اثرات ضد باکتری اسانس چند گونه گیاهی بر باکتری‌های ویبریو آلجینولیتیکوس، لیستریا مونوسیتوژنز و اشرشیاکلی

نرجس سنچولی[۱]،مصطفی غفاری*[۲]، احمد قرایی[۳]

چکیده

با توجه به محدودیت های استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، گرایش به جایگزینی آنها با مواد طبیعی و ارزان تر را تقویت نموده است. از بین مواد مختلف جایگزین، اخیرا فرآورده‌هایی با منشاء گیاهی جایگاه ویژه‌ای یافته اند. در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی اسانس ۵ گونه گیاهی نعناع(*Mentha spicata*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*)، میخک هندی (*Eugenia caryophyllata*)، زیره سبز *Cuminum cyminum*) و سماق (*Rhus coraria*) بر ۳ سویه باکتریایی(*Escherchia coli, Listeria monocytogenes, Vibrio alginolyticus*) مورد مطالعه قرار گرفت، برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش استاندارد میکرودایلوشن (Broth Microdilution) استفاده شد و حداقل غلظت باکتری کشی(MBC) با استفاده از مقادیر MIC هر اسانس تعیین شد. نتایج نشان داد که کمترین میزان MIC و MBC به ترتیب برابر با ٤ و٨ میلی گرم در میلی‌لیتر که مربوط به اسانس‌های میخک هندی بر باکتری‌های *V. alginolyticus* و *E. coli* و نعناع بر باکتری *V. alginolyticus* بوده و بیشترین مقدار MIC و MBC مربوط به اسانس رزماری به ترتیب برابر با ۱۸ و٣٦ میلی گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *L. Monocytogenes* به دست آمد. از بین اسانس‌های مورد بررسی اسانس میخک هندی، عملکرد قوی‌تری داشته و باکتری‌ها نسبت به آن حساس‌تر بودند. اما اسانس رزماری، ضعیف‌تر و باکتری‌ها نسبت به آن در مقایسه با سایر اسانس‌ها مقاومتر بودند. حساس ترین و مقاوم ترین باکتری نسبت به اسانس‌های مورد مطالعه به ترتیب باکتری *V.alginolyticus* و *L.monocytogenes* بودند. نتیجه این که اسانس‌های مورد مطالعه دارای اثرات ضد باکتریایی بر باکتری‌های مذکور بوده و از بین اسانس‌های مورد بررسی اسانس میخک هندی و نعناع قوی‌تر بوده بنابراین پیشنهاد می‌شود با جداسازی ماده موثره این دو اسانس در کنترل باکتری‌های بیماری زای دیگر استفاده شود.

واژگان کلیدی: *اسانس، اثرات ضد باکتری، میکرودایلوشن، MIC*

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲۹

مقدمه

اسانس‌ها موادی هستند معطر و دارای بو و رایحه قوی که از نظر شیمیایی حاوی حلقه‌های آروماتیک یا بنزنی و به طور عمده متشکل از مواد فنلی یا اکسیژن دار می‌باشند. اسانس‌های طبیعی و اجزاء متشکله آنها موثرترین عوامل میکروبی هستند که به علت خلوص بالا در هنگام تهیه، نقش ارزنده ای در کنترل ریز جاندارها به عهده دارند و از نظر ساختار شیمیایی اسانس‌ها مخلوطی از استرها، آلدئیدها، الکل‌ها، استونها و ترپنوئیدها می‌باشند که بسته به نوع گیاه اجزای آنها متفاوت‌اند. به علاوه این مواد در قسمتهای مختلف گیاه مثل پوست، ریشه، برگ، ساقه، میوه، دانه و گل‌های گیاه یافت می‌شوند(۱۳). اسانس‌ها از ساخت DNA,RNA، پروتئین‌ها و پلی ساکاریدها در سلولهای قارچی و باکتریایی جلوگیری می‌کنند(۱۰). متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی مانند اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از نظر اثرات ضد میکروبی شان مورد بررسی قرار گرفته اند و مشخص شده است که اغلب اسانس‌های گیاهی استخراج شده از گیاهان دارویی دارای خواص ضد قارچی، ضد انگل، ضدباکتری و ضد ویروس می‌باشند(۱۰).

باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس باکتری گرم منفی و فرصت طلب و ساکن عمومی آب‌های دریایی مناطق گرمسیری و معتدله می‌باشد(۲۰). این باکتری به عنوان عامل عفونی مشترک بوده که در اثر مصرف محصولات دریایی خام یا نیم پخته از جمله ماهی و نرم‌تنان وارد بدن انسان گردیده و باعث التهاب معده و روده می‌شود(۱۷).

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته شیلات، گروه شیلات، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران

۲*. استادیار، دکتری تخصصی بهداشت و بیماری های آبزیان، گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران، mgmostafaghaffari@gmail.com

۳. استادیار، دکتری تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین المللی هامون، دانشگاه زابل، سیستان و بلوچستان، ایران.

ویبریو آلجینولیتیکوس از آب دریا، لارو ماهی، لارو میگو، تخم آرتمیا، ماهی کفشک جوان و بریم دریایی جداسازی شده است وهمه سویه های ویبریو آلجینولیتیکوس به آمپی سیلین و نالیدیکسیک اسید و کربنسیلین مقاوم هستند (٤). این عامل بیماری زا در حرارت ٤٠ درجه سانتی‌گراد نیز رشد و در ماهی و میگو نیز عفونت‌های عمومی ایجاد می‌کند(٣).

لیستریا مونوسیتوژنز باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی بوده که متابولیسم تنفسی هوازی یا بی هوازی اختیاری دارد. اغلب از طریق آب آلوده، غذای آلوده وآلودگی متقاطع، عفونت لیستریایی رخ می دهد که با علایمی شبیه آنفلوانزا، سپتی سمی و مننژیت خصوصا در نوزادان، خانم های باردار، افراد مسن و اشخاص با نقص سیستم ایمنی همراه می‌باشد(١٤). لیستریا مونوسیتوژنز می تواند در تعداد زیادی از غذاهای فرآوری شده و خام مانند شیر و محصولات لبنی، گوشت و محصولات گوشتی مانند سوسیس، گوشت گاو و محصولات تازه مثل تربچه، کلم و همچنین در محصولات ماهی، غذاهای دریایی، تخم مرغ، میوه و سبزیجات دیده شده است(٩). رشد لیستریا مونوسیتوژنز روی روغن ماهی دودی و سرد، سالمون دودی و سرد، گوشت خرچنگ، میگوی پخته شده، کنسرو گوشت لابستر نگه داری شده در دمای ١٠-٤ درجه سانتی گراد مشاهده شده است(٦و ٢).

اشرشیاکلی یکی از باکتری‌هایی است که قادر به تولید آنزیم های بتا لاکتامازهای متنوع می‌باشد این باکتری عضو اصلی خانواده انتروباکتریاسه و عامل بسیاری از عفونت‌های بیمارستانی همانند Sepsis، گاستروانتریت، مننژیت نوزاد و خصوصا عفونت‌های ادراری شناخته شده است(١٦). اشرشیاکلی باکتری بیماری زایی است که از ماهی ماکرل منجمد و از گربه ماهی آفریقایی جداسازی شده است(١٥). اشر شیاکلی یکی از میکروارگانیسم هایی است که بیشترین فراوانی جداسازی از خون را داشته و پتانسیل نسبی بالایی را برای ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی دارد به عنوان مثال در سال ٢٠٠٢ در ایالات متحده مقاومت به آمپی سیلین و سیپروفلوکساسین مشاهده شد(١١). این تحقیق به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های میخک هندی، زیره سبز، سماق، رزماری و نعناع بر باکتری‌های *Escherchia coli, Listeria monocytogenes, Vibrio alginolyticus* انجام گرفت.

