

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTERIENNE DE L'HUILE ESSENTIELLE ET DE L'EXTRAIT MÉTHANOLIQUE DU ROMARIN *ROSMARINUS OFFICINALIS L.*

MOUAS Yamina^{1*}, BENREBIHA Fatma Zohra¹, CHAOUIA Cherifa¹.

1. Université de Blida1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département des Biotechnologies. Laboratoire en Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, route de Soumaa, Blida 09000, Algérie

Reçu le 21/05/2017, Révisé le 21/06/2017, Accepté et mis en ligne le 30/06/2017

Résumé

Description du sujet : Le romarin (*Rosmarinus officinalis L.*) est une plante médicinale, il est intéressant de connaître ses vertus thérapeutiques, afin de remplacer les produits synthétiques par des molécules bioactives qui sont à base de plantes.

Objectifs : L'étude consiste à évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de romarin spontané sur cinq souches de bactérie. Notre travail de recherche a porté sur le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique en fonction des régions : Blida et Djelfa, appartenant à des climats humide et semi-aride d'Algérie.

Méthodes : L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydro distillation. L'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique, vis-à-vis les souches bactériennes testées. La méthode de diffusion sur milieu gélosé a permis de déterminer les diamètres des zones d'inhibition.

Résultats : Les tests antibactériens montrent que quatre souches bactériennes sur cinq testées sont sensibles à l'huiles essentielle de romarin des écotypes Blida et Djelfa. Pour l'extrait méthanolique, trois souches sur cinq ont montré une sensibilité. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique du romarin des deux écotypes ont montré une activité antibactérienne importante vis-à-vis les bactéries à Gram⁺ comparées aux bactéries à Gram⁻.

Conclusion : L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de l'écotype Blida ont montré une activité antibactérienne plus élevée que ceux de l'écotype Djelfa. L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives.

Mots clés : *Rosmarinus officinalis L.*, effet antibactérien, huile essentielle, extrait méthanolique, Ecotype.

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL AND THE METHANOLIC EXTRACT OF THE ROSEMARY *ROSMARINUS OFFICINALIS L.*

Abstract

Description of the subject: The rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) is a medicinal plant, it is interesting to know its therapeutic virtues, to replace the synthetic products by bioactive molecules which are with plants.

Objective: The study consists in evaluating the antibacterial activity of the essential oil and the methanolic extract of spontaneous rosemary on five strains of bacteria. Our research has focused on the antibacterial power of essential oil and methanolic extract according to the regions: Blida and Djelfa, belonging to the humid and semi-arid climates of Algeria.

Methods: The Extraction of the essential oil was carried out by hydro distillation. The aromatogram showed the antibacterial potency of the essential oil and the methanol extract, with respect to the bacterial strains tested. The diffusion method on agar medium allowed to determine the diameters of the zones of inhibition.

Results: The Antibacterial tests show that four bacterial strains on five tested are sensitive to Rosemary essential oils of the ecotypes from Blida and Djelfa ecotypes. For the methanolic extract, three strains on five showed sensitivity. The essential oil and the methanolic extract of the rosemary of the two ecotypes, showed an important antibacterial activity towards Gram⁺ bacteria compared to Gram⁻ bacteria.

Conclusion: The essential oil and the methanolic extract of the Blida ecotype showed a higher antibacterial activity than those of the Djelfa ecotype. All these obtained results are only a first stage in the search for biologically active substances of natural origin.

Keywords: *Rosmarinus officinalis L.*; Antibacterial effect, essential oil; methanolic extract; Ecotype.

*Auteur correspondant: Université de Blida1. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Département des Biotechnologies. Laboratoire de Biotechnologie des Productions Végétales, B.P. 270, route de Soumaa, Blida 09000, Algérie, E-mail : aminaagro@outlook.com.

INTRODUCTION

Les plantes médicinales et aromatiques furent utilisées par l'homme depuis l'antiquité. De nos jours leur utilisation a pris un essor considérable dans les industries de parfum, produits cosmétiques et pharmaceutiques. Les plantes sont la source principale de substances actives où au moins 35 000 espèces sont utilisées dans le monde. L'Algérie avec sa diversité de climats et de sols, sa situation géographique et ses reliefs, présente une flore de 3 510 espèces dont 450 espèces sont répertoriées dans les hauts plateaux et le grand sud du pays [1].

