

Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Mehlika Benli¹, Nazife Yiğit²

Özet

Ülkemizde şifalı bitki olarak yaygın kullanımı olan *Thymus vulgaris* (Kekik) bitkisinin antimikrobiyal etkisi, üzerinde durduğumuz çalışmamızda sekiz farklı çözgen ile hazırlanan ekstraktları kullanılmıştır. Bu ekstraktlar, on dört mikroorganizma üzerinde iki farklı metotla denenmiştir. Denenen sekiz farklı ekstraktın, mikroorganizmalardan sadece *Bacillus subtilis* (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu) üzerinde antimikrobiyal aktivitesi gözlenmiştir. Denemelerimiz sonucunda uygulanan metotlardan en iyi sonuç verenin damlatma metodu olduğu ve en iyi çözgenin de Metanol ile Su + %5'lik Tween 20 karışımının olduğu kanısına varılmıştır.

Giriş

Bitkilerin tedavi amaçla kullanılmaları çok eski yıllardan beri süregelen bir uygulamadır. Dünya ülkelerinde olduğu gibi Ülkemizde de deneme yanılma yöntemiyle bulunmuş halk arasında şifalı bitkiler olarak anılan birçok bitki hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Dünya sağlık teşkilatı (WHO)'nın 91 ülke üzerinde yaptığı araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bunlardan 500 kadarının üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçlarla kullanılan bitkilerin çok azı farmakopilerde (Kodeks) kayıtlıdır. Örneğin Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Halbuki halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı çok fazladır (1).

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması ve doğal kaynaklı ilaçlarda görülmeyen veya az görülen yan etkilerin sentetik ilaçlarda dikkati çekecek kadar çok olması, bilim adamlarını doğal kaynaklı ilaçları araştırmaya itmiştir (2).

Çeşitli bilim adamları birçok tıbbi bitkiyi tanımlamış ve bu bitkisel drogların bir çoğunun etkisi bilimsel olarak kanıtlanmıştır (3).

Türkiye, mevcut bitkisel çeşitliliği yönünden oldukça dikkate değer ve zengin bir floraya sahiptir. Bu zenginlik; Üç fitocoğrafik bölgenin kesiştiği bölgede bulunması, Güney Avrupa ile Güney Batı Asya arasında köprü olması, pek çok cins ve sekiyonun orijin ve

¹ Dr., Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beşevler / Ankara. Yazışmalardan sorumlu yazarın E-posta adresi: benli@science.ankara.edu.tr

² Dr. Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yahşihan / Kırıkkale

farklılaşım merkezinin Anadolu oluşu, ekolojik ve fitocoğrafik farklılaşmanın sonucu olarak tür endemizminin yüksek olmasına neden olmuştur (4, 5).

Bu çalışmamızda halk arasında şifalı bitki olarak bilinen kekik bitkisi seçilmiştir. Kekik bitkisi çimenlik tarla kıyılarında, orman kıyılarında, ve çayırıldaki karınca yuvalarının üstünde yer almaktan hoşlanır. Güneş ve sıcak istediği için, toprak sıcaklığının fazla olduğu kayalık ve dağlık bölgelere çoğalır. Kendilerine özgü bir kokuya sahiptir. Ülkemizde kekik adı altında *Origanum* (Mercanköşk türleri) türlerinden elde edilen drogun satışı yapılmaktadır. Eterli uçucu yağ; Thymol (%50 civarında), Carvacrol, Borneol, Cymol, Pimen, Tanen ve flavonlar içerdiği bilinmektedir. Kekik öncelikle baharat olarak kullanılır. Yağlı ve ağır yemeklerin tadını zenginleştirir, sindirimi kolaylaştırır.