مواد و روش کار

تهیه اسانس‌های گیاهی

اسانس زیره سبز، نعناع و رزماری از شرکت کشت و صنعت گلکاران کاشان (باریج اسانس) و اسانس میخک هندی از بازار محلی خریداری شد و درصد خلوص اسانس‌ها ١٠٠٪ بوده است. اسانس سماق با استفاده از روش تقطیر با آب استخراج شد.

تهیه میکروارگانیسم های مورد مطالعه

سویه های استاندارد لیستریا مونوسیتوژنز(PTCC 1630) و اشرشیاکلی (PTCC 1330) به صورت آمپول لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ و باکتری ایران (سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران) و گونه ویبریو آلجینولیتیکوس از همولنف میگوی *Litopeneus vannami* جداسازی شد (١٢).

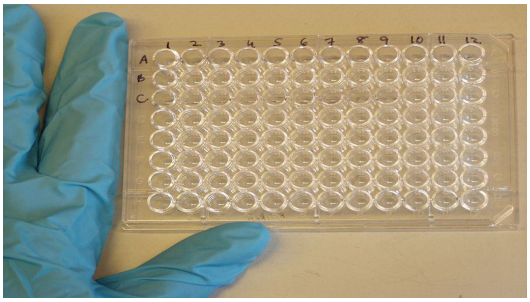
استخراج اسانس سماق

اسانس سماق، پس از خشک شدن و آسیاب کردن میوه سماق به روش تقطیر با آب، توسط دستگاه کلونجر (Clevenger) با استفاده از ٤٠ گرم نمونه خشک شده و به مدت ٣ ساعت بعد از جوش آمدن استخراج گردید(١).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از روش میکرودایلوشن

برای این منظور از باکتری‌های مورد آزمایش، کشت ٢٤ ساعته در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد و در محیط نوترینت براث(NB) برای دو گونه اشرشیاکلی و لیستریا مونوسیتوژنز و نوترینت براث با ٣٪ نمک سدیم کلرید برای گونه ویبریو آلجینولیتیکوس تهیه شد. محلول‌های استوک از اسانس‌ها در دی متیل

سولفوکساید تهیه شدند. سریال‌های رقت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) از ۱۶ تا ۰/۰۶۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر برای اسانس میخک هندی و نعناع، از ۳۶ تا ۰/۲۸۱۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر برای اسانس رزماری، از ۲۴ تا ۰/۱۸۷۵ میلی گرم در میلی‌لیتر برای اسانس زیره سبز و از ۲۰ تا ۰/۶۲۵ میلی گرم در میلی‌لیتر برای اسانس سماق در نظر گرفته شدند. آزمایش MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) در پلیت ۹۶ خانه ای میکروتیتر که در نگاره ۱ نشان داده شده است و با روش استاندارد براث میکرودایلوشن (رقیق سازی در محیط مایع) انجام شد، به طوری که سریالهای رقت با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث(MHB) بر حسب میلی گرم در میلی‌لیتر تهیه شدند و ابتدا میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت بالای اسانس‌ها را به چاهک اول پلیت های میکروتیتر ۹۶ خانه ای که قبلا حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث بوده اضافه شد و بعد از مخلوط کردن محتویات چاهک اول مقدار ۱۰۰ میکرولیتر را برداشته و به چاهک دوم اضافه نموده و این کار را تا آخرین رقت مورد نظر اسانس‌ها انجام داده و از چاهک آخر ۱۰۰ میکرولیتر را برداشته و دور ریخته و بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (معادل نیم مک فارلند) $1/5 \times 10^6$ CFU/ml به چاهک های حاوی محیط کشت مولر هینتون براث و رقت های مختلف اسانس‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت وجود کدورت (در مقایسه با ردیف کنترل) حاکی از رشد باکتری و شفافیت، نشان دهنده عدم رشد باکتری می‌باشد. پایین ترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد باکتری مشاهده نشد (فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری) به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) تعیین شد. (۲). تمام آزمایشات برای ۳ بار تکرار گردید و میانگین داده‌های بدست آمده به عنوان نتایج MIC و MBC ارائه گردید.