Le romarin *Rosmarinus officinalis* L. est une plante médicinale originaire du bassin méditerranéen qui pousse à l'état sauvage. Le romarin aime les terrains calcaires et s'accommode très bien des contrées arides et rocailleuses. On le reconnaît aisément, toute l'année. Ce sont les feuilles, les sommités fleuries, qu'on aura pris le soin de sécher, ou l'huile essentielle qui sont utilisées en phytothérapie.

Le romarin a fait l'objet de récentes recherches dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire. Il possède des propriétés anti-inflammatoires et antispasmodiques [2] et une action sur le système nerveux [3, 4]. Le romarin possède d'excellentes propriétés antioxydante et antimicrobienne [5, 6]. Le romarin, comme toutes les plantes aromatiques et médicinales, contient des composés chimiques ayant des propriétés antibactériennes. L'utilisation de ces molécules à base de plantes peut présenter de nombreux avantages par rapport aux produits de synthèse actuels.

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *Rosmarinus officinalis* L. de deux écotypes Blida et Djelfa (Algérie), sur cinq souches de bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Le matériel végétal provient de deux régions différentes Blida et Djelfa, appartenant à des climats humide et semi-aride.

Le choix des régions d'échantillonnage a été fait en se basant sur une étude faite concernant le dosage des paramètres physiologiques et biochimiques de *Rosmarinus officinalis* L. des deux écotypes Blida et Djelfa, et qui a révélé l'existence d'une corrélation entre la variation des conditions climatiques et la réponse des écotypes [7]. Donc, l'objectif du choix des régions est de mettre en lumière l'influence du facteur région (climat) sur les paramètres étudiés (activité antibactérienne).

1. Présentation de la zone d'étude

1.1. Région de Blida

La wilaya de Blida se situe au nord de l'Algérie. Elle comporte principalement une importante plaine : la Mitidja, zone agricole riche ; et d'une chaîne de montagnes au Sud : l'Atlas Blidien. Elle appartient à l'étage bioclimatique humide. Le site de prélèvement des échantillons se situe à Sidi EL Kebir.

1.2. Région de Djelfa

La wilaya de Djelfa fait partie de la région des hauts plateaux, elle se situe dans la partie centrale de l'Algérie, comprise entre 2° et 5° de longitude Est, et entre 33 ° et 35° de latitude Nord. Elle appartient à l'étage bioclimatique aride. Le site de prélèvement des échantillons se situe à Ain Ouessara.

2. Matériel végétal

Les parties aériennes de *Rosmarinus officinalis* L. ont été collectées en mois d'avril, sur des arbustes d'apparence saine. La matière végétale, cueillie, a été séchée à l'air libre, à l'ombre jusqu'à la stabilisation de son poids (7 jours) [8].

3. Matériel microbiologique

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de *Rosmarinus officinalis* L., cinq souches bactériennes ont été utilisées. Les souches testées sont largement rencontrées dans diverses pathologies chez l'homme (Tableau 1). Ces souches bactériennes ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie et Mycologie de l'EPH de Hadjout, après avoir été purifiées et identifiées.

Tableau 1 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées

Souches bactériennes testées	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	- Infection hospitalière. - Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire - Infections mortelles chez l'homme.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gram +	-Le tube digestif	- Inflammations chroniques de l'intestin. - Infection de la vessie et de la prostate.
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +	-Les sols et eaux	- Un contaminant des aliments d'origine végétale (riz, épices) - Un contaminant des drogues et de médicaments. -Toxi-infection alimentaire
<i>Escherichia coli</i>	Gram +	- Le tube digestif	- Infections urinaires - Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites. - Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram +	- Eau et sols humides - Surface des végétaux.	- Infections nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées) - Infections urinaires, oculaires et pulmonaires.

Source : [9, 10,11]

4. Méthodes

4.1. Extraction des huiles essentielle de romarin

L'extraction de l'huile essentielle a été faite par la méthode d'hydrodistillation des feuilles sèches de la plante durant 2 heures, à l'aide d'un appareil de type Clevenger. Les vapeurs chargés d'huile, en traversant un réfrigérant, se condensent et sont récupérées dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent par différence de densité. L'huile récupérée est déshydratée par le sulfate de sodium (Na₂SO₄) et conservée à + 5°C.

