذ تناسب تأثير المستخلص تناسباً طردياً مع التركيز ، وقد يعزى هذا الى زيادة تركيز المواد الفعالة في المستخلص بزيادة تركيزه .

كما يشير جدول (1) الى أن المستخلص الكحولي للقرنفل لم يظهر فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* حتى مع زيادة تركيز المستخلص ، وكان قطر مناطق التثبيط لهما عند التركيز 400 ملغم/مل هو(9.15 ± 0.05) و (12.2 ± 0.10) ملم على التوالي.

يتضح من النتائج ان البكتريا الموجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus*) كانت اكثر حساسية للمستخلص الكحولي للقرنفل من البكتريا السالبة لصبغة غرام (*Pseudomonas aeruginosa* ، *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*). وهو مطابق لما هو معروف من ان معظم النباتات الطبية والتوابل تكون اكثر فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام منها ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام [18] ، وقد يعود السبب في ذلك الى التركيب البنائي للجدار الخلوي ، اذ تفتقد البكتريا الموجبة لصبغة غرام الى طبقة من الاغشية الخارجية تجعل من نفاذية المواد الداخلة الى الخلية اكبر مقارنة بالبكتريا السالبة لصبغة غرام [19] ، والتي يمتلك جدارها الداخلي حاجزاً داخلياً يتمثل بمتعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharide المشترك مع بروتينات متعددة له القابلية على منع مرور الكثير من المواد الضارة الى داخل الخلية [20] .

جدول (1) : الفعالية المضادة للبكتريا للمستخلص الكحولي للقرنفل ضد بعض الأنواع البكتيرية الممرضة

تركيز المستخلص ملغم/مل / الأنواع البكتيرية	0.0	50	100	200	400
Staphylococcus aureus	*6.00 ±0.00	12.15±0.05	17.05±0.15	23.00±0.10	28.00±0.00
Pseudomonas aeruginosa	6.00 ±0.00	11.00±0.10	15.00±0.00	19.20± 0.10	22.75± 0.35
Escherichia coli	6.00 ±0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00± 0.00	9.15 ± 0.05
Salmonella typhimurium	6.00 ±0.00	0.00± 0.00	0.00± 0.00	0.00± 0.00	12..20± 0.10

قيم أ . ف . م (LSD) : -
الأنواع البكتيرية : 3.341 تراكيز المستخلص : 4.662 ، الأنواع البكتيرية × تراكيز المستخلص : 8.059
مستوى الأحتمالية ($p < 0.05$) كل متوسط في الجدول هو معدل ثلاث مكررات
(*) يمثل الرقم (6) قطر القرص المستخدم والمشبع بالمذيب (DMSO) فقط (السيطرة السالبة) .

جدول (2) : التركيز المثبط الادنى (MIC) ، والتركيز القاتل الادنى (MBC) للمستخلص الكحولي للقرنفل ضد بعض الأنواع البكتيرية الممرضة

الأنواع البكتيرية	MIC (mg/ml)	MBC (mg /ml)
Staphylococcus aureus	2.0	4.0
Pseudomonas aeruginosa	4.0	–
Escherichia coli	–	–
Salmonella typhimurium	–	–

(–) تعني لم يتم تحديد قيمة (MIC) أو (MBC) للمستخلص .

