

بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس بر باکتری‌های اشیریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس فلاووس

محمدثه محبوبی^{۱*}، محمدمهردی فیض‌آبادی^۲

- ۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، بخش میکروب‌شناسی، شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان
- ۲- دانشیار، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران
- * آدرس مکاتبه: کاشان، کیلومتر ۵ مشهد اردنه، بخش میکروب‌شناسی شرکت داروسازی باریج اسانس
صندوق پستی: ۰۸۶۴۳۶۰۲۱۱۲، تلفن: ۰۸۶۶۴۳۶۰۲۱۸۷، نمبر: ۰۸۶۶۴۳۶۰۲۱۱۲
پست الکترونیک: mahboubi@barijessence.com

تاریخ تصویب: ۸۸/۲/۷

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱۱

چکیده

مقدمه: حضور پاتوژن‌های بیماری‌زا در مرغداری، سلامت طیور و انسان را تهدید می‌نماید. گیاهان آویشن^۱، مرزنجوش^۲، مرزه^۳ و اکالیپتوس^۴ از گیاهان دارویی با اثرات درمانی فراوان هستند.

هدف: بررسی اثرات ضدمیکروبی هریک از این اسانس‌ها به صورت جداگانه و یا به صورت ترکیبی بر سوش‌های مختلف اشیریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم، آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس فلاووس در شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

روش بررسی: در ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی بر سوش‌های میکروبی از دو روش انتشار در آکار و رقیق سازی لوله‌ای استفاده شد.

نتایج: نشان داد اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه از اسانس اکالیپتوس اثر ضدمیکروبی بیشتری دارد. استفاده از اتانول به عنوان پایه حلال در مقایسه با دی متیل سولفوکساید اثر ضدمیکروبی اسانس را افزایش می‌دهد. نوع حلال، تفاوت معنی‌داری در اثر بخشی اسانس ایجاد می‌نماید ($p < 0.001$) و در روش انتشار در آکار، قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها و آسپرژیلوس نایجر از آسپرژیلوس فلاووس نسبت به اسانس‌های گیاهی حساس‌تر بودند. حساسیت باکتری‌ها نسبت به اسانس‌ها به نوع باکتری و نوع اسانس بستگی دارد. اسانس‌ها بر قارچ‌ها اثر مهاری دارند و اثر قارچ‌کشی اسانس‌های گیاهی از اثر باکتری‌کشی آن‌ها ضعیفتر است.

نتیجه گیری: اثر ضدمیکروبی اسانس‌های مرزنجوش، آویشن و مرزه مربوط به جزء تیمول و کارواکرول به ویژه تیمول آن است. با توجه به نتایج به دست آمده و محدودیت استفاده از ترکیبات شیمیایی در مرغداری‌ها، ضرورت جایگزینی مواد شیمیایی با اسانس‌ها می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آتی، به منظور ساخت ضدغ Fonci کننده‌ها و مکمل‌های غذایی جهت کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

گل واژگان: مرغداری، آویشن، مرزنجوش، مرزه، اکالیپتوس، اسانس‌های گیاهی

¹ Zataria multiflora

² Origanum majorana

³ Satureja hortensis

⁴ Eucalyptus globules



مقدمه

کوکسیدیا^۱ را در جوجه‌های گوشتی کاهش دهد [۶]. مطالعات مختلفی انجام شده که در آن اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس به تنها ی روی میکروارگانیسم‌های مختلف بررسی شده است [۷,۸,۹] ولی مطالعه‌ای که در آن اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی مرزنجوش، مرزه، آویشن و اکالیپتوس بر پاتوژن‌های شایع در مرغداری مقایسه شده باشد، وجود ندارد. در این مطالعه اثر ضدمیکروبی اسانس‌های فوق بر باکتری‌ها و قارچ‌های شایع در مرغداری در شرایط آزمایشگاه بررسی شد.