Şifalı bitki olarak kekiğin halk arasında genel kullanım şekilleri şöyledir: Öncelikle kramp çözücü, dezenfekte edici ve balgam söktürücü olarak kullanılmaktadır. Akciğer ve bronşlar, mide ve bağırsaklar, kekiğin başlıca kullanım alanlarıdır. Bitkinin önemli etken maddesi olan eterli uçucu yağlar kana karışıp, bronşiyal kasları etkileyerek, krampları çözücü özelliğindedir. Aynı zamanda o bölgelerde bakteri oluşumunu da önler. Öksürük ve üst solunum yolları iltihabında çay içimi ve gargara biçiminde kullanılmaktadır. Kekik iştah açar ve sindirim sistemini uyarır. Sindirim sisteminde görülen ekşimeler ve kramplı ağrılar bir bardak kekik çayı ile geçiştirilebilir. Boğmaca ve öksürük, sinir sistemi zafiyeti, romatizma ve bağırsak hastalıklarına karşı, çay içiminin yanı sıra, kekik banyoları da çok yararlıdır. Güçsüz, zayıf ve solgun çocuklara da kekik banyosu yaptırılması önerilmektedir. Kekik çayı ile ayrıca adet kanamaları dengelenmektedir. Adet zamanlarındaki kramplı ağrıları geçirilebilmektedir. Ergenlik sivilceleri iyileştirilebilmektedir. Kekik çayı içimi ve kekikle karıştırılmış bal yenmesiyle organizmayı güçlendirilebilmektedir. Kekik tentürü ile ovmak suretiyle romatizma ağrıları, sinirsel rahatsızlıklar tedavi edilebilir. Sıcak kekik yastıkları ağrılı bölgenin üstüne konularak büyük rahatlıklar sağlanabilir. Kekik, öksürük ve mide rahatsızlıklarına karşı başka bitkilerle karıştırılarak daha da başarılı biçimde kullanılabilir (6).

Bir başka şifalı bitkiler notlarına göre de kekiğin sayısız yararlarından ve kullanım şekillerinden bahsedilmektedir. Bunlardan bazıları şöyledir: Kekik vücuttaki yağları eritir, bu özelliğinden dolayı vücuttaki suyu atar. Hem kilo vermeye, hem de vücuttaki kan sirkülasyonunu hızlandırdığından dolayı kalbe faydalıdır. Böbrek taşlarının düşürülmesine yardım eder. Adet düzensizliği ve damar sertliğinde de kullanılmaktadır. Kan şekerini düşürür. Salgı bezlerini uyarıp düzenli çalışmasını sağlar. Kekiğin çiçekli sapı idrar söktürücüdür. Gaz giderici ve mide bulantısını teskin edici olarak kullanılır. Bağırsak parazitlerine karşı etkidir. Baş ağrılarına iyi gelir. Geçici olarak tansiyonu düşürür. Hafızayı kuvvetlendirir. Uykusuzluğa iyi gelir. Ağız antiseptiğidir. Diş ağrısını giderir. Çocuklarda kansızlığı önler. Egzama ve uyuz tedavisinde kullanılır. Sara krizlerine karşı da önerilir. Afrodizyaktır. Saç banyolarında kullanılırsa, kırılan, dökülen saçları canlandırır, hoş bir parlaklık verir. Kekikten doğal boyamacılıkta da yararlanır. Yapraklarından çeşitli mordanlarla bej, gri ve haki renk elde edilir. Yün ve pamuk ipliklerinin boyanmasında kullanılır. Şap hastalığına karşı hayvanın ağzı kaynatılmış kekik suyu ile yıkanır. Hayvanların dişeti iltihabında bir miktar kekik, şarapla karıştırılarak sürülür. Hamileler ve guatr olanlar kullanmamalıdır. Guatrı olanda, tecrübe edilmiştir; halsizlik, mide bulantısı, baş dönmesi, kalp çarpıntısı meydana gelmektedir. Hamile bireylerde de düşük riskini artırmaktadır. Bu yan etkilerle birlikte kekik yağının tümör yapıcı madde olduğu ve karaciğer üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinmekte ve dikkatli kullanılması önerilmektedir (7).

