Study of the activity of anise seeds and carboxylic acetic acid against the growth of *Streptococcus mutans* causing dental caries

اختبار الفعالية لبذور اليانسون وحامض الخليك الكاربوكسيلي في نمو البكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لتسوس الأسنان

سعاد خليل ابراهيم

قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم/ جامعة بغداد

shanarazad@yahoo.com

Abstract

In this study, *Streptococcus mutans* causing dental laminitis was detected and isolated from patients which dental caries who attended Al-Kindi teaching hospital. The antagonist efficacy of alcoholic anise seeds and carboxylic acetic acid extract on the growth of *Streptococcus mutans* bacteria was studied by disc diffusion method.

The minimum inhibition concentration and minimum bactericidal concentration were also determined to show biologic activity of alcoholic anise seed and carboxylic acetic acid extract, which ranged between 25 mg/ml and 50 mg/ml for anise seeds, and between 3% and 4% for acetic acid.

The synergistic activity of alcoholic extract and carboxylic acetic acid and some antibiotics were also studied. It was found that it had a high synergistic activity with the antibiotic streptomycin and cloxacillin and with the acids. The inhibition zone of bacterial growth was 33-35 respectively, and recorded a medium activity with other antibiotics. However, it has shown that it had high activity against acids where the inhibition zone was higher.

الخلاصة

تم في هذه الدراسة التحري عن البكتريا *Streptococcus mutans* المسببة لالتهاب الصفيحة السنية وعزلت من المرضى المصابين بتسوس الأسنان في مستشفى الكندي التعليمي. اختبرت الكفاءة التضادية لمستخلص بذور اليانسون الكحولي وحامض الخليك الكاربوكسيلي في نمو البكتريا *St. mutans* بطريقة الانتشار في الحفر.

وكذلك التركيز المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC لمعرفة الفعالية البايولوجية لمستخلص بذور اليانسون الكحولي وحامض الخليك الكاربوكسيلي حيث كانت تتراوح ما بين 25 mg/ml و50 mg/ml بالنسبة لمستخلص بذور اليانسون وأما بالنسبة لحامض الخليك فكانت 3% و4%.

وكذلك اختبر الفعل التآزري للمستخلص الكحولي مع حامض الخليك الكاربوكسيلي وكذلك مع المضادات الحيوية ولوحظ أنه يمتلك فعالية تآزرية عالية مع المضادات Streptomycin و Cloxacillin ومع الحوامض حيث كانت أقطار التثبيط في النمو البكتيري 25-23 على التوالي وسجل فعالية متوسطة مع المضادات الأخرى وبالنسبة للحوامض لوحظ أنه يمتلك فعالية عالية مع الحوامض حيث كانت أقطار التثبيط أعلى.

1. المقدمة

تسوس الاسنان مرض تسببه العديد من الاحياء المجهرية وخاصة البكتريا والفطريات وهو مرض معدٍ وله قابلية الانتقال من شخص لاخر يحدث التسوس نتيجة تحطم موضعي لانسجة السنية بفعل انزيمات البكتريا [1].

تعد بكتريا *Streptococcus mutans* احدى المسببات الرئيسة لتسوس الاسنان وهي بكتريا موجبة لصبغة كرام وحالة الدم من نوع β وتتواجد بشكل رئيسي في الحليب والماء والخضر والسبيل المعوي في للإنسان وهي بكتريا غير متحركة وغير مكونة للابواغ وتحتاج الى وسط غني بالدم ومصل الدم لغرض النمو [2].

تلعب الجرثومة المسبحية *St. mutans* وعصيات الحليب *Lactobacillus* والبكتريا الخيطية *Actinomyces* sp. دوراً مهماً في حدوث الإصابة بمرض تسوس الأسنان وتكوين الخراجات الناجمة عن تسوس الأسنان. ومن العوامل المؤثرة على تسوس الأسنان هو النظام الأنزيمي في الصفيحة السنية للجراثيم الموجودة على سطح الأسنان مما يجعل الجراثيم قادرة على إنتاج حامض Lactic acid من بقايا الكاربوهيدرات القابلة للتخمر ومنها السكروز الذي يسبب تسوس الأسنان من خلال زيادة مسامية الصفيحة السنية، وعند التخمر يصبح الوسط حامضياً والذي يساعد على زيادة أعداد البكتريا *St. mutans* [3]. ووجد ان زيادة التدخين تؤدي الى

انخفاض في نسب تسوس الاسنان وزيادة التهاب اللثة كذلك تؤدي الى توسع في منطقة الترابط بين الانسجة الرابطة وزيادة حركة الاسنان [4].