مواد و روش‌ها

سوش‌های میکروبی: در این مطالعه از باکتری‌های *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 و *Escherichia coli* استاندارد [۳] تهیه شد. سویه‌های باکتری‌ای از *E. coli* O2K12 و *E. coli* ATCC 8739 و *Aspergillus niger* ATCC 16404 و دو سویه فارمی *A. flavus* و *A. niger* استفاده شد. سویه‌های باکتری‌ای بیکار و سویه‌های قارچی یک هفته قبل روی محیط سابورو دکستروز آگار کشت شده و به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد در شرایط هوایی گرمخانه‌گذاری شدند. اسانس‌های گیاهی: اسانس‌های گیاهی آویشن، مرزنجوش، مرزه، اکالیپتوس به روش تقطیر با دستگاه کلونجر^۲ تهیه شد. اجزای عمدۀ هریک از اسانس‌های فوق با استفاده از روش GC مشخص شد.

تعیین خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش انتشار در آگار

سوسپانسیون میکروبی هریک از میکروارگانیسم‌های فوق به طور جداگانه (معادل استاندارد نیم مک فارلن) تهیه شد به نحوی که غلظت باکتری‌ها در حدود 1×10^8 CFU/ml و

حضور پاتوژن‌های بیماری‌زا به دو طریق صنعت پرورش طیور را تهدید می‌کند. از یک سو موجب بروز بیماری در طیور شده و از سوی دیگر به طور بالقوه باعث ایجاد مسمومیت غذایی در انسان می‌شود. شکنی نیست که آنتی‌بیوتیک‌های محرك رشد و مکمل‌های غذایی، نقش مهمی در تولید، رشد و سلامت طیور ایفا می‌کنند، اما استفاده بیش از اندازه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به باقی ماندن پسمان دارو در فرآورده‌های حاصل از طیور و ظهور سویه‌های میکروبی و هزینه‌های می‌شود. امروزه در پی افزایش مقاومت میکروبی و هزینه‌های سنگین درمان بیماری همراه با فشار مصرف‌کنندگان به تولید فرآورده‌های عاری از دارو و محدودیت استفاده از این فرآورده‌ها در بسیاری از کشورها، محققین به دنبال یافتن ترکیباتی هستند که بتوانند از آن‌ها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در رژیم غذایی پرندگان استفاده کنند [۴]. تحقیقات نشان داده است که افزودن ترکیبات دارویی گیاهی به رژیم غذایی پرندگان میکروفلور روده‌ای آنان را تعديل می‌نماید [۵]. همچنین ثابت شده است که برخی از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی‌سپتیک و ضدمیکروبی [۶] و اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند [۷]. سابقه استفاده از گیاهان جهت درمان بیماری‌ها به تاریخ تولد بشر باز می‌گردد. در بی ناکامی‌های مختلف در به کارگیری داروهای مختلف شیمیایی و ظهور سویه‌های مقاوم جدید، بشر با به کارگیری دانش و تکنولوژی امروزی دنیا، اقدام به تولید فرآورده‌های دارویی با منشا گیاهی نموده است. محققین مختلف اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی را مطالعه نموده‌اند [۷] تحقیقات نشان داده که تیمول و کارواکرول و سینامآلدئید موجود در اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و دارچین دارای اثرات ضدباکتریایی در برابر اشريشياکلي O₁₅₇^۱ و سالمونلا تیفی موریوم^۲ می‌باشند [۸]. همچنین مشخص شده که مخلوطی از اسانس‌های میخک (۱ درصد)، آویشن (۰/۱ درصد)، نعناع (۰/۱ درصد) و لیمو (۰/۱ درصد) می‌تواند تعداد اووسیت‌های

¹ *Coccidioides immitis*

² *Salmonella typhimurium*

¹ *Escherichia coli* O157

² *Salmonella typhimurium*

متفاوت بودند (جدول شماره ۱، نمودار شماره ۱). ۳۷ درصد تیمول و ۳۹ درصد کارواکرول در آویشن و ۳۸/۹ درصد کارواکرول در مرزه، ۲۱/۱ درصد تیمول و ۶۲ درصد کارواکرول در اسانس مرزنگوش و ۸۰ درصد اکالیپتوس (۱۸ - سینثول) و ۱/۲ درصد آلفا پین در اسانس اکالیپتوس به عنوان اجزای اصلی اسانس شناخته شد. چون برای تهیه رقت‌های مختلف اسانس‌ها، استفاده از حلال لازم است، در این مطالعه از دو حلال اتانول ۹۶ درصد و دی‌متیل سولفوكساید استفاده شد و غلظت ۲ میلی‌گرم از اسانس‌های مرزه، مرزنگوش، آویشن و اکالیپتوس در پایه دو حلال فوق بر باکتری‌ها و قارچ‌ها اثر داده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال، تعاظت معنی‌داری در اثربخشی اسانس ایجاد می‌نماید ($p < 0.001$). هنگامی که اسانس در پایه الكل حل شود نسبت به زمانی که از دی‌متیل سولفوكساید به عنوان پایه اسانس استفاده شود، قطر هاله عدم رشد به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (نمودار شماره ۲).