أن تأثير المستخلص الكحولي لنبات القرنفل على نمو هذه الانواع المختلفة من البكتريا يعود الى احتوائه على عدد من المواد الفعالة ، وربما يكون أحدها هو اليوجنول Eugenol حيث معروفاً ان هذا المركب موجود بنسبة عالية في زيت البراعم الزهرية لهذا النبات (90% -70) اضافة الى كونه مضاد مايكروبي واسع المدى ، اضافة الى احتوائه مواد اخرى قد تكون هي السبب في فعاليته المايكروبية ومنها Caryophyllene , Humulen , Ylangen , Vanillin , Cavychol , Benzaldehyd , Benzyl alcohol , metoxy benzaldehyde , Eugenyle acetate , [21] . علماً ان تأثير المستخلصات النباتية على البكتريا يتم بألية مماثلة لعمل العقاقير المضادة للبكتريا ، أذ تعمل على تثبيط تصنيع الجدار الخلوي للبكتريا ، او تثبيط تصنيع البروتين والاحماض النووية التي تحتاجها الخلية بصورة اساسية ، او تثبيط تصنيع الغشاء البلازمي [22] . اما نتائج التحري عن قيم MIC و MBC للمستخلص ضد الانواع المختلفة من البكتريا والملخصة في الجدول (2)فتشير الى ان اعلى تثبيط كان ضد البكتريا *Staphylococcus aureus* عند التركيز 2.0 ملغم /مل ، واقل تثبيط كان ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* عند التركيز 4.0 ملغم /مل . في حين لم يتم تحديد قيم MIC للمستخلص الكحولي ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* وهي نتيجة تؤكد النتائج السابقة لاختبار الحساسية بطريقة الانتشار بالاقراص الذي أظهر مقاومة هاتين العزلتين للمستخلص الكحولي للقرنفل . اما قيمة MBC للمستخلص ضد بكتريا *Staphylococcus aureus* فكانت 4.0 ملغم / مل ، في حين لم تحدد هذه القيمة ضد بكتريا *Pseudomonas aeruginosa* ، وربما يعزى السبب في هذا كونها لم تكن ضمن تراكيز المستخلص المحضرة ، وكذلك لم يتم تحديد قيم MBC للمستخلص ضد بكتريا *Escherichia coli* و*Salmonella typhimurium* مما يدل على مقاومتها لتراكيز المستخلص المستخدمة ، وربما تحتاج الى تراكيز اعلى ليحصل التثبيط والقتل . لقد كانت نتائج دراستنا مطابقة لما ذكره [23] الذي بين ان مستخلص القرنفل الكحولي والمائي كان اكثر تأثيراً على البكتريا الموجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus*

aureus) ، ومقاومة *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* لتأثير المستخلص . وكذلك مطابقة لما ذكره [24] الذي أكد عدم تأثر *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* بمستخلص القرنفل الكحولي . في حين كانت نتائجنا مخالفة لما ذكره [25] الذي بين وجود تأثير للمستخلص الكحولي ضد بكتريا *Escherichia coli* و *Salmonella typhimurium* . قد يعزى سبب الاختلاف في النتائج الى الاختلاف في طريقة تحضير المستخلص الكحولي او الاختلاف في مصدر العزلات او الاختلاف في تراكيز المستخلص [25] . ان هذه الدراسة أظهرت أن المستخلص الكحولي للقرنفل له فعالية ضد البكتريا الموجبة لصبغة غرام (*Staphylococcus aureus*) اكثر منه ضد البكتريا السالبة لصبغة غرام (*Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhimurium* ,) والتي ربما تحتاج الى تراكيز اكبر من المستخلص ، وبالتالي فأنه في حال التوصية بأستعمال هذا المستخلص كمضاف غذائي فأننا سنواجه القيود التي تفرض على استعمال التوابل كمضافات غذائية واهمها : -

1. الطعم غير المقبول والناتج من اضافة التوابل بكميات كبيرة مما يقلل من رغبة المستهلكين لهذه المنتجات الغذائية
2. الفعالية المضادة للبكتريا تقل عند أضافة التوابل الى مواد غذائية تحتوي البروتين والكاربوهيدرات والدهون [23] وبالتالي فأن استعمال التوابل مع مضافات اخرى كالحامض ، الملح، السكر ، اضافة الى توفير ظروف تصنيع وتخزين ملائمة قد يساعد في السيطرة على المايكروبات في المنتجات الغذائية [23].