Bu çalışmada, şifalı bitki olarak çok sayıda kullanım şekli olan kekiğin, özellikle dezenfektan ve antiseptik olarak kullanılması dikkatimizi çekmiş, böyle bir etkinin olup olmadığını araştırmak amacı ile 14 mikroorganizma üzerinde 8 farklı çözücü ile hazırlanan kekik ekstraktları kullanılmıştır. Kekik bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi laboratuvar şartlarında test edilmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Mutfaklarımızda sıkça kullandığımız kekik bitkisinin antimikrobiyal aktivitesini test ettiğimiz çalışmamızda, marketlerde satışı sunulmuş paketler halinde bulunan kekik kullanılmıştır (Destan, Bim A.Ş için Seğmen Kardeşler A.Ş.).

Çözgen olarak: Aseton (Merck), Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck), Etil Asetat (Merck), Kloroform (Merck), Etanol (Merck), Metanol (Merck), Distile su ve %5'lik Tween (Merck) karışımı ile Distile su (Kaynatma) kullanılmıştır.

Sekiz ayrı çözgenle muamele edilen Kekiğin antimikrobiyal aktivitesi 14 mikroorganizma üzerinde denenmiştir. Bu mikroorganizmaların 4 tanesi maya , 10 tanesi de bakteri örneği olarak seçilmiştir. Bunlar: *Enterococcus gallinarum* (CDC-NJ-4), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşları (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bakteriyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu), *Saccharomyces cerevisiae* (Pakmaya), *Candida albicans* (845981), *Shigella*, *Escherichia coli*, *Candida crusei* (ATCC 6258), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Streptococcus aureus* (ATCC 29213), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Candida albicans* (90028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) suşlarıdır (Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü laboratuvarları).

Kekik Ekstraktının Hazırlanması

Kuru halde bulunan bitki iyice ufalanarak inceltilmiş, 2'şer gram tartılarak ayrı, ayrı erlenler içinde 20 ml çözgenler içine alınarak bir gece (12 saat) oda sıcaklığında bekletilmiştir. Filtre kağıdından süzülen ekstrakt şişelere konularak ağzı açık halde etüv içerisinde (40 derece) çözgenler tamamen uçana kadar bekletilmiştir. Şişe içinde ekstraktan kalan tortu üzerine 10 ml distile su ilave edilerek ağzı kapalı şişeler içinde otoklavda steril edilmiştir.

Antimikrobiyal Aktivitenin Test Edilmesi

Test edilecek mikroorganizmaların Nutrient Broth içinde aktive edilmiş bir günlük kültürleri kullanılmıştır. İki metot ile biri disk difüzyon yöntemi diğeri damlatma yöntemi olmak üzere iki ayrı metot ile ekstraktlar mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir.

Disk Difüzyon Metodu:

Stoklardan alınan mikroorganizmalar Nutrient Broth besiyeri içinde 24 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. 10⁻¹ dilüsyonu yapılan aktif kültürden steril swaplar ile önceden

hazırlanan katı Nutrient Agar besiyeri üzerine sürümleri yapılmıştır. Kısa bir süre beklenerek agarın bakteri solüsyonunu emmesi sağlanmıştır.

Sekiz farklı çözen ile hazırlanmış ekstraktlar içine diskler atılarak otoklavda 121 °C'de 15 dak. Sterilize edilmiş ve her Petri kutusuna dört ayrı ekstraktla doyurulmuş disklerden yerleştirilmiş ve 37 °C'de bir gün inkübe edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Damlatma metodu:

Nutrient Agar besiyerleri üzerine swap yöntemi ile bir günlük aktif kültürlerden bakteri aşılı plaklar disk difüzyon yönteminde olduğu gibi hazırlanmıştır. Bir süre beklendikten sonra her Petri kutusuna farklı dört ekstraktan 20 'şer µl olarak damlatılmıştır. Damlaların kurumaması beklendikten sonra etüvde 37 °C' de bir gün inkübe edilerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bulgular

Sekiz farklı çözen içinde hazırlanan ekstraktların mikroorganizmalara denenmesi sonucunda: On dört mikroorganizmadan sadece *Bacillus subtilis* üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Şekil 1). Disk difüzyon ve damlatma metodunda birbirine paralel sonuçlar elde edilmiştir.