4.2. Préparation de l'extrait méthanolique de romarin

Les feuilles sèches de romarin ont été broyées et conservées dans des flacons en verre, hermétiquement fermés, à basse température. Une prise de 10g de la poudre végétale a été mise à macérer dans 100 ml de méthanol sous agitation pendant 24 heures à une température 25 ± 2°C. L'extrait obtenu a

été filtré et évaporé à sec sous pression réduite à 50 °C au rotavapeur. Le résidu sec est repris par 3 ml du méthanol et conservé à température -18°C jusqu'à son utilisation [12].

4.3. Etude de l'activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique de romarin des deux régions, nous avons utilisé la méthode d'aromatogramme, c'est une méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé [13].

La gélose de Mueller Hinton stérile est coulé dans des boîtes de pétri à raison de 15 ml par boîte puis laissées refroidir. L'inoculum bactérien, ajusté à 0.5 Mc Farland et d'une concentration de 10⁷UFC/ml, est frotté sur la totalité de la surface de Mueller Hinton de haut en bas en stries serrées [14]. Des disques de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre, sont stérilisés dans du papier aluminium à l'autoclave à 121 °C pendant 15 mn.

A l'aide d'une pince stérile, les disques imprégnés d'une quantité d'huile essentielle (brut) et d'une solution de l'extrait méthanolique préalablement dissouts dans le di-méthylsulfoxyde (DMSO), ont été déposés à la surface des boites de pétri ensemencées par les souches à tester. Les boites sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température

ambiante pendant 30 mn et mise à l'étuve à une température de 37°C pendant 24 heures. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque, en mm. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peuvent être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle ou de l'extrait méthanolique [15] (Tableau 2)

Tableau 2 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition.

Sensibilité	Zone d'inhibition
Non sensible ou résistante (-)	diamètre < 8mm
Sensible (+)	diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	diamètre compris entre 15 à 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	diamètre > 20 mm

Source : [15]

4.4. Dispositif expérimental

Pour chaque souche bactérienne les essais (tests) ont été répétés dix (10) fois pour chaque huile essentielle (Blida et Djelfa) et pour chaque extrait méthanolique (Blida et Djelfa), soit 200 essais au total.

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée par le logiciel SPSS© (version 20). Les résultats obtenus ont été soumis à une analyse de la variance (MANOVA) à un niveau de probabilité de 5%.

RÉSULTATS

1. Évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits du romarin vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

Les huiles essentielles des deux écotypes Blida et Djelfa ont inhibé la croissance de *Staphylococcus aureus* avec respectivement 23,75 mm et 16,75 mm. *Staphylococcus aureus* a montré une sensibilité envers l'extraits méthanolique du romarin des deux écotypes, avec respectivement 15,5 mm et 13,25 mm.

Nous remarquons que l'huile essentielle de romarin a un pouvoir antimicrobien plus élevé que celui de l'extrait méthanolique (Fig. 1)

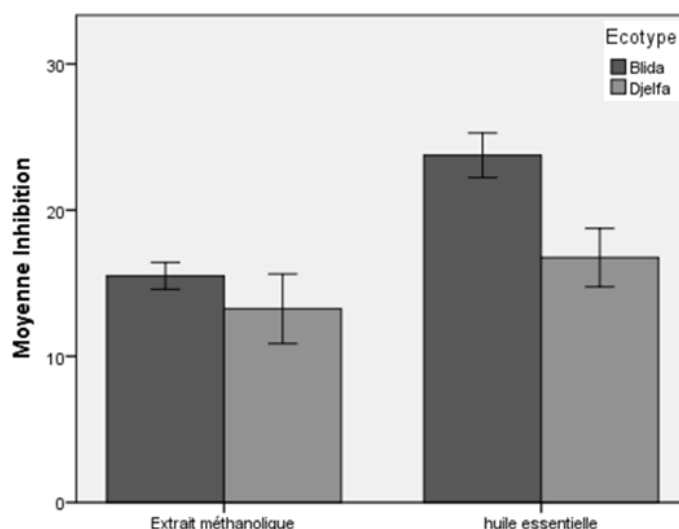


Figure 1: Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

1. Évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits du romarin vis-à-vis *Enterococcus faecalis*

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de l'écotype Blida présente une activité antimicrobienne importante contre *Enterococcus faecalis* par rapport à celui de Djelfa, avec respectivement 22.75 mm et 14.25 mm. L'extrait méthanolique des deux écotypes Blida et Djelfa a inhibé la croissance d'*Enterococcus faecalis* à des diamètres de 15.5 mm et 14 mm respectivement. (Fig. 2).