نگاره۱ – تصویر میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای مورد استفاده در تکنیک میکرودایلوشن

تعیین حداقل غلظت باکتری کشی (MBC)

حداقل غلظت باکتری کشی (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) با توجه به مقادیر MIC تعیین شد، به طوری که میزان ۵ میکرولیتر از چاهک هایی که رشد باکتری در آنها متوقف شده است، به پلیت های حاوی محیط کشت اختصاصی هر باکتری انتقال داده شد و به مدت ۲۴-۲۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پایین‌ترین غلظت اسانس که در آن ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها رشد نداشتند به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۵).

نتایج

نتایج حاصل از سنجش میزان حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌ها روی باکتری‌های مورد بررسی در جدول (۱) آمده است. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس میخک هندی و نعناع بر باکتری‌های مورد مطالعه ۸- ٤ میلی گرم در میلی‌لیتر، اسانس زیره سبز ۱۲-٦ ، اسانس رزماری ۱۸-۹ و اسانس سماق ۲۰-۱۰ میلی گرم در میلی‌لیتر بدست آمده است. این نتایج نشان می دهد که کمترین میزان MIC برابر ٤ میلی گرم در میلی‌لیتر که مربوط

به اسانس میخک هندی علیه باکتری‌های *V. alginolyticus* و *E. coli* و همچنین نعناع بر باکتری *V. alginolyticus* و مقدار MBC اسانس نعناع دو برابر مقدار MIC یعنی ۸ میلی گرم در میلی‌لیتر بدست آمد. این در حالی بود که بیشترین مقدار MIC مربوط به اسانس رزماری برابر با ۱۸ میلی گرم در میلی‌لیتر بر باکتری *L. Monocytogenes* و MBC این اسانس بر این باکتری ۳٦ میلی گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. اسانس زیره سبز دارای اثرات ضد باکتریایی متوسط که کمترین میزان MIC این اسانس مربوط به باکتری‌های *V. alginolyticus* و *E. coli* و بیشترین میزان MIC مربوط به باکتری *L. monocytogenes* بود. کمترین مقدار MIC اسانس سماق مربوط به باکتری *V.alginolyticus* و بیشترین مقدار آن مربوط به باکتری‌های *E.coli* و *monocytogenes L.* بود.

جدول۱- فعالیت ضد باکتریایی(MIC و MBC بر حسب mg/ml) ۵ اسانس گیاهی به روش میکرودایلوشن

باکتری‌ها	*V. alginolyticus*		*L. monocytogenes*		*E. coli*	
اسانس‌های گیاهی(mg/ml)	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
میخک هندی	۸	٤	١٦	۸	۸	٤
نعناع	۸	٤	١٦	۸	١٦	۸
زیره سبز	١٢	٦	٢٤	١٢	١٢	٦
رزماری	۹	۹	٣٦	١٨	١٨	۹
سماق	١٠	٥	٢٠	١٠	٢٠	١٠

بحث

اسانس‌ها اثرات ضد باکتریایی خود را از طریق تغییر ساختار و عمل غشاء سلولی اعمال می کنند. بررسی های صورت گرفته در خصوص مکانیسم عمل اسانس‌ها اثبات نموده که این ترکیبات نفوذ پذیری غشاء را افزایش می دهند. اجزای اسانس با نفوذ در غشاء منجر به متورم شدن غشاء گردیده و فعالیت آنرا تحت تاثیر قرار داده (کاهش می دهند) و در نهایت منجر به مرگ سلول خواهند شد. اجزای اسانس نیز اثرات ضد باکتریایی متفاوتی دارند، به طوری که گروه هیدروکسیل موجود در مولکول اجزای اسانس مانند کارواکرول، تیمول، سایمن و منتول برای بروز خاصیت ضد باکتریایی آنها بسیار مهم است(۸).

در مورد باکتری ویبریو آلجینولیتیکوس و لیستریا مونوسیتوژنز بیشترین قدرت باکتری کشی را اسانس میخک هندی و نعناع به ترتیب با مقدار (MIC=٤mg/ml و MBC=۸mg/ml) و (MIC=۸mg/ml و MBC=١٦mg/ml) داشتند که بیشتر از مقادیر بدست آمده قدرت ضد باکتریایی این اسانس‌ها در مورد باکتری‌های مطالعه شده دیگر بود(۱۹و۵).

