دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال دوم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۲

شناسایی اجزای متشکله روغن‌های اسانسی و فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*.)

عباسعلی دهپور جویباری *

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قائمشهر، گروه زیست شناسی، مرکز تحقیقات سلولی- مولکولی، قائمشهر، ایران

چکیده

گیاه آنغوزه (*Ferula assafoetida*)از خانواده‌ی Umbelliferae می‌باشد جنس *Ferula* دارای گونه‌های مختلفی می‌باشد. در طب سنتی از این گیاه برای اثرات ضد التهابی استفاده می‌شود. در این تحقیق به شناسایی کمی و کیفی اسانس گونه *Ferula assafoetida* L. که در منطقه ارتفاعات شمالی سمنان پراکنش دارد و همچنین اثرات ضد میکروبی عصاره اتانولی را مورد بررسی قرار دادیم. جمع آوری گیاه از مرز استان سمنان و مازندران در سال ۱۳۹۴ صورت گرفت، از گل و برگ به روش تقطیر با آب، اسانس گیری انجام شد. نمونه های اسانس توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی(GC) و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ترکیبات عمده در اسانس سرشاخه‌های گل دار عبارتند از: تری اتیل آرسین ۸/۷٪، ۲ -متیل -۵-(۱- متیل اتیل) فنل ۱۸/۲٪،متوکسی -۶- پروفنیل بنزودیوکسل ۴/۴٪، اکتا هیدرو تترا متیل سیکلو پروپانفتالن ۶/۶٪، بیسا بولول ۱۰/۴٪ و استات فنچیل ۴/۷٪ می‌باشد. مطالعه‌ی اثرات ضدمیکروبی عصاره های اتانولی بر روی ۵ سوش باکتری که شامل باکتری‌های *Enterobacter cloacae* /*Staphylococus aureus* | *Klebsiella pneumoniae* | *Proteus mirabilis* و *Bacillus subtilis* بود، با روش انتشار دیسک و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین تاثیر عصاره اتانولی بر علیه باکتریای در استافیلوکوک با قطر هاله عدم رشد ۱۱ میلی‌متر می باشد. یافته‌های مطالعه در زمینه‌ی تاثیر متقابل گیاهان بر میکروارگانیسم‌های مضر ما را در دستیابی به جایگزین نمودن روش‌های مناسب‌تر و طبیعی‌تری در درمان بیماری‌های باکتریایی یاری می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *ضد میکروبی، اسانس، عصاره اتانلی، GC/MS، Ferula assafoetida* L.

مقدمه

آنغوزه با نام علمی *Ferula assafoetida* L. از گیاهان دارویی مهم تیره چتریان (Apiaceae) است. آنغوزه به عنوان چاشنی غذا مورد استفاده می‌باشد. (مظفریان ۱۳۸۳) این گیاه علفی مونو کارپیک و چند ساله می‌باشد (Singh Puri,. 2003)؛ در حالیکه، ارتفاع آن به ۳-۲ متر با برگ‌های منقسم دندانه دار یا

* **مسئول مکاتبات:** dehpour @ gmail.com

لوبدار مرکب ٤-۲ تایی، ساقه آغوش و عموما گوشتدار می‌باشد. گل‌های زرد رنگ چتر مرکب بزرگ انتهایی می‌باشد (Daniel., 2006). این گیاه بومی ایران است. گیاه دارویی آنغوزه تاثیرات مهمی در عملکرد سیستم هضم دارد و گزارش می شود که برای تنفس، ترشحات، نفخ شکم و باد معده مفید می‌باشد (Bown., 1995., Chevallier., 1996). صمغ رزینی حاصل از ریشه ضد انگل می‌باشد. آنغوزه ضد تشنج، خلط آور واشتها آور است (Chiej,. 1984., Duke and Ayensu., 1985). بذرهای *assafoetida* دوره ی خواب طولانی دارند. بذر روی گیاه مادری جوانه نمی زنند و آنها به قدر کافی زمان جهت پراکنش دارند (Baskin et al., 1995). این ویژگی خیلی مفید است. اغلب بذرهای کشت شده و گیاهان درختی خوابشان را قبل یا مدت کوتاهی از دست می‌دهند پس از اینکه آنها از گیاه مادری جدا شدند؛ اما، برخلاف آن اکثر گیاهان وحشی دوره‌ی خواب طولانی دارند (Bryant., 1996).