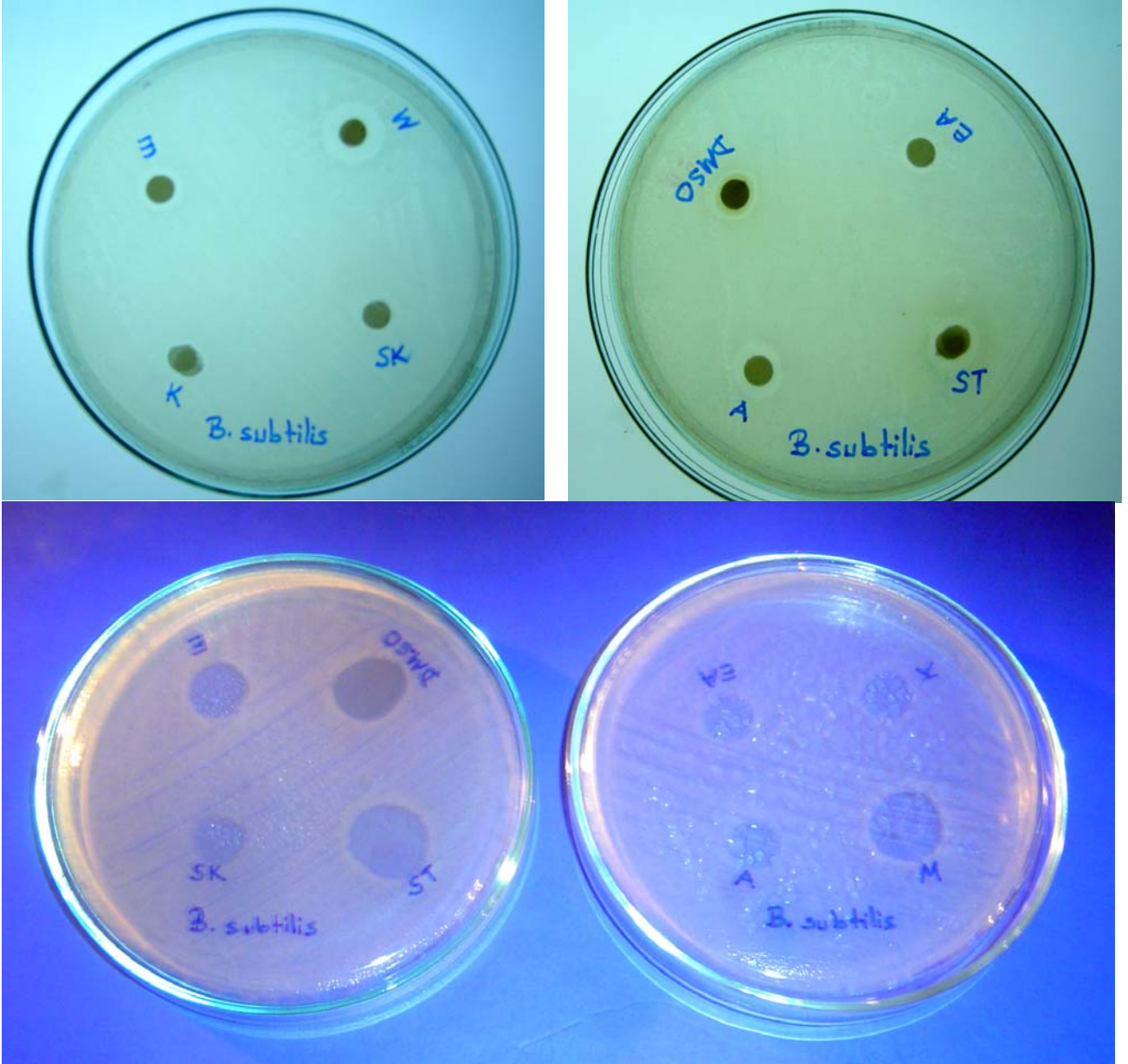
Disk difüzyon metodunda en fazla inhibisyon zonu veren çözen Metanol (13 mm) olmuştur, onu su + %5 Tween 20 karışımı (11 mm), Aseton (10 mm) ve Dimetilsülfoksit (10 mm), Su ile kaynatma (9 mm) ve Etanol (9 mm), Kloroform (8 mm) ve Etil asetat (7 mm) izlemiştir (Tablo 1).