در مورد باکتری *E.coli* بیشترین قدرت باکتری کشی را اسانس میخک هندی با مقدار (MIC=4mg/ml و MBC=8mg/ml) داشت که بیشتر از مقادیر بدست آمده قدرت ضد باکتریایی این اسانس در مورد باکتری‌های مطالعه شده دیگر بود (۱۹و۵). در این تحقیق مشاهده شد که باکتری‌های گرم منفی(*V. Alginolyticus* و *E.coli*) نسبت به باکتری گرم مثبت (*L. monocytogenes*) حساسیت بیشتری در برابر اسانس‌های مورد بررسی داشتند (با توجه به مقادیر MIC بالاتر اسانس‌ها بر باکتری گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی)، که این احتمالا به واسطه وجود دیواره سلولی متفاوت در دو نوع باکتری گرم مثبت ومنفی و

عدم وجود غشاء در باکتری‌های گرم مثبت می‌باشد. از بین اسانس‌های مورد بررسی اسانس میخک هندی با توجه به مقادیر MIC پایین این اسانس بر هر سه باکتری مورد مطالعه، قوی‌تر و باکتری‌ها نسبت به این اسانس حساس‌تر و اسانس رزماری با توجه به مقادیر بالاتر MIC بر باکتری‌ها، ضعیف‌تر و باکتری‌ها نسبت به آن در مقایسه با سایر اسانس‌ها مقاومتر مشاهده شدند و حساس‌ترین باکتری نسبت به اسانس‌های مورد مطالعه باکتری *V. alginolyticus* و مقاوم ترین آنها باکتری *L. monocytogenes* مشاهده شد. درصد بالای فعالیت ضد میکروبی اسانس میخک هندی مربوط به یوگنول می‌باشد که جزء ترپن های فنولیک با خاصیت ضد میکروبی بالا می‌باشد و یوگنول تقریبا ۸۵٪ترکیب اسانس میخک را تشکیل می دهد، غلظت های کمتر از کشندگی این ترکیب، از تولید آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری جلوگیری می کند، این ترکیب هم چنین باعث تخریب دیواره سلولی وتجزیه سلول می گردد گروه هیدروکسیل یوگنول با پروتئین ها پیوند شده از عمل آنزیم در سلول باکتری جلوگیری می کند، ترکیب تشکیل دهنده اسانس یک گونه در شرایط منطقه ای مختلف ممکن است اختلاف داشته باشد و این اختلافات می تواند ناشی از تفاوت در فصل برداشت، زمان استخراج اسانس، مناطق مختلف جغرافیایی حتی بخش های مختلف گیاه باشد(۷). عامل دیگری که می تواند اثرات ضد باکتریایی عصاره یا اسانس یک گیاه را تحت تاثیر قرار دهد، محیط کشت مورد استفاده جهت انجام آزمایشات ضد باکتریایی می‌باشد. تفاوت در اثرات ضد باکتریایی یک ماده در محیط کشت‌های گوناگون به اثبات رسیده است(۱۸).

تشکر و سپاسگزاری

از مسئولین آزمایشگاه های پژوهشکده تالاب هامون دانشگاه زابل و همچنین از سرکار خانم سعیده سعیدی و مسئول پژوهشکده زیست فناوری سرکار خانم خواجه و مسئول آزمایشگاه شیلات جناب آقای مهندس حیدری که صمیمانه ما را در انجام این کار یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

فهرست منابع

۱. ساعی دهکردی، س.، تاجیک، ح.، مرادی، م.، جعفری دهکردی، الف.، قاسمی، س. (۱۳۸۸): بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات ضد میکروبی روغن فرار رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوزیم، علیه لیستریا مونوسیتوژنز، مجله ارمغان دانش، ۵۵ (۳): ۱۱ -۱.