در بررسی اثر تک تک اسانس‌ها و ترکیب آن‌ها بر میکروارگانیسم‌های مختلف، صرفنظر از نوع میکروارگانیسم بیشترین اثر مربوط به اسانس آویشن و مرزنگوش و کمترین اثر مربوط به اسانس اکالیپتوس می‌باشد. زمانی که اسانس‌ها با یکدیگر ترکیب می‌شوند در پایه الكل ترکیب مرزه و آویشن دارای بیشترین اثر و در پایه دی‌متیل سولفوكساید بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به مرزنگوش و آویشن می‌باشد. در پایه الكل ترکیب سه تایی مرزه، مرزنگوش و آویشن دارای اثر کمتری نسبت به ترکیب دوتایی مرزه و آویشن و اثر بیشتری نسبت به مرزنگوش و آویشن می‌باشد. به هر ترکیبی که اسانس اکالیپتوس اضافه شده باشد اثر ضدمیکروبی آن کاهش یافته است (نمودار شماره ۲).

نتایج نشان داد که قارچ‌های مورد مطالعه نسبت به اسانس‌های مرزه، مرزنگوش و آویشن حساستر از باکتری‌های فوق می‌باشند، ولی باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به اسانس اکالیپتوس از قارچ‌ها حساستر بودند (نمودار شماره ۳). قارچ‌ها تعاظت معنی‌داری نسبت به اسانس‌های فوق در قطر هاله عدم رشد نشان می‌دهند ($p < 0.001$). بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیب مرزه و آویشن می‌باشد (۴۵ میلی‌متر).

غلظت قارچ‌ها 1×10^5 CFU/ml باشد. از سوسپانسیون‌های مزبور با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط مولر هیتون آگار (باکتری‌ها) و محیط مولر هیتون آگار حاوی ۲ درصد گلوگز (قارچ‌ها) کشت شده و دیسک‌های استریل حاوی ۲ میلی‌گرم از هریک از اسانس‌ها به صورت جداگانه و هم‌چنین دیسک‌های حاوی ۲ میلی‌گرم ترکیب دو، سه و چهار تایی اسانس‌ها روی محیط‌های کشت یافته قرار داده شد از دی‌متیل سولفوكساید^۱ و اتانول ۹۶ به عنوان حلال استفاده شد. کشت‌های باکتریایی و قارچی به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط هوایی گرمانخانه‌گذاری و نتایج قطره‌اله عدم رشد بر حسب میلی‌متر گزارش شد [۱۱].

تعیین حساسیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش رقیق‌سازی لوله‌ای

سوسپانسیون میکروبی مرحله قبل، به نحوی رقیق شد که غلظت سوسپانسیون باکتریایی به 1×10^6 CFU/ml و سوسپانسیون قارچی به 1×10^4 CFU/ml برسد. اسانس‌های مرزنگوش، مرزه و آویشن به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و از آن‌ها سری دو برابر رقت در محدوده غلظت $500-1/95 \mu\text{g}/\text{ml}$ تهیه شد. یک میلی‌لیتر از هر رقت به هر لوله اضافه شد و یک میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون میکروبی رقیق شده، به لوله‌های هر سری رقت افزوده شد لوله‌های باکتریایی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و لوله‌های قارچی در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمانخانه‌گذاری شدند. اولین لوله که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد^۲ و اولین لوله‌ای که در آن رشدی بر روی محیط جامد ایجاد نکرد به عنوان حداقل غلظت‌کشته^۳ گزارش شد.