نبات اليانسون عبارة عن عشب يبلغ ارتفاعه حوالي نصف متر ساقه مضلعة تحمل اوراقاً مسننة مستديرة الشكل تحمل ازهاراً بيضاء اللون تتحول بعد النضج الى ثمار بنية اللون والنبات حولي يعيش سنة واحدة. واليانسون شتوي يحتاج الى جو معتدل مائل للرطوبة ولا يلائمه ارتفاع الرطوبة علماً ان النبات يتحمل درجات الحرارة العالية وتنجح زراعته في الترب الطينية الغنية بالجير [5] ويدخل الينسون في بعض ادوية السعال والتهاب الشعب والفم والاسنان والحنجرة ومشاكل سوء الهضم وفقدان الشهية وأول من استخدمها كتوابل عشبية هم الرومان [6]. ويحتوي اليانسون على مادة Choline وهي مادة توجد في جميع الخلايا وخاصة الصفراء وهي ضرورية لاداء الكبد ووجد Bolukbassi وErhen [7] ان استعمال 5% من اليانسون في عليقة الطيور أدى الى خفض معدل نمو بكتريا Coliform في القناة الهضمية للطيور وكذلك في الحفاظ على صحة الحيوان ولوحظ ان استعمال اليانسون يؤدي الى خفض درجة حرارة الانسان [8].

يحتوي اليانسون على زيت بنسبة 2-3% من وزن الثمرة الجافة وأهم مكوناته هي مادة Anethol وMethyl chavicol ويكونان 80-90% من الزيت اما ما تبقى من المركبات فتتوزع بين الكيتونات والالديهايدات والاحماض اليانسونية فضلاً عن الفلافونيدات وهرمون الاستروجين الطبيعي [7].

وهدف الدراسة هو اختبار حساسية الجرثومة *St. mutans* المسببة لمستخلص اليانسون الكحولي وحامض الخليك الكاربوكسيلي وكذلك لدراسة التآزر مع بعض المضادات الحيوية واختبار فعاليتها اتجاه نمو البكتريا بعد عزلها من المرضى المصابين بتسوس الأسنان. تم جمع المسحات البكترية *St. mutans* من المرضى المصابين بالتهاب الأسنان والمراجعين للمستشفى.

2. المواد وطرائق العمل

دراسة الخصائص المجهرية والبايوكيميائية

تم أخذ مسحة (Swap) من بكتريا *St. mutans* من المرضى المصابين بتسوس الأسنان وبعد ذلك جرى تنشيطها في الوسط الزرعي السائل ومن ثم تم حضنه لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة 37°م ونقل جزء من المستعمرات إلى أوساط زرعية صلبة مثل Blood agar وNutrient agar وحضنت في الظروف الاعتيادية. درست الصفات المظهرية والزرعية لبكتريا الاختبار ومقارنتها مع الصفات القياسية. ودرست الصفات البايوكيميائية مثل إنتاج الأنزيمات وتخمر بعض السكريات وبعض الفحوصات الاخرى مع مقارنتها بالنتائج القياسية للتأكد من هوية عزلات الاختبار [9].

تحضير المستخلصات النباتية والحوامض الكاربوكسيلية

-فصل وتنقية مستخلص اليانسون الكحولي:

تم تحضير المستخلص الكحولي لبذور اليانسون بإضافة 20 غم من مطحون بذور اليانسون الخام إلى 200 مل كحول اثيلي بتركيز 95% ووضع في (ثامبل) بجهاز الاستخلاص Soxholate ولمدة 24 ساعة وبعد ذلك ركز المستخلص بواسطة جهاز التبخير الدوار في درجة حرارة 40°م الى 5 مل تقريباً وحفظ في عبوات معقمة في درجة حرارة الثلاجة 4°م [9] وكان سبب الاستعانة بالكحول الاثيلي هو لاستخلاص كمية اكبر من الدهون الموجودة في اليانسون لكونه مذيب جيد لمعظم الفلافونات والراتنجات والقلويدات وله قابلية على النفاذ بين أجزاء بذور اليانسون [10].