شمار زیادی ازگیاهان به دلیل فعا لیت‌های ضد میکروبی جهت درمان برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. درحال حاضرتخمین زده می‌شود که حدود ۸۰ درصد ازجمعیت دنیا به تاثیر درمانی ترکیبات گیاهی اعتقاد دارند (Dulger., 2004) باکتری‌های مورد آزمون از باکتری‌هایی هستند که معمولا باعث آلودگِی وفساد موادغذایی می‌شوند ومسمومیت غذایی ایجاد می‌کنند. پاتوژن های غذایی نامبرده به طوروسیعی درطبیعت وجود دارند و باعث مرگ و میر قابل توجهی در جوامع بشری می‌شوند. در مطالعات بسیار زیادی اثر ضد میکروبی ادویه‌ها و گیاهان دارویی با آنتی‌بیوتیک‌ها مورد مقایسه قرار گرفته است. از زمان معرفی آنتی بیوتیک‌ها به جامعه دارویی سویه‌های مقاوم افزایش روزافزون داشته‌اند و این مطلب به شکل معضلی بزرگ دردرمان بیماری ها درآمده است. این امر باعث گردیده است که دانشمندان به‌طورجدی و مستمر در پی یافتن ترکیبات دارویی باشند تا براین پدیده غلبه پیدا کنند. از این رو ضرورت بررسی فعالیت ضدمیکروبی ادویه‌ها احساس می‌شود تا با اثبات اثرات ضد میکروبی این ترکیبات گیاهی جایگزین مناسبی برای ترکیبات شیمیایی بیابیم.

بسیاری از اسانس‌های گیاهی دارای اثر بازدارندگی قابل توجهی برمیکروارگانیزم‌های عامل آلودگی در مواد غذایی هستند (Burt, 2004;. Marilena et al., 2001) بنابراین با توجه به مقاومت روز افزونی که باکتری‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مشتق از میکروارگانیسم‌ها از خود نشان می‌دهند، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی موجود در گیاهان نیز بعنوان ترکیب‌های طبیعی که اثرهای کشندگی و بازدارندگی بر عوامل بیماریزا دارند، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است.از آنجا یی که برخی از گیاهان با اثر ضد میکروبی در فارماکوپه کشور ثبت شده اند، از اسانس فرولا (*Ferula assa-foetida* L.) هم می‌توان برای مقابله با برخی میکروبهای بیماری زای خاص استفاده کرد و جایگزین بی ضرر برای بعضی آنتی بیوتیک‌ها پیدا نمود.

مواد و روش‌ها

شناسایی و جمع‌آوری گیاه

اندام‌های هوایی گیاه آنغوزه *Ferula assafoetida* در مرحله کامل گلدهی در خرداد ماه ۱۳۹٤ از منطقه

شهمیرزاد مرز بین استان مازندران و سمنان جمع-آوری گردید، پس از خشک کردن گیاه در سایه و خرد کردن آن به قطعات کوچک از اندام هوایی گیاه به روش تقطیر با آب به مدت ۳ ساعت با دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) اسانس‌گیری به عمل آمد وپس از جدا سازی اسانس از سطح آب توسط سولفات سدیم آبگیری شد وسپس به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) تزریق شد و طیف‌های جرمی و کروماتوگرام‌های مربوطه بدست آمد.