نتایج

اسانس‌های آویشن، مرزه، مرزنگوش و اکالیپتوس استفاده شده در این مطالعه از نظر نوع و میزان ماده موثره با یکدیگر

¹ DMSO

² MIC

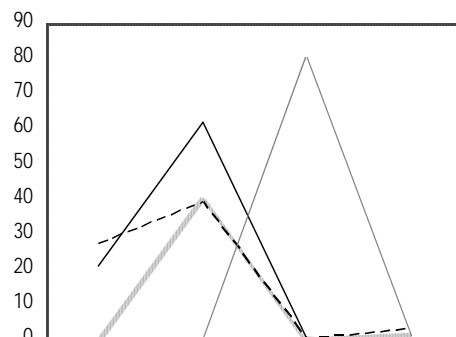
³ MLC

اکالیپتوس با قطر هاله عدم رشد $11/4$ میلی‌متر دارای کمترین اثر می‌باشد (نمودار شماره ۳).

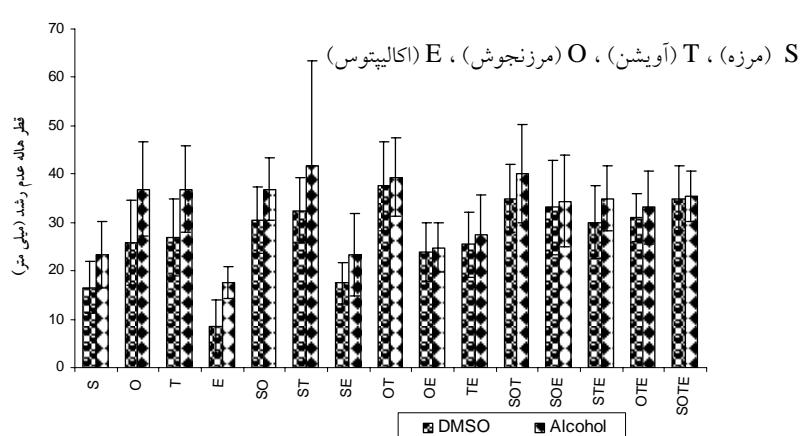
هنگامی که اثر اسانس به تنها بی روی قارچ بررسی شود اسانس آویشن با قطر هاله عدم رشد 38 میلی‌متر دارای بیشترین اثر و

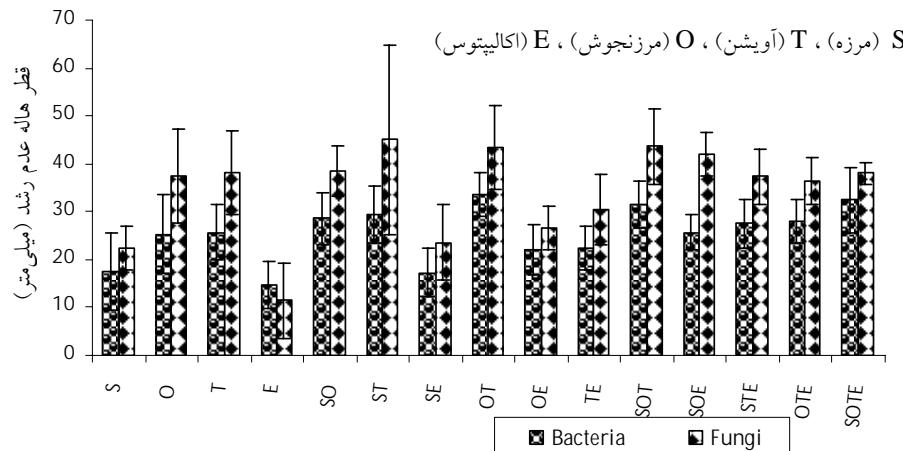
جدول شماره ۱- اسامی علمی، موارد کاربرد و ترکیبات عمدۀ گیاهان دارویی مورد مطالعه

نام گیاه	نام علمی گیاه	موارد استفاده از گیاه	مواد موثره گیاه
آویشن	<i>Zataria multiflora</i>	تقویت بینایی، تقویت معده، ضدکرم، رفع بوی بددهان، ضدمیکروب	تیمول (۲۷ درصد)، کارواکرول (۳۹ درصد)
مرزه	<i>Satureja hortensis</i>	مقوی معده، بادشکن، ضد نزله، رفع اسهال و ضدکرم	کارواکرول (۳۸/۹ درصد)
مرزنجوش	<i>Origanum majorana</i>	بازکننده گرفتگی‌های دماغی و ضدغوفونی کتنده، التیام‌دهنده زخم‌ها	تیمول (۲۱/۱ درصد) و کارواکرول (۶۲ درصد)
اکالیپتوس	<i>Eucalyptus globules</i>	ضدغوفونی کتنده، ضدویروس	اکالیپتوول (۸۰ درصد)، آنفایین (۱/۲ درصد)