Damlatma metodunda ise inhibisyon zonları daha netlikle izlenebilmiş ve en fazla inhibisyon zonu Su +Tween 20 (16 mm), Metanol ve Dimetilsülfoksit (15 mm)'de gözlenirken, sırasıyla Kloroform ve Etil asetat (10 mm), Etanol (9,5 mm), Su ile kaynatma (9 mm) ve Aseton (8 mm) belirgin zon çapları ile diğerlerini izlemiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Disk difüzyon ve Damlatma metodu ile *Bacillus subtilis* üzerinde denenilen sekiz ayrı çözenle hazırlanmış Kekik ekstraktlarının oluşturduğu inhibisyon zon çapları.

Ekstrakt Çözenleri	Disk Difüzyon Metodu İnhibisyon Zon Çapı	Damlatma Metodu İnhibisyon Zon Çapı
Aseton	10 mm	8 mm
Dimetilsülfoksit	10 mm	15 mm
Etil Asetat	7 mm	10 mm
Su + %5 Tween 20	11 mm	16 mm
Su ile kaynatma	9 mm	9 mm
Kloroform	8 mm	10 mm
Etanol	9 mm	9,5 mm
Metanol	13 mm	15 mm

Bitki ekstraktlarına doyurulmuş disklerle yapılan denemelerde ekstrakt yeterli gelmemiş ve disk etrafında zonların görülmüş fakat damlatma metodunda daha net bir inhibisyon zonu izlenebilmiştir.



Şekil 1. A. Disk difüzyon metodu uygulanan, dört farklı çözügen, E: Etanol, M: Metanol, K: Kloroform ve SK: Su ile kaynatılarak hazırlanmış ekstraktların *Bacillus subtilis* üzerine etkisi ve meydana gelen inhibisyon zonları. **B.** Disk difüzyon metodu uygulanan diğer dört farklı çözügen, A: Aseton, DMSO: Dimetil sülfoksit, EA: Etil asetat, ST: Su ve %5'lik Tween 20 karışımı ile hazırlanmış ekstraktların *Bacillus subtilis* üzerine etkisi ve meydana gelen inhibisyon zonları. **C.** Disk difüzyon metodunda uygulanan ekstraktların damlatma metodunda vermiş olduğu inhibisyon zonları.

Sekiz farklı çözügen ile hazırlanan ekstraktlardan en iyi sonuç veren çözügenin en fazla inhibisyon zonu oluşturduğu düşünülerek, Su + %5'lik Tween karışımı (16 mm inhibisyon zonu) ve metanol (15 mm inhibisyon zonu) olduğu saptanmıştır.

Tartışma

Yemeklere lezzet verici ve şifalı bitki olarak kullanılan Kekiğin antimikrobiyal etkisinin araştırdığımız çalışmamızda, on dört mikroorganizma üzerinde sekiz farklı çözgen ile hazırlanan kekik ekstraktları kullanılmıştır. Deneme sonuçlarına göre sadece *Bacillus subtilis* üzerinde tüm çözgenlerde antimikrobiyal aktivite gözlemlenmiştir. Disk difüzyon ve damlatma metotlarından en net sonucu damlatma metodu vermiştir. Ekstraksiyon işlemi de en etkili çözgenin Metanol ve Su + %5 Tween 20 karışımının olduğu saptanmıştır.