المصادر

1. Wallace, D.J., van Gilder, T., Shallow, S., Segler, S. D., Smith, K.E, Shiferaw, B., Etzel, R., Garthright, W.E., Angulo, F.J. and Group, F.W. 2000. Incidence of food borne illness Reported by the food borne diseases Active Surveillance Network (food net)- 1997, J. food. Prot. 63: 807- 809.
2. المصلح ، رشيد محجوب . حسين ، بهاء الدين . 1990. الاحياء المجهرية في الاغذية . مطابع التعليم العالي ، الموصل ، العراق ، 560 صفحة .
3. Shelef, L.A. 1983. Antimicrobial effects of spices. J. food safty. 6: 29- 44.
4. Nevas, M., .Korhonen, A. R., Lindtrom, M., Turkki, P. and Korkeala, H. 2004. Antibacterial efficiency of finnish spices essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. J. Food prot. 67:199- 202.
5. Snyder, O.P. 1997. Antimicrobial effects of spices and herbs. Hospitality Institute of Technology and Management. St. Paul, Minnaesota.
6. http:www.hitm.com/com/Documents/spices.html.
7. Paster, N., Menasherov, M., Ravid, V. and Juven, B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumingants against fungi attacking. 9 Stored grain. J. food. Prot. 58:81- 85.
8. Arras, G., Grella, G. E. 1992. Wild thyme, *Thymus capitatus*, essential oil seasonal changes and antimyotic activity. J. Horticultural Sci. 67:197-202.
9. Cervenka, L., Peskova, I., Foltynova, E., Pejchalove, M., Brozkova, I. and Vytrasova, J. 2006. Inhibitory effect of some spices and herbs extracts against *Acrobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. akirrowii*. Current microbial. 53: 435-439.
10. حجاوي ، غسان. المسيمي ، حياة والساكت ، رولا . 1997 . علم العقاقير والنباتات الطبيعية ، الطبعة الثانية ، دار الثقافة ، عمان – الاردن .
11. Pamuk, HA. 1998. Sifali Bitkiler Ansiklopedisi (Encyclopedia of Herbal medicine). Istanbul- Turkey. Pamuk press.
12. Atlas, R. M., Brown, A. E. and Parks, L. C. 1995. Laboratory Manual of Experimental Microbiology. Mosbey company- yearbook, Inc., St. Louis: 563 pp.

13. Food and Agriculture Organization (FAO). 1988. FAO Production year book, Vo. 52, Rome, Italy.

14. الالوسي ، ثائر عبد القادر صالح . 2005 . تأثير بعض المستخلصات النباتية على الاطوار اليرقية لبعوض *Culex quinquefasciatus* (Diptera : culicidae) ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم ، جامعة الانبار .

15. النعمان ، اديبة يونس شريف حمو. 1998 . التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وأيض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة غرام ، أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة الموصل .

16. Jorgensen, J. H., Turnide, J. D. and Washington, J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murry, P. R., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Baron, E. J., Yolken, R. H., edi- tors. Manual of clinical Microbiology, 7th ed. Whashington DC, ASM press. 1526- 1543.

17. Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. and Turck, M. 1966. Antibiotic Sensitivity testing by a standarized single disk method. Am. J. clin. Path. 45:493--496.

18. SAS. 2004. SAS STAT Users Guide for personal computers. Release 6.12. SAS. Inst. Inc. Cary. N. C. USA.

19. Smith- Palmer, A., Stewart, J. and Fvee, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food borne pathogens. Lett. APP. Microbiol. 26:118-112.

20. Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, 1M. A., Tenover, F. C. and Yolke, R. H. 1999.

21. Manual of clinical Microb. 7th ed. Washington: ASM. P. 1527- 39.

22. Chao, S. C., Young, D. G. and Oberg, C. J. 2000. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. J. Essent. Oil Res. 12:639649.

23. Bullarman, L. B., Lieu, F. Y. and Seier, S. A. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production of cinnamon and clove oils: Cinnamic aldehyde and eugenol. J. food Sci. 42:1107-1109.

24. Laurance, D.R., Bennett, PX and Brown, M.J. 1997. Clinical pharmacology. 8thed. Churchill living stone. London. 250- 260.

25. H.oque, Md. M.Bari, M. L. Juneja,V. K. and Kawamoto, S. 2008. Antimicrobial activity of Cloves and Cinnamon extracts against food born Pathogens and Spoilage bacteria, and inactivation, of *Listeria monoctogenes* in Ground chicken meat with their essential oils. Rep. Nat' 1. food Res. Inst. 72:9-21.

26. Thakar, M.2004. Pharmacological screening of some medical plants as antimicrobial and feed additives. M. S. thesis. Blacksburg University, Virginia USA.

27. Nanasmobat, S., Lohasupthawee, P. 2005. Antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other enterobacteria. KMITL Sci. Tech. J. 5: 527-538.