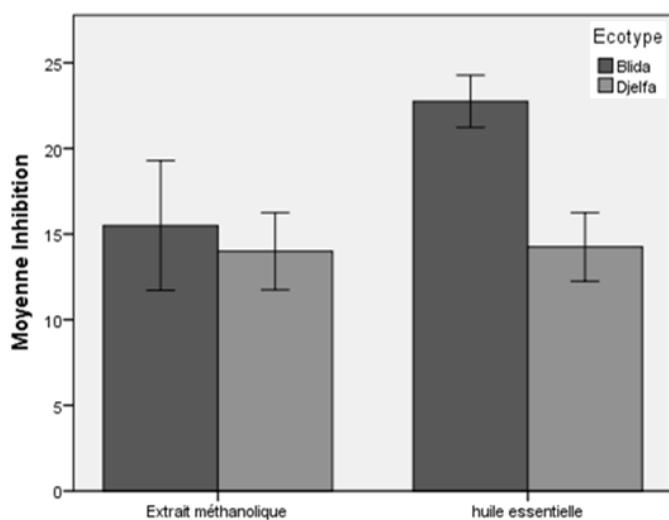


Figure 2: Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Enterococcus faecalis*

2. Évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits du romarin vis-à-vis *Bacillus cereus*.

Les huiles essentielles des deux écotypes ont inhibé la croissance bactérienne de *Bacillus cereus* avec un diamètre de 11,75 mm. *Bacillus cereus* a montré une sensibilité envers l'extrait méthanolique des deux écotypes Blida et Djelfa, avec respectivement 17.25 mm et 13.75 mm. L'extrait méthanolique de romarin a un pouvoir antimicrobien plus élevé que celui de l'huile essentielle, vis-à-vis *Bacillus cereus* (Fig. 3).

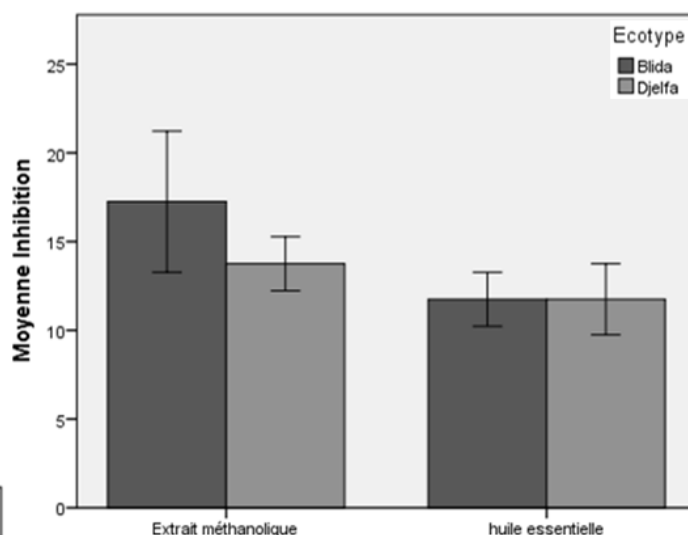


Figure 3: Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Bacillus cereus*

3. Évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits du romarin vis-à-vis *Escherichia coli*.

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de l'écotype Blida présente une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli* presque égale à celui de Djelfa, avec 9,25 mm et 9,5 mm respectivement. L'extrait méthanolique des deux écotypes Blida et Djelfa a inhibé la croissance d'*Escherichia coli* à un diamètre de 7 mm (Fig. 4).

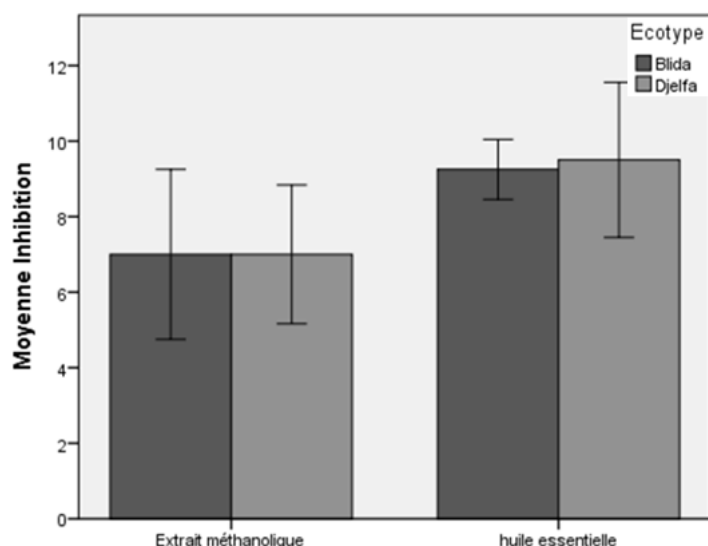


Figure 4: Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Escherichia coli*

4. Évaluation de l'activité antibactérienne des deux extraits du romarin vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après les résultats aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée concernant *Pseudomonas aeruginosa*, et ce pour les deux extraits de romarin des deux écotypes (Fig. 5).