-تحضير تراكيز المستخلص الكحولي لبذور اليانسون:

حضرت سلسلة من التراكيز من المحلول القياسي المحضر حسب طريقة [11] وذلك بأخذ (0.1) مل من هذا المحلول واضافته الى (5) مل من وسط Nutrient agar ثم نقل 2.5 من المزيج (وسط + بذور اليانسون) الى انبوبة اختبار ثانية حاوية على (2.5) مل من الوسط الزرعي السائل وهكذا الى ان تصل الى اخر تركيز للحصول على التراكيز الاتية: (3.1، 6.25، 12.5، 25، 50، 100، 200) ملغم/مل وعلى التوالي.

-تحضير تراكيز الخليك الكابوكسيلي:

تم تحضير تراكيز من حامض الخليك باستخدام الماء المقطر المعقم (0.5، 1، 1.5، 2، 3، 4)% على التوالي. ثم وزعت هذه التراكيز على قناني صغيرة محكمة السد و عقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة (121)°م و ضغط (15) باوند/إنج لمدة (15) دقيقة تركت لتبرد في درجة حرارة الغرفة لحين الاستخدام.

-اختبار الفعالية المضادة للبكتريا:

اختبرت فعالية بذور اليانسون وحامض الخليك بطريقة الانتشار في الحفر على وسط مولر هنتون الصلب [12] بأخذ (0.1) مل من العالق البكتيري بعد حضنه 24 ساعة ونشر على الأطباق بالناشر بشكل متجانس ثم تركت لمدة (10) دقائق لكي تجف (وقد زرع 3 مكررات لكل عزلة). وعملت حفر بقطر 5 ملم في الوسط المزروع بواسطة الثاقب الفليني، حضرت تراكيز متدرجة من التركيز الأصلي باستخدام الماء المقطر وأضيف (0.1) مل من التراكيز أعلاه لكل حفرة بالتسلسل وعملت حفرة السيطرة المتمثلة بإضافة ماء مقطر معقم، وعملت نفس الطريقة مع تراكيز حامض الخليك.

بعدها حضنت الأطباق بدرجة (37)°م لمدة 24 ساعة وسجلت النتائج لقياس قطر منطقة التثبيط (Inhibition zone)، عُلم بواسطة المسطرة حول كل حفرة. وكذلك تم خلط الحامض مع المستخلص الكحولي لليانسون وبتراكيز (200، 100، 50، 25، 12.5، 6.25، 3.1) ملغم/ مل لمعرفة الفعل التآزري حسب طريقة [13]. وقياس قيمة المثبط الأدنى MIC والقاتل الأدنى MBC وحدد اقل تركيز مثبط ادنى للمستخلص الكحولي لبذور اليانسون حسب ما جاء في [14].

-طريقة مزج المستخلص الكحولي لبذور اليانسون مع عدد من المضادات الحيوية:
تم مزج (400) ملغم/مل من مستخلص بذور اليانسون الكحولي مع تركيز محدد من المضادات الحيوية حسب الطريقة المتبعة من قبل [13].

3. النتائج والمناقشة

- التشخيص المختبري
شخصت العزلات البكتيرية النامية على الأوساط الزرعية باستخدام الطرق الروتينية في الفحوصات البايوكيميائية لهذا الغرض معتمدين على أساس الخصائص الزرعية (Cultural charactersties) من خلال المستعمرات النامية وخصائص نموها على الأوساط الزرعية التفريقية وكذلك خلال صبغة غرام وذلك لقابليتها على الاصطباغ وعند مقارنة هذه النتائج مع النتائج القياسية جاءت متطابقة ومتوافقة مع [15]، مما يؤكد على نقاوة عزلة الاختبار (*St. mutans*) (جدول 1).

-تحديد قيمة MIC وMBC بتحضير سلسلة من التراكيز (3.1، 6.2، 12.5، 25، 50، 100، 200) ملغم/مل للمستخلص الكحولي لبذور اليانسون وذلك بمزج مستخلص اليانسون الكحولي مع الوسط الزرعي Brain Heart infusion broth، وعمل تخافيف منه وإضافة المزروع الجرثومي له وتبين بأن الفعالية المضادة للمستخلص الكحولي لبذور اليانسون تزداد بزيادة تركيزه في الوسط الزرعي، إذ أوضحت النتائج أن قيمة MIC وMBC تتفاوت اعتماداً على تراكيز المستخلص وفترة التحضين جدول رقم (2).