نمودار شماره ۱- اجزای اصلی شناسایی شده در اسانس‌های گیاهی با استفاده از روش GC





نمودار شماره ۳- شاخص‌های آماری قطر هاله عدم رشد بر حسب نوع میکرووارگانیزم

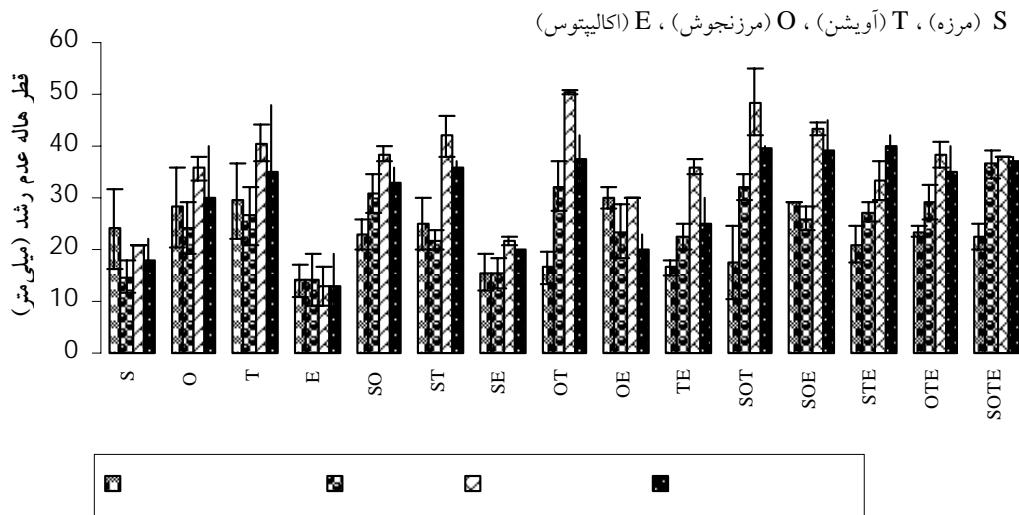
غلهٔ مهارکنندگی رشد برای قارچ‌ها کوچکتر از باکتری‌های موربد برسی است ولی حداقل غلهٔ مهارکنندگی همه انسان‌ها برای قارچ‌ها چهار برابر حداقل غلهٔ مهارکنندگی آن است. این تحقیق نشان داده است که انسان‌های فوق دارای اثر مهاری قوی‌تری نسبت به قارچ‌ها در مقایسه با اثر قارچ‌کشی هستند. در بین دو میکرووارگانیسم مطالعه شده *E. coli* با حداقل غلهٔ مهارکنندگی کوچکتر، از سالمونولا تیفی موریوم حساس‌تر است (جدول شماره ۲). که با نتایج نمودار شماره ۴ مطابقت دارد. ترکیب دوتایی مرزه - مرزنجوش و مرزنجوش - آویشن بر اشیریشیاکلی موثرتر از سالمونولا تیفی موریوم است.

بحث

همان‌طوری که نتایج نشان می‌دهد انسان‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه دارای اثرات ضدمیکروبی بسیار خوبی در مقابل میکرووارگانیسم‌های مطالعه شده می‌باشند. انسان اکالیپتوس نسبت به سایر انسان‌ها دارای کمترین اثر در مقابل میکرووارگانیسم‌ها می‌باشد. میزان اجزای موثر گیاه نقش مهمی در این تفاوت‌ها ایفا می‌نماید. تیمول و کارواکرول به عنوان اجزای اصلی انسان مرزنجوش و آویشن و کارواکرول به عنوان جزء عمدی در انسان مرزه نقش مهمی در این اثربخشی دارد. جز تیمول و کارواکرول در انسان اکالیپتوس وجود ندارد. به نظر می‌رسد تیمول نسبت به کارواکرول نقش