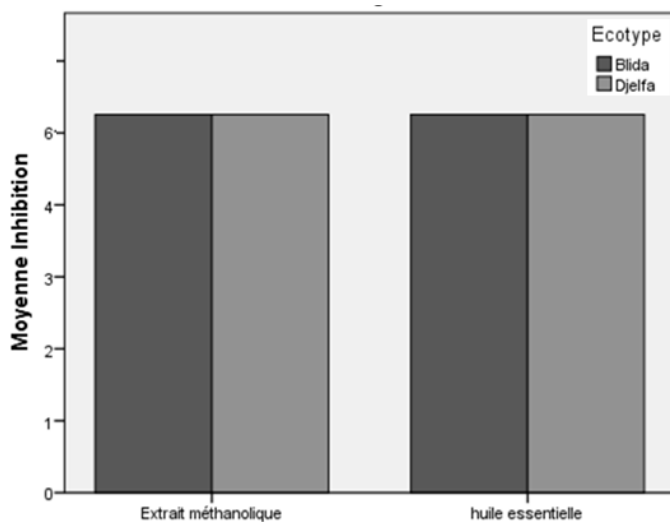


Figure 5: Pouvoir antibactérien des deux extraits du romarin vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*

DISCUSSION

Les résultats indiquent que l'huile essentielle du *Rosmarinus officinalis* L. des deux régions Blida et Djelfa possède une bonne activité contre les bactéries testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa*. Les données indiquent que les souches les plus sensibles aux huiles essentielles des deux écotypes Blida et Djelfa sont *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* avec respectivement un diamètre de 23,75 mm et 22,75 mm pour Blida et 16,75 mm et 14,25 mm pour Djelfa. Par contre à ces deux souches, on a trouvé les mêmes diamètres pour *Bacillus cereus* et *Escherichia coli* qui sont respectivement 11,75 mm et 9,5 mm.

A partir de ces comparaisons on peut dire que l'huile essentielle de *Rosmarinu officinalis* L. de Blida présente une activité antimicrobienne plus élevée que celle de Djelfa. Ainsi, on peut constater que l'activité antimicrobienne dépend de la qualité d'huile essentielle (écotype) d'une part et dans une autre part de la souche bactérienne elle-même.

La sensibilité d'un microorganisme à l'huile essentielle dépend des propriétés de l'huile et le microorganisme [16].

Lorsqu'on compare les degrés de sensibilité des souches *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* à Gram+ avec les autres à Gram- : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, on trouve que nos résultats sont comparables à ceux confirmant que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles à l'huile essentielle que les bactéries à Gram - [17]

L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de romarin (Blida et Djelfa) ont montré une activité importante sur les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif, ceci est dû aux différences structurales de leurs membranes externes [18].

La grande résistance des bactéries Gram - à l'huile essentielle est liée à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contiennent une double membrane, contrairement à la structure membranaire simple des bactéries Gram +.

Les extraits méthanoliques du romarin des deux écotypes ont inhibé la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus* ; alors que pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* aucune zone d'inhibition n'a été observé.

Concernant l'extrait méthanolique des deux écotypes Blida et Djelfa, l'effet antibactérien le plus élevé est celui appliqué sur *Bacillus cereus*, traduit par un diamètre de 17,25 mm et 13,75 mm respectivement. Un diamètre de 15,5 mm est obtenu par l'extrait méthanolique de Blida contre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, alors que pour celui de Djelfa on a trouvé respectivement 13,25 mm et 14 mm. On constate que les diamètres obtenus par l'extrait méthanolique de Blida sont un peu élevés que ceux de Djelfa.

Les résultats ont montré que les souches bactériennes testées sont plus ou moins sensibles vis-à-vis l'huile essentielle et l'extrait méthanolique du romarin. Donc, on peut déduire que nos extraits sont actifs sur les souches bactériennes testées, sauf *Pseudomonas aeruginosa* qui est une bactérie résistante.