وقد وجد أن قيمة MIC وMBC على التوالي للمستخلص الكحولي ولبذور اليانسون على جرثومة (*St. mutans*) بلغت (25) ملغم/مل و (50) ملغم/مل حيث أثر هذا التركيز على نمو البكتريا بشكل فعال عند فترة حضانة (24) ساعة وتعزى هذه الفعالية التثبيطية لاحتوائه على عدد من المركبات الطبية الفعالة مثل مادة (Choline) وهي مادة توجد في جميع الخلايا وخاصة الصفراء وهي ضرورية لأداء الكبد لوظيفته وكذلك احتواءه على بعض المركبات القلويدية والزيوت الطيارة التي تمتلك فعالية مضادة لنمو الجراثيم.

وجد [16] أن استعمال نسبة (0.5)% من اليانسون في عليقة الطيور أدى إلى خفض معدل نمو بكتريا (Coliform) في القناة الهضمية للطيور، وكذلك في الحفاظ على صحة الحيوان إضافة الى وجود الفينولات والفلافونيدات وهرمون الاستروجين الطبيعي بكميات كبيرة [7] . كذلك احتوائه على بعض المركبات القلويدية والزيوت الطيارة التي تمتلك فعالية مضادة لنمو الجراثيم حيث تقوم هذه المركبات على مسخ البروتين في الكائن المجهري وإيقاف فصل الأنزيمات المسؤولة عن التفاعلات الأيضية الأساسية ولا يتمكن من النمو والاستمرار [17].

- تأثير مستخلص بذور اليانسون الكحولي في نمو البكتريا *St. mutans* لقد تباين تأثير التراكيز المختلفة لمستخلص بذور اليانسون الكحولي في نمو البكتريا *St. mutans* حيث أبدت بكتريا الاختبار حساسية للمستخلص بالتركيز 50 ملغم/مل وأزدادت حيث أصبحت في ذروتها عند التركيز 100 ملغم/مل الذي يعد أفضل تركيز لمنع نمو البكتريا بشكل كامل وبفروق معنوية واضحة عند مستوى احتمالية $P<0.001$ ، $LSD= 0>675$ (جدول 3).

إن التباين الحاصل من تراكيز المستخلص وبين درجة تأثيره على نمو البكتريا مرتبط مع زيادة التركيز حيث كلما زاد تركيز المستخلص زاد تأثير المواد الفعالة فيه وبالتالي زيادة في تثبيط نمو الجراثيم وهذا يتفق مع ما توصل إليه [18].

يعزى هذا التأثير في النمو البكتيري إلى عدم قدرة البكتريا على مقاومة المواد الفعالة وعدم قدرتها على الحركة وتكوين الابواغ التي تعطيها المقاومة وكذلك عدم امتلاكها إلى البلازميدات والتراكيب الاخرى التي تساعد على إحداث الفوعة مما يجعلها حساسة للمستخلص [2].

ويمكن أن يعزى تأثير حامض الخليك في نمو البكتريا لما يسببه رقم الهيدروجين ودوره في السيطرة على الفعاليات الحيوية للكائن المجهري ونموه وفضلاً عن تأثير الأنزيمات الموجودة في الغشاء السايتوبلازمي بتركيز ايون الهيدروجين (H) ولاسيما أن رقم الهيدروجين لتراكيز حامض الخليك المستخدم في هذه التجربة ويمكن استخدامه للسيطرة على نمو الجراثيم بكثرة وذلك لكونه حامضياً غير سام، رخيص الثمن، وتأثيره الكبير ويتبين من التجربة انه كلما زاد التركيز زادت نسبة التثبيط للنمو البكتيري (جدول 4).

بعد الحصول على المستخلص الكحولي وتأثيراته في تثبيط النمو البكتيري تم تحضير تراكيز مختلفة من المستخلص ومزجت بشكل جيد مع تراكيز حامض الخليك وتم معرفة تأثير المزيج على نمو البكتريا من خلال تثبيط او عدم زيادة النمو (جدول 5).