مشخصات دستگاه کروماتوگراف گازی (GC)

در این تحقیق از گاز کروماتوگراف مدل Agilent- 6890 مجهز به ستون DB-5 طول ٤٠ متر، قطر داخلی ۰/۱۸ میلی متر که ضخامت لایه فاز ساکن در آن ۰/۲۵ میکرومتر می‌باشد استفاده شد برنامه حرارتی ستون از ٦٠تا ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه تنظیم شد دمای محفظه تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای دتکتور مورد استفاده (FID)۲۷۰درجه سانتی‌گراد تنظیم شد واز گاز هلیم به عنوان گاز حامل استفاده شد

مشخصات وبرنامه دمایی دستگاه کروماتوگراف گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) عصاره-گیری از اندام هوایی گیاه با استفاده از جهت آنالیز و شناسایی ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی استفاده شد. شرایط آنالیز مشخصات دستگاه GC/MS به صورت زیر بود ستون موبینه DB5 – MS به طول ٤٠ متر قطر داخلی ۰/۱۸ میلی متر ضخامت لایه ۰/۱۸ میکرومتر بکار رفت.

برنامه حرارتی آون ۵ دقیقه در ٦٠ درجه سانتی-گراد با شیب ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و سپس ۱۰ دقیقه در ۲۷۵ درجه سانتی‌گراد بود. دمای محل تزریق ۲۸۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد گازحامل هلیم وسرعت حرکت آن ۰/۹ میلی متر بر دقیقه بود نسبت شکافت ۱به ٤۳ ومقدار تزریق ۰/۱میکرو لیتر از نمونه بود دمای منبع یونیزاسیون ۲۳۰ درجه سانتی گراد،مد یونیزاسیون EI و انرژی یونیزاسیون ۷۰eV بود. سری آلکان‌های نرمال C۲۸-۸–C- نیز تحت شرایط یکسان با تزریق اسانس، برای محاسبه اندیس بازداری (RI) اجزاء اسانس به دستگاه تزریق شد. اندیس بازداری اجزاء نمونه با استفاده از برنامه رایانه‌ای محاسبه شد در نهایت اجزاء اسانس با استفاده ازمقایسه طیف‌های جرمی بدست آمده با طیفهای جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک Wiley 2000 موجود در نرم‌افزار Labsolution دستگاه GC/MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد بر اساس سری آلکان‌های C۲۸-۸–C- و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع (کتابخانه دستگاه) شدند (Adams, 1995, 2001; Davies, 1990; Shibamoto, 1987).

عصاره‌گیری:

جهت استخراج عصاره اتانولی از اتانول ۷۰ در جه و روش پرکولاسیون استفاده شد و حلال اتانول با استفاده از روتاری و با روش تقطیر در خلا خارج گردید.این عصاره به عنوان عصاره خالص درنظر گرفته شد وبا استفاده ازدی متیل سولفوکسید ۱۰ ٪ آن را رقیق کرده به طوریکه بر روی هر دیسک میزان ۲۰۰ لاندا عصاره ریخته تا کاملا دیسک به عصاره

آغشته شود. پس ازتهیه عصاره‌ها جهت تعیین اثر ضدباکتریایی آنها از روش انتشار دیسک استفاده می‌شود.

روش انتشار دیسک (Disk diffusion)

در این روش دیسک‌های بلانک استریل در عصاره‌های مورد نظر قرار داده شد تا عصاره‌ها کاملا جذب دیسک‌ها شود ۵ دقیقه سپس این دیسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده شد تا خشک شود.

ازکشت ۲٤ ساعته هر یک از ۵ باکتری (*Staphylococus aureus* PTCC=1112) (*Enterobacter cloacae* PTCC=1003) *Proteus mirabilis* (PTCC=1290) *Klebsiella pneumoniae* (PTCC=1076) *Bacillus subtilis* (PTCC=1023)که از مراکز تحقیقات و پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه شده است) آماده شده سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه و به وسیله سواپ برسطح محیطکشت مولرهینتون آگار کشت یکنواختی تهیه کردیم. دیسک‌های حاوی عصاره را برسطح آگار قرارداده، پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. با اندازه‌گیری قطرهاله عدم رشد دراطراف دیسک‌ها حساسیت یا مقاومت باکتری‌های مورد نظربه عصاره-ها تعیین شدند .به این ترتیب که اگر قطرهاله عدم رشد مساوی و بیش از ۱۲ میلی‌متر باشد باکتری مورد نظر حساس در نظر گرفته می‌شود.