Bitkilerin antimikrobiyal etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda esansiyel yağlar üzerinde durulmakta ve mikroorganizmalar üzerinde inhibitör etkisinin varlığı vurgulanmaktadır.

İki Kekik türü ile birlikte altı farklı bitkiden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada denenen bütün bitkilerin esansiyel yağları izole edilerek bakteriler üzerine denenmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* üzerinde antimikrobiyal aktivite gözlenirken, *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde etkisiz olduğu saptanmıştır (8).

Yugoslavya'da kekiğin dahil olduğu familyanın bir üyesi olan ve doğal olarak yetişen *Achillea serbica* bitkisinden elde edilen esansiyel yağların antimikrobiyal aktivitesi incelenmiş ve Gram pozitif bakteriler olan *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve gram pozitif *S. aureus*, üzerinde zayıf antimikrobiyal aktivite gözlenirken *P. aeruginosa* 'ya karşı etkisiz olduğu belirlenmiştir (9).

Kekik bitkisinin dahil olduğu Lamiacea familyasından *Acinos* cinsine ait üç tür; *A. arvensis*, *A. hungaricus* ve *A. alpinus*, iki farklı lokaliteden toplanmış ve esansiyel yağlarının antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. En fazla etki *A. Arvensis* 'de sonra *A. alpinus* 'da gözlenmiş, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* üzerinde etkili oldukları saptanmıştır. *A. hungaricus* ise sadece *E. coli* üzerinde etkili olmuştur (10).

Karabiber, karanfil, ıtır, muskat tohumu, farekulağı (mercanköşk) ve kekik bitkilerinin uçucu yağları 25 farklı bakteri cinsine karşı antimikrobiyal aktivitesi denenmiş, hayvan ve bitki patojeni olan bu bakterilere karşı çeşitli derecelerde etkili oldukları gözlenmiştir (11).

Kekik bitkisinin esansiyel yağlarının 9 Gram negatif bakteri ve 6 Gram pozitif bakteri üzerinde denendiği bir başka çalışmada bütün test mikroorganizmalarına karşı bakteriyostatik aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir. Bitkinin çiçeklerinden elde edilen esansiyel yağların en etkili olduğu bulunmuştur (12).

Akdeniz bölgesinden toplanan *Satureja montana*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris* ve *Calamintha nepeta* 'dan elde edilen esansiyel yağların kimyasal analizleri ve toksik etki miktarları test edilmiş, dört bitkiden elde edilen yağın da biyotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bitkiler içinde en fazla etki *Calamintha* ve *Thymus* 'da gözlenmiştir (13).

Labiatae familyasından, *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum*, *Myrtaceae* familyasından *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca viridiflora* ve *Compositae* familyasından *Helichrysum lavanduloides*, *H. bracteiferum*, *H. gymnocephalum*, *Psiadia altissima* 'a ait esansiyel yağlar enteropatojenik olan ve gıda zehirlenmelerine yol açan 12 bakteri suşu üzerinde denenmiştir. *Thymus vulgaris*, *Ocimum gratissimum* ve *Eugenia caryophyllata* 'dan elde edilen esansiyel yağların geniş spektruma sahip olduğu belirlenmiştir. *Melaleuca viridiflora*

bitkisinin aynı zamanda özellikle Gram pozitif bakteriler üzerinde inhibitör etkisinin olduğu belirlenmiştir (14).

Yirmibir bitkinin esansiyel yağlarının ve iki esansın antimikrobiyal özellikleri 5 gıda patojenine karşı denenmiştir. Bu gıda patojenleri: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Listeria monocytogenes* 'dır. Bitkilerden defne, kimyon ve kekik en fazla inhibitör etkiye sahiptir. Beş patojene birden bakteriyostatik etkileri gözlenmiştir. Araştırma bulgularına göre genelde Gram pozitif bakteriler Gram negatif bakterilere göre esansiyel yağlara daha duyarlıdır. Esansiyel yağlara en dirençli bakteri ise *Campylobacter jejuni*, en duyarlı olan ise *Listeria monocytogenes* 'dir (15).