أوضحت نتائج جدول (5) أن مستخلص بذور اليانسون الكحولي عند مزجه مع حامض الخليك أعطى نتائج إيجابية ونتائج عالية الفعالية اتجاه تثبيط النمو البكتيري ويعود السبب في ذلك إلى احتواء بذور اليانسون على العديد من المركبات ذات الفعل التآزري مع الحوامض الكاربوكسيلية وهناك عوامل مؤثرة في التآزر هي نوع الحامض المستخدم وتركيزه وكذلك نوع البكتريا [7] وأن بذور اليانسون وحامض لخليك الكاربوكسيلي بكونهم مضادات للبكتريا قليلة السمية، سهولة الحصول عليها وسهولة تحضيرها وثباتيته الجيدة وبذلك يفضل استخدام بعض المستخلصات النباتية والحوامض في العلاج للإصابات المرضية. إن الاتجاهات الحديثة لا توصي باستخدام المضادات الحيوية في الالتهابات المرضية ويعزى ذلك إلى أن استخدام هذه المضادات بشكل واسع وعشوائي يؤدي إلى ظهور سلالات من البكتريا المسببة للالتهابات مقاومة لتلك المضادات وبالتالي تصعب وتطول فترة العلاج والشفاء وهذا النوع من المقاومة ربما يؤدي إلى تطور التهابات ثانوية وخصوصاً عند دخول الأحياء المجهرية إلى الأنسجة المصابة ولذا من المهم اختيار العلاج المناسب لتلك الحالات، وقد توجهت أنظار الباحثين في شتى بقاع العالم عند المعالجة إلى استعمال الطب الشعبي واللجوء إلى المواد الطبيعية كاليانسون والكتان [19].

ومن جهة اخرى فقد اكتشف [20] أن استخدام مذيبات مثل الكلوروفورم: الاثير أو أي مذيب آخر غير الكحول والماء كانت غير كفوءة في استخلاص المواد الفعالة إذ ظهر أن تأثير المستخلصات بهذه المذيبات ضعيف مقارنة بالمستخلص الكحولي، إذ أبدت

فعالية تثبيطية عالية اتجاه البكتريا المرضية وأن اليانسون يمتلك فعالية عالية جداً في حالات الاصابات المرضية النخرية حيث يعمل على تحفيز الأنسجة المدمرة في سطح الإصابة وإعادة ترميمها وأداء وظائفها بشكل كامل.
اما عند مزج المستخلص الكحولي لليانسون ذو تركيز 400 ملغم/مل مع تراكيز محددة من المضادات الحيوية لوحظ ان هناك تباين في اقطار مناطق التثبيط في نمو بكتريا *St. mutans* إذ يعد مزج (Coloxcillin EEp و Streptomycin+EEP) من افضل المزيجات المستخدمة وكانت اقطار مناطق التثبيط (23 و25) ملم على التوالي ويعود السبب في ذلك الى احتواء اليانسون على العديد من المركبات ذات الفعل التآزري مع بعض المضادات الحيوية وهناك عوامل مؤثرة في التآزر هي نوع المضاد المستخدم وكذلك نوع البكتريا ويحتوي اليانسون على مركبات عديدة منها المركبات التربينية والتانينية وهي مركبات نتيروجينية ذات خواص قطبية وتمتلك فعل تآزري عالٍ [21] (جدول 6).

جدول (1): الفحوصات البايوكيميائية التأكيدية لبكتريا *St. mutans* .

Test	Result
Gram stain	G^+
Starch	+
Aesculin hydrolysis	+
Riffinose	+
Sorbitol glucose	+
Manitol	+
NH_2 Product from Arginine	+

جدول (2): يوضح فيه MIC وMBC لمستخلص بذور اليانسون الكحولي في نمو البكتريا الملوثة للأسنان

1.1 mg/ml	6.2 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	التراكيز / البكتريا
+	+	+	+	–	–	–	***St. mutans* group**
+	+	+	+	+	+	+	**Control**

- عدم وجود نمو بكتيري.
+ وجود نمو بكتيري.

جدول (3): يوضح فيه معدلات أقطار التثبيط لتراكيز مختلفة من مستخلص بذور اليانسون الكحولي

LSD 0.05	3.1 mg/ml	6.2 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	التراكيز / البكتريا
3.094	0	2	8	12	19	22	28	***St. mutans* group**

جدول (4): تأثير تراكيز مختلفة من حامض الخليك الكاربوكسيلي على نمو البكتريا *St. mutans*

%0.5	%1	%2	%3	%4	التراكيز / البكتريا
9	15	19	23	25	***St. mutans***

جدول (5): دراسة تأثير المستخلص النباتي مع حامض الخليك الكاربوكسيلي في نمو بكتريا *St. mutans*

1.1 mg/ml	6.2 mg/ml	12.5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml	التراكيز / البكتريا
0	3	10	15	24	28	34	***St. mutans* group**

جدول (6): تحديد الفعل التآزري للمستخلص الكحولي لبذور اليانسون مع المضادات الحيوية.