نتایج

ترکیب‌های شیمیایی شناسایی شده در اسانس ودرصد کمی ترکیب‌ها در جدول شماره ۱ آورده شده است. از مجموع ۲۱ ترکیب اصلی شناسایی شده در اسانس این گیاه که بیش از ۸۰ درصد از کل اسانس را شامل می‌شود. ترکیبات عمده در اسانس شامل تری اتیل آرسین ۸/۷٪، ۲- متیل -۵- (۱- متیل اتیل) فنل ۱۸/۲٪، متوکسی-٦- پروفنیل بنزودیوکسل ٤/٤٪، اکتا هیدرو تترا متیل سیکلو پروپانفتالن ٦/٦٪، بیسا بولول ۱۰/٤٪ و استات فنچیل ٤/۷٪ می‌باشد که بالاترین درصد اسانس را تشکیل می‌دهند.

جدول ۱: ترکیب‌های شیمیایی شناسایی شده در اسانس ودرصد کمی ترکیب‌ها

شماره ردیف	اندیس کوارتز K.I	نام ترکیب	درصد (%)
۱	1175	2-(Bromomethyl)trimethylcyclohexene	1.7
۲	1379	Arsine triethyl	8.7
۳	1465	Fenchyl acetate	4.7
٤	1640	Phenol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)	2.0
۵	1663	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)	18.2
٦	1802	Camphene	1.2
۷	1847	Spiro[5.5]undec-2-ene,trimethyl-methylene-	1.9
۸	1969	Albicanol	2.5
۹	1876	b.-Bisabolene	1.3

شماره ردیف	اندیس کوارتز K.I	نام ترکیب	درصد (%)
۱۰	1897	Benzodioxole, methoxy-6-(propenyl)	4.4
۱۱	1914	Trans-.©.- bisabolene	2.3
۱۲	1925	Cis-_.- bisabolene	1.5
۱۳	2021	Guaiol	1.7
۱٤	2038	2-naphthalenemethanol -octahydro-. tetramethyl	1.3
۱۵	2072	Cyclopropa[a]naphthalene-octahydro-tetramethyl	6.6
۱٦	2101	Naphthalene,octahydro-dimethyl-7-(1-methylethenyl)	1.6
۱۷	2123	Neoisolongifolene	2.2
۱۸	2145	Naphthalene, octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-,	2.4
۱۹	2206	Gurjunene	2.3
۲۰	2215	Azulene, octahydr1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)	3.0
۲۱	2242	Bisabolol	10.4

عصاره اتانولی این گیاه قادربوده است همه باکتری‌های موردآزمون رادرروش انتشار دیسک تا اندازه‌ای تحت تاثیر قرار دهد بطوریکه اثرضد باکتریایی عصاره متانولی بر سوش‌های باکتریایی *Staphylococcus aureus* (۱۱ میلی‌متر)، *Enterobacter cloacae* (۸ میلی‌متر) *Klebsiella pneumoniae* (۸ میلی‌متر) *Proteus mirabilis* (۹ میلی‌متر) و *Bacillus subtilis* (۸ میلی‌متر) می‌باشد (جدول ۲). همچنین استافیلوکوکوس اورئوس و پروتئوس میرابلیس به ترتیب با قطرهای هاله عدم رشد ۱۱ و ۹ میلی‌متر حساس‌ترین باکتری‌های مورد آزمون نسبت به عصاره متانولی بودند .حلال عصاره به تنهایی فاقد هر گونه اثرات ضدمیکروبی در این بررسی بودند. و بر طبق جدول شماره -۲ اثرات ضد میکروبی عصاره آنغوزه به مراتب قوی‌تر از آنتی-بیوتیک آمپی سیلین می‌باشد.