در باکتری‌ها بیشترین اثر مربوط به انسان مرزنجوش و آویشن با قطر $33/5$ میلی‌متر است. اثر انسان آویشن و مرزنجوش بر باکتری‌ها تقریباً برابر و انسان اکالیپتوس با قطر هاله عدم رشد $14/6$ میلی‌متر دارای اثر ضعیفتری می‌باشد (نمودار شماره ۳). در مقایسه اثر انسان‌ها بر روی میکرووارگانیسم‌های مختلف، سوش‌های آسپرژیلوس نایجر از سایرین نسبت به انسان‌های گیاهی حساس‌تر می‌باشند آسپرژیلوس نایجر از آسپرژیلوس فلاوس حساس‌تر است و میزان حساسیت سویه‌های مختلف باکتریایی نسبت به انسان‌های گیاهی به نوع باکتری و انسان مورد بررسی بستگی دارد. در بین ایزووله‌های میکروبی موریوم انسان مرزه، دارای بیشترین اثر بر سالمونولا تیفی موریوم می‌باشد و کمترین اثربخشی این انسان روی سویه‌های اشیریشیاکلی است. به طور کلی اشیریشیاکلی از سالمونولا تیفی موریوم نسبت به انسان‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه مقاوم‌تر است. ترکیب چندتایی انسان‌ها میزان حساسیت سالمونولا تیفی موریوم را کاهش می‌دهد و در بعضی ترکیبات انسانی سوش‌های اشیریشیاکلی از سالمونولا تیفی موریوم حساس‌تر می‌شوند (نمودار شماره ۴). با توجه به نمودارهای فوق صرف‌نظر از نوع حلال، اثر ترکیب دوتایی انسان‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه، آویشن و مرزنجوش، مرزه نسبت به سایر ترکیبات مورد مطالعه بیشتر است به همین علت میزان حداقل غلهٔ مهارکنندگی رشد و حداقل غلهٔ مهارکنندگی رشد در برابر ۳ سوش استاندارد تعیین شد (جدول شماره ۳). میزان حداقل





نمودار شماره ۴- شاخص‌های آماری قطر هاله عدم رشد برای سوش‌های مختلف میکروبی

جدول شماره ۲- مقایسه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بر میکرووارگانیزمها

SO		ST		TO		باکتری اشریشیاکلی سامونلاتیفی موریوم آسپرژیلوس نایجر
MLC	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	
۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	
۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	
۵۰۰	۶۳	۵۰۰	۶۳	۵۰۰	۶۳	

آویشن و مرزنجوش (TO)، مرزه و آویشن (ST)، مرزه و مرزنجوش (SO)
حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی رشد (MLC) بر حسب
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ اندازه‌گیری شده است.

ثبت شده است که تیمول، کارواکرول دارای اثر ضدمیکروبی زیاد هستند در حالی که اکالیپتوول دارای اثرات ضدمیکروبی ضعیفی می‌باشد [۱۴]. زمانی که از دی متیل سولفوکساید به عنوان حلal استفاده شود قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها نسبت به اسانس اکالیپتوس حساس‌تر می‌باشند در حالی که اگر از اتانول به عنوان حلal استفاده شود اثر ضدبакتری اسانس اکالیپتوس از اثر ضدقارچی آن بیشتر می‌شود. ثابت شده است که اسانس اکالیپتوس فاقد فعالیت ضدمیکروبی قوی نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشد [۱۵]. اکالیپتوول موجود در اسانس اکالیپتوس به تنها یی هیچ‌گونه فعالیتی در مقابل قارچ‌ها نشان نمی‌دهد [۱۶]. اسانس‌های گیاهی روی قارچ‌ها دارای اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به باکتری‌ها هستند ولی اسانس‌های گیاهی اثر باکتری‌کشی قوی‌تری در مقایسه با اثر قارچ‌کشی