المضاد الحيوي+ المستخلص الكحولي لبذور اليانسون+ الحامض الكاربوكسيلي	مناطق التثبيط
Cloxacillin	33 mm
Streptomycin	35 mm

المصادر

[1] Li, Z.; Kolltveit, M., K.; Tronstad, L. and Olsen1, I. 2000. Systemic diseases caused by oral infection. Clin. Microbiol. Rev., 13(4): 547–558.

[2] Gupte, S. 1995. Short textbook of medical microbiology. 6th ed. Taypce. Brothers medical publishers (p) LTD. 52, 440-461.

[3] Harsh, M. L. and Nag, T. N. 1984. Antimicrobial principles from *in vitro* tissue culture of *Peganum harmala*. *J. Nat. Prod*., 47(2). 365-367.

[4] Willett, W.C.; Sampson, L.; Stampfer, M. J.; Rosner, B.; Bain, C.; Witschi, J.; Hennekens, C. H. and Speizer, F. E. 1985. Reproducibility and validity of a semiquantitative food frequency questionnaire. Am J Epidemiol., 122(1):51–65.

[5] Reineccius, G. 1994. Source book of flavours. 2nd ed. Chapman and Hall, New York.

[6] Dwyer, J. and D. Rattray. 1997. Magic and Medicine of plants. Readers Digest General books, New York.

[7] Al-Kassie, G. A. M. F.; Mohammed, M. F.; Hamood and Y. J.; Jemeel. 2008. The effect of Anise & Rosemary on the microbial balance in gastrointestinal tract for broiler chicks. Department of veterinary public health, veterinary public heath, Veterinary medicine College. Baghdad University Iraq.

[8] Macfaddin, J. F. 2000. Biochemical test for identification of medical bacteria. 3rd ed. The Williams and Wilkins Baltimore USA.

[9] Mohamoud, H. M. A. 1993. Inhibitory of black cumin (*Nigella sativa*) aganst *Lesteria monocytogenes*. Alx. J. Res., 38(1): 123-134.
[10] Al-Ani, A. H. j. 2006. Effect of some plant extracts on food spoilage microorganisms and their application to extend the shelf life of soft cheese. Ph.D. thesis Department of Biolgy, College of Science University of Mustansiriya: 138 pp.
[11] Adiquzed, A.; Gulluce, M.; Senqul, M.; Ogutcy, H.; Sahin, F. & Karamen, I. (2005). *J. Biol*., 29: 155-160.
[12] Egorove, N. S. 1985. Antibiotics scientific approach. Mir publishers. Moscow.
[13] Laurance, D. R.; Bennet, P. N. & Brown, M. J. 2004. Clinical pharmacology. 8th ed. Churchill. L. IV. Ingeston.
[14] Colee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmons, A. 1996. Maki & Mac cartney practical medical microbiology. 14th ed. Churchill Living St USA.
[15] Banson, H. J. (2002). Microbiological application laboratory manual in central microbiological 8th ed. C. V. Mosby company St. Louis.
[16] Bolukbasi, S. & Erthea, M. (2007). Effect of dietary thyme (thymes vulgaris) on laying hens performance and *Esherichia coli* concentration in feces Ataturk University Faculty of Agriculture, department of animal. Sci., 25 240, Erzum Turkey.
[17] Jawetz, E.; Melinck, J. A.; Adelbery, E. A.; Brooks, G. F. & Butel, T. S. (2004). Enterics gram negative rods. In: medical microbiology and 2nd ed. Appleton and Langue. USA: 217-229.
[18] Taylor, R. S. L.; Manandhar, N. P.; Hudson, J. and Towes, G. H. N. 1996a. Antiviral activity of Nepales medicinal plants. *J. Ethnopharmocol*., 52, pp 175-163.
[19] Assegid, G.; Eric, S. and Ingolf, Lampercht. 2004. Microbiological and different propolis extracts. Institute of zoology. Free University, 422(1-2): 115-124.
[20] Pinto, M. Si.; De Faria, J. E.; Message, D.; Cassini, S. T. A.; Pereira, C. S. and Gioso, M. M. 2001. Effect of green pepper extracts on pathogenic bacteria isolated from milk of cowswich mastitis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 38(6): 278-283.
[21] Jawetz, E.; Melnick; J. L. and Adelberyg, E. A. 1998. Medical microbiology. 21th ed. Appleton and Lang.