جدول ۲ : نتایج اثر ضد میکروبی عصاره متانولی گیاه *Ferula assafoetida*

قطر هاله‌ها (mm)	*Proteus mirabilis* OXK PTCC(1076)	*Bacillus subtillis* PTCC(1023)	*Staphylococcus aureus* PTCC(1112)	*Kelebsilla penumonae* PTCC(1290)	*Enterobacter cloacae* PTCC(1003)
قطر هاله عصاره	۹	۸	۱۱	۸	۸
قطر هاله آنتی بیوتیک سفالکسین	۱۱	٤۵	۳۱	۱۱	۱۵
قطر هاله آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین	N.A	۹	N.A	۷	N.A
قطر هاله آنتی بیوتیک کلرامفنیکل	۲۹	۳۲	۲۲	۲۹	۲٦
قطر هاله حلال(شاهد)	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A

قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر n.a=non activity

بحث

تعداد ترکیبات اصلی شناسایی شده در اسانس گیاه۲۱ ترکیب می‌باشد که پنج ترکیب بیش با میزان ٤٥٪ از مهمترین اجزای تشکیل دهنده اسانس گیاه آنغوزه می باشد.و عصاره اتانولی دارای اثرات ضد میکروبی (۸-۱۱ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) به نسبت ضعیف تر با آنتی بیوتیک‌های رایج (۱۱-٤٥ میلی‌متر قطر هاله عدم رشد) می باشد. این نتایج همسو با گزارش‌های Abedi و همکاران (۲۰۰۸) مبنی بر اینکه، مهمترین ترکیبات اسانس‌های روغنی گیاه *Ferula gumosa* سابینن، آلفا پینن، و بتا پینن گزارش نمودند و همچنین اسانس‌های روغنی گیاه دارای اثرات مهاری در باکتری اشریشیاکولی، سالمونلا و لیستریا می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی حساس تر بودند که مطابق با نتایج حاصل از یافته‌های ما بود. نتایج ما همسو با گزارشات Rahman و همکاران در سال ۲۰۰۸ می‌باشد، که روغن‌های اسانسی گیاه *Ferula assafoetida* برروی برخی از باکتری‌های گرم مثبت (باسیلوس، لاکتوباسیل، میکروکوکوس، استافیلوکوکوس و ویریو) و باکتری‌های گرم منفی (اکولا، سالمونلا و شیگلا) دارای اثرات مهاری رشد بودند. بر طبق گزارشات Ghasemi وهمکاران در سال ۲۰۰۵ مهمترین ترکیبات اسانس دانه‌های *Ferula gumosa* را آلفا پینن، بتا پینن و میرسن بود که دارای خواص ضد میکروبی بر باکتری‌های گرم منفی نظیر اکولی، سالمونلا و پزودوموناس و باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوک و باسیلوس داشت که همسو با نتایج حاصل از یافته‌های ما می‌باشد. با توجه به این که در نتایج حاصل از یافته‌های ما عصاره هیدروالکلی عصاره گیاه *Ferula assafoetida* بر روی باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اثرات مهاری رشد بود همسو با گزارشات Kunwar و همکاران در سال ۲۰۱۰ می-باشد که اسانس حاصل از این گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی می‌باشد. Hilan و همکاران در سال ۲۰۰۷ در بررسی‌های اسانس روغنی گیاه *Ferula hermonis* در یافتند که آلفا پینن مهمترین ترکیب اساسی سرشاخه های گل دار گیاه می‌باشد. رزین‌های استخراجی از گیاه دارای اثرات ضدمیکروبی بسیار قوی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می-باشد، در صورتی که عصاره حاصل از ریشه گیاه دارای اثرات رشد مهاری بر روی باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. این نتایج همسو با یافته‌های ما مبنی بر اینکه عصاره هیدروالکلی دارای اثرات مهاری بر روی باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت بود، می‌باشد. از دیگر نتایج این تحقیق می‌توان به مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی نسبت به عصاره های الکلی مورد آزمون اشاره کرد. به طور کلی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به عصاره های گیاهی حساس تر از باکتریهای گرم منفی می‌باشند. که این پدیده ممکن است به علت تحمل ذاتی گرم منفی‌ها و ماهیت و ترکیبات گیاهی باشد (Krittika et al 2007). مطالعات مختلف نشان داده است که دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها، ترکیبات شیمیائی ضد میکروبی و حتی بسیاری از داروهای گیاهی (Marilena 2001) حساسیت زیادی دارند Priscila G Mazzola و همکارانش نیز نشان دادند که باکتری-های گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاومتر از

انواع گرم مثبت هستند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که مصرف عصارهای خوراکی آنغوزه می‌تواند اثرات ضد باکتریائی مناسبی بر علیه باکتری‌های پاتوژن نشان دهد و تاکیدی بر کاربرد روز مره آن میباشد.