Defne, farekulağı, karanfil ve kekik bitkisinin iki varyetesi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada, bitki esansiyel yağları *E. coli* üzerinde denenmiştir. Fare kulağı ve kekiğin iki varyetesi en güçlü bakteriyostatik ve bakterisidal etkiye sahip olduğu ve bunları defne ve karanfilin takip ettiği gösterilmiştir (16).

Bütün bu çalışmalarda da anlaşılabilceği gibi halk arasında yaygın olarak kullanılan kekik bitkisinin antimikrobiyal aktivitesi söz konusudur. Kekik ile yapılan çalışmalarda daha çok bitkinin esansiyel yağları izole edilmiş ve bunlar mikroorganizmalar üzerinde denenmiştir. Bizim çalışmamızda kekik bitkisinin değişik çözenlerle hazırlanmış ekstraktları kullanılmıştır. Bir mikroorganizmada dahi olsa antimikrobiyal etkinin gözlenmesi, bize eterik yağ içeren bitkilerin tedavi amaçlı olarak kullanılabileceğini ve sentetik antibiyotiklere alternatif olabileceğini göstermiştir.

Kaynaklar

1. Kırbağ, S.,1999. *Hypericum perforatum* L. 'un Değişik Ekstraktlarının Antimikrobiyal Etkileri., Journal of Qafqaz University , 2(1) 102-108.
2. Dürger,B., Ceyhan, M., Alitsaous, M., Uğurlu, E.,1999. *Artemisia absinthium* L. (Pelin)'un Antimikrobiyal Aktivitesi. J. Of Biology , 23: 377-384.
3. Ertürk, Ö., Demirbağ, Z., 2003. *Scorzonare mollis* Bieb (Compositae) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi., Ekoloji Çevre Dergisi, 12(47)27-31.
4. Tan, A., 1992. Türkiye'de Bitkisel Çeşitlilik ve Bitki Genetik kaynakları, Anadolu J. Of AARI 2:50-64 MARA, İzmir.
5. Dağcı, E.K.,İzmirli, M., Dığrak, M., 2002. Kahramanmaraş İlinde Yetişen Bazı Ağaç Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Araştırılması. KSU Fen ve Mühendislik Dergisi 5(1) 38-46, Kahramanmaraş.
6. Anonymous. 2005. www.bitkisel-tedavi.com/kekik.htm - 20k
7. Anonymous. 2005. www.lokman-hekim.com/kekikotu.htm - 12k
8. Lisin, G., Safiyev, S., Craker, L.E., 1999. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils. Acta Hort. (ISHS) 501:283-288.
9. Anonymous. 2005. http://www.amapseec.org/cmapseec.1/abstracts/abs_p111.htm
10. Anonymous. 2005. http://www.amapseec.org/cmapseec.1/abstracts/abs_p112.htm
11. Dorman H.,J, Deans S.,G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88(2):308-316.
12. Marino M., Bersani C., Comi G., 1999. Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. Measured using a bioimpedometric method. J Food Prot, 62(9):1017-1023.

13. Panizzi L, Flamini G, Cioni PL, Morelli I.1993.Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J Ethnopharmacol*, 39(3):167-170.
14. Ramanoelina A.,R., Terrom G.,P., Bianchini J.,P., Coulanges P., 1987. Antibacterial action of essential oils extracted from Madagascar plants. *Arch Inst Pasteur Madagascar*, 53(1):217-226.
15. Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L., 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters Applied Microbiol* 26:118-122.
16. Burt S.A., Reinders., R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 :H7., *Lett Appl Microbiol*, 36(3):162-167.