۲. عروجعلیان، ف.، کسری کرمانشاهی، ر.، عزیزی، م.، باسامی، م.ر. (۱۳۸۹): بررسی اثر ضد باکتریایی و خاصیت سینرژیستی اسانس سه گیاه دارویی علیه برخی پاتوژن های مهم مواد غذایی به روش میکرودایلوشن، فصلنامه علمی ـ پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۶(۲): ۱۴۶-۱۳۳.

۳. مجیدی نسب، الف. (۱۳۷۷): بیماری‌های میگوهای پرورشی، چاپ سوم، انتشارات نوربخش، تهران، ایران، صفحه: ۲۰-۱۷.

4. Austin, B., Stobie, M., Robertson, A. W., Glass, H. G., Stark, J.R. (1993): Vibrio alginolyticus: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, Scophthalmus maximus L. in a Scottish aquarium. J. Fish. Dis. 16:277–280.

5. Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A., Soukri, A. (2009): Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against Listeria monocytogenes and some other pathogenic strains. malabaricus Bloch et Schneider. Microb. Pathog. 19: 39–48.

6. Ben Embarek, P.K. (1994): Presence, detection, and growth of Listeria monocytogenes in seafoods. Int. J. Food. Microbiol. 23(1): 17-34.

7. Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. Int. J. Food. Microbiol. 94: 223-225.

8. Celiktas, O.Y., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T., Baser, K.H.C. (2007): Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food. Chem. 100: 553-559.
9. Gandhi, M. Chikindas, M.L. (2007): Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int. J. Food. Microbiol. 113: 1-15.
10. Kalemba, D., Kunicka, A. (2003): Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 10(10): 813-829.
11. Karlowsky, J.A., Jones, M.E., Draghi, D.C., Thornsberry, C., Sahm, D.F., Volturo, G.A. (2002): Prevalence of antimicrobial susceptibilities of bacteria isolated from blood cultures of hospitalized patients in the United States in. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 3:7-10.
12. Liu, C.H., Cheng, W., Hsu, j.P., Chen, J.C. (2004): Vibrio alginolyticus infection in the White shrimp Litopenaeus vannamei confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. Dis. Aquat. Org. 61: 169-174.
13. Marjorie, M. (1999): Plant production as antimicrobial agents Clinical CRC. Reviews. P: 1298-1301.
14. Murray, P., Barton, E.J.O., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Yolken, R.H. (2003): Manual of Clinical Microbiology, Diagnostic Microbiology, handbooks, manuals, etc. National Institute of Health, 37 (9): 461 - 467.
15. Musa, N., Seong Wei, L., Seng, C.T., Wee, W., Leong, L.K. (2008): Potential of Edible Plants as Remedies of Systemic Bacterial Disease Infection in Cultured Fish. J. Pharmacol. 2 (2): 31-36.
16. Paterson, D.L., Bonomo, R.A. (2005): Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin. Microbiol. 18(4): 657-686.
17. Piersimoni, C., Morbiducci, V., Scalise, C. (1991): Vibrio cholerae gastroenteritis and bacteremia. Lancet. 337: 791–792.
18. Tassou, C.C., Drosinos, E.H., Nychas, G.J.E. (1995): Effects of essential oil from mint (Mentha piperita) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 degrees and10 degrees C. J. Appl. Bacteriol. 78(6): 593-600.
19. Ullah, N., Khurram, M., Usman Amin, M., Afridi, H.H., Ali Khan, F., Umar Khayam, S.M., Ullah, S., Najeeb, U., Hussain, J., Asif Khan, M. (2011): Comparison of Phytochemical constituents and antimicrobial activities of Mentha spicata from four northern districts of Khyber pakhtunkhwa. J. Appl. Pharm. Sci. 1 (7): 72-76.
20. Zanetti, S., Deriu, A., Dupre, I., Sanguinetti, M., Fadda, G., Sechi, L.A. (1999): Differentiation of Vibrio alginolyticus strains isolated from Sardinian waters by ribotyping and a new rapid PCR fingerprinting method. Appl. Environ. Microbiol. 65(5): 1871–1875.