منابع

۱- مظفریان ،و.(۱۳۸۳). رده بندی گیاهی، کتاب دوم دولپه‌ای‌ها. انتشارات مرکز تحقیقات جنگل-ها و مراتع.

2- Abedi D,Jalaali M,Asghari G,Sadeghi N, 2008. Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of Ferula gumosa Bioss. essential oil using Alamar Blue. Research in pharmaceutical science, 3(1): 41-45.

3- Adams R.P. 2001. Identification of Essential oil Components by Gas Chromatography/Quadropole Mass Spectroscopy Carol Stream IL: Allured Publishing Crop. 465p.

4- Adams, R.P.1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mmass SpectroscopyBaskin,

6- Bennet-Jenkins E, Bryant C 1996. Novel sources of anthelmintics. 30. Int J Parasitol. 26(8/9):937-47.

7- Bown, D., 1995. Encyclopaedia of Herbs and their Uses. Dorling Kindersley Ltd., London, SBN: 0-7513-020-31, pp: 342.

8- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.

9- Chevallier, A., 1996. The Encyclopedia of Medicinal Plants. 1st Edn., DK Publishing Inc., New York, USA., pp: 259.

10- Chiej, R., 1984. Encyclopaedia of Medicinal Plants. Macdonald and Co., London, UK., pp: 1-139.Chromatographic Retention Index of Monoterpens andSesquiterpens on Methyl Silicone and Carbowax 20 M phases. Journal of Chromatography, 503:1-24.

11- Daniel, M., 2006. Medicinal Plants: Chemistry and Properties. Science Publishers, USA., pp: 1-9.

12- Davies NW. 1990; Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. J Chromatogr. 503:1–24.

13- Duke, J.A. and E.S. Ayensu, 1985. Medicinal Plants of China. 1st Edn., Reference Publications Inc., Algonac, MI.

14- Dulger B, Gonuz A., 2004.Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine.Asian Journal of plant Sciences, 3(1):104-107.

15- Ghasemi Y, Faridi P, Mehregan I, Mohagheghzadeh A, 2005.Ferula gummosa fruits:An aromatic antibacterial agent.Chemistry of natural compounds. Vol. 41, No. 3, 311-315.

16- Hilan C,Sfeir R,hage R E,Jawich D,Frem M E.,jawhar K,2007.Evaluation of the antibacterial activites of Ferula hermonis (Boiss.). Lebanese science journal. Vol. 8, No. 2: 835-847.

17- Krittika Norajit. 2007. Antimicrobial effect of five Zingiberaceae Essential oils . Molecules, 12, 2047- 2060.

18- Kunwar PS, Sharma M, Bhatt G, Pandey M, Sharma V, 2010. Antimicrobial activity of essential oil of Ferula asafetida (Hing). International journal of comprehensive pharmacy, Vol. 1 (2):1-3.

19- Marilena, C., Bersani C. and Comi, G., 2001 Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67: 187–195.

20- Priscila G Mazzola, Alzira MS Martins and Thereza CV Penna. 2006 .Chemical resistance of the gram negative bacteria todifferent sanitizers in a water purification system. BMC Infectious Disease, 6: 131.

21- Rahman MM , Garvey M, Piddock LJ, Gibbons S 2008. Antibacterial terpenes from the oleo-resin of Commiphora molmol (Engl.). Phytother Res. 22(10): 1356-60.

22- Singh Puri, H., 2003. Rasayana: Ayurvedic Herbs for Longevity and Rejuvenation. CRC Press, USA.
23- Shibamoto , T., 1987. Retention Idices in essential oil Analysis., 259-274 In: Sandra P.and Bicehi, C., (Eds), Capillary Gas Chromatography in essential oil Analysis Dr. Alfred Huethig verlag, Heidelberg, 435p.