L'étude du pouvoir antimicrobien des huiles essentielles et de l'extrait méthanolique de *Rosmarinus officinalis* L. a permis de visualiser une action inhibitrice plus intéressante de l'huile essentielle par rapport à l'extrait méthanolique.

CONCLUSION

La méthode d'aromatogramme a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin (Blida et Djelfa), vis-à-vis les cinq souches bactériennes testées. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de *Rosmarinus Officinalis* L. des deux écotypes Blida et Djelfa, ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries à Gram positif que les bactéries à Gram négatif. L'huile essentielle et l'extrait méthanolique de l'écotype Blida ont montré une activité antibactérienne plus importante que ceux de l'écotype Djelfa. L'huile essentielle de *Rosmarinus Officinalis* L. a montré une activité antibactérienne plus importante que l'extrait méthanolique de la même plante.

A la suite de ces résultats, il serait intéressant d'étendre l'éventail des tests antimicrobiens sur d'autres agents microbiens afin de confirmer leur efficacité. Comme il est indispensable de chercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action. L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active. Une analyse chimique est souhaitable pour obtenir une vue plus approfondie sur la composition qualitative et quantitative de ces extraits étudiés afin de mettre en lumière l'effet thérapeutique de cette plante médicinale *Rosmarinus officinalis* L.

RÉFÉRENCES

[1]. **Quezel P. et Medail F. (1995).** La région circumméditerranéenne, Centre mondial majeur de biodiversité végétale. Institut Méditerranéen d'Ecologie et de la Paléoécologie, France, 152-55.

[2]. **A. Gianmario, S. Silvio, P.A. Rita, M. Teresa, D. Roberto, T. Aurelia. (2007).** Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (5): 1718-1723.

- [3]. **M. E. Gonzalez, E. I. Pena, A. L. Martinez, J. Moreno, P. Guevara-Fefer, M. Deciga-Camps, F. L. Lopez-Munoz. (2007).** Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 476-482.
- [4]. **I. Suzana, R. Katarina, G. Dusan, R. Mirjana. (2007).** A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L.. *Journal of Food Chemistry* 104, 774-782.
- [5]. **Jones C. (1998).** Rosemary's Whole-Plant Properties Counter Cancer. *Nutrition Sciences News*, 1-4.
- [6]. **Thoresen M.A., Hildebrand K.S. (2003).** Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification. *Journal of Chromatography A.*, 119-125.
- [7]. **Mouas Y., Djemal H., Megdad F., Benrebihia F.Z. (2016).** Etude de l'influence de trois écotypes différents (Blida, Djelfa et Msila) sur la variation des paramètres physiologiques et biochimiques du romarin *Rosmarinus officinalis* L. *Revue Agrobiologia*, 6 (1): 96-100.
- [8]. **S. AYADI, C. JERRIBI, M. ABDERRABBA. (2011).** Extraction et étude des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* cueillie dans trois régions différentes de la Tunisie. *Journal de la Société Algérienne de Chimie* 21(1): 25-33.
- [9]. **Dellaras C. (2007).** *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et Documentation.* Lavoisier, Paris. 654 p.
- [10]. **Joli B. et Reynaud A. (2002).** *Entérobactéries : Systématique et méthode de diagnostic. Technique et Documentation.* Lavoisier, Paris. 392 p.
- [11]. **Hart T. et Shears P. (1997).** *Atlas de poche de microbiologie. Medicine-sciences.* Lavoisier, 314p.

- [12]. **Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bourouai N., Trabelsi N., Boulaaba M., Abdely C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus de Biologie* 331: 372-379.
- [13]. **Bendjelali B., Tantaoui E.A., Esmaili-Alaoui M. (1986).** Méthodes d'études des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie* 20: 155-167.
- [14]. **Bendahou M., Benyoucef M., Benkada D., Soussa Elisa M.B.D., Galvao E.L., Marque M.M.O., Muselli A., Desjobert J.M., Bernardini A.F., Costa J. (2007).** Influence of the processus extraction on essential oil of *Origanum glandulosum*. *Journal of applied sciences* 7(8): 1152-1157.
- [15]. **Ponce A.G., Fritz R., Delvalle C. et Roura S.I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologic* 36: 679-684.
- [16]. **Kalemba D. et Kunicka A. (2003).** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 10: 813-829.
- [17]. **Poole K. (2001).** Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4: 500-508.
- [18]. **Burt S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.