مهم‌تری در افزایش خاصیت ضدمیکروبی ایفا می‌کند. زیرا موثرترین اسانس در این مطالعه اسانس آویشن می‌باشد و میزان تیمول آن از اسانس‌های مرزنجوش و مرزه بیشتر است و در اسانس مرزنجوش میزان تیمول کارواکرول نسبت به دو اسانس دیگر در سطح بالاتری قرار دارد. کارواکرول با غشای سلولی از طریق تغییر در نفوذپذیری کانال‌های H^+/K^+ واکنش می‌دهد تغییر در شبیه یونی منجر به توقف و اختلال عملکردهای اساسی سلول و مرگ می‌شود [۱۲]. همچنین ثابت شده است که واکنش اجزای اسانس با یکدیگر نقش مهمی در تعیین اثر ضدمیکروبی گیاه ایفا می‌کند. تیمول و کارواکرول دارای اثرات سینه‌زیستی می‌باشند [۱۳]. به همین علت اثر ضدمیکروبی مرزنجوش از مرزه بیشتر است. اکالیپتوس با درصد اکالیپتوول دارای کمترین اثر ضدمیکروبی می‌باشد

تشکر و قدردانی

نویسنده‌گان این مقاله از بخش تحقیق و توسعه شرکت داروسازی باریج اسانس به ویژه جناب آقای مهندس حسین حجازی، مهندس محسن بذرافشان و سرکار خانم نسترن کاظمپور به خاطر همکاری‌هایشان در اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارد.

دارند. اسانس اکالیپتوس یک ترکیب ضدالتهابی، ضدغونی‌کننده و ضدباکتری ضعیف، ضدویروس، ضدنزله و خلطآور می‌باشد [۱۷]. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و محدودیت استفاده از ترکیبات شیمیایی در مرغداری‌ها، ضرورت جایگزینی این مواد با اسانس‌های گیاهی می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات آتی جهت ساخت ضدغونی‌کننده‌ها و مکمل‌های غذایی جهت کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

منابع

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 564 – 82.
2. Schilcher H. Pharmakologie and Toxicologie atherischer ole. *Therapiwoche*. 1986; 36: 1100 - 2.
3. Thomke S and Elwinger K. Growth promotants in feeding pigs and poultry. III. Alternatives to antibiotics growth promotants. *Ann. Zootech.* 1998b; 47: 245 - 71.
4. Young HJ and Noh JW. Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Elimeria tenella*. *Vet. Parasitol.* 2001; 96: 257 - 63.
5. Helander IMHL, Alakomi K, Latva-Kala T, Mattila-Sandholm I, Pol EJ, Smid LG, Gorris M and Von Wright A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *J. Agri. Food Chem.* 1998; 46: 3590 - 5.
6. Evans JW, Plunkett MS and Banfield MJ. Effect of an essential oil blend on coccidiosis in broiler chicks. *Poultry Sci.* 2001; 60 (suppl. 1): 280 - 5 (abstract).
7. Marino M and Spiewak R. Antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris*. *J. Food Prot.* 1999; 62: 1017 - 23.
8. Maunchid K, Bourjilat F, Dersi N, Abous saovira T, Rachidai A, Tantaoui-Elaraki A, Alaoui-Ismaili B. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *R. officinalis* and *E. globulus*. *African. J. Biotech.* 2005; 4 (10): 1175 - 6.
9. Perrucci S, Marcianti F and Cionti PL. In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsperum canis* and *M. gypseum*. *Planta. Med.* 1994; 60: 84 - 7.
10. Nostro A, Roccaro AS, Bisignano G, Marino A, Cannatelli MA, Pizzimenti FC, Cioni PL, Procopio F and Blanco AR. Effects of oregano, Carvacrol, and thymol on *S.aureus* and *S.epidermidis* biofilms. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 519 - 23.
11. Nascimento GFL, Locatell J, Freitas CP and Silva LG. Antibacterial activity of plant extract and phytochemical on antibiotic resistant bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 2000; 31: 347 – 51.
12. Ultee, A, Kets EPW and Smid EJ. Mechanism of action of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiol.* 1999; 65 (10): 4606 - 10.
13. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenole on oral bacterial. *Pharm. Acta. Helv.* 1994; 69: 25- 8.
14. Lattaoui N and Tantaoui-Elaraki A. Individual and combined antibacterial activity of the main components of three thyme essential oils. *Rev. Ital.*



- EPPOS.* 1994; 13: 13 - 9.
- 15.** Mahboubi M, Akbari M, Haghi G and Kazempour N. Comparison of antimicrobial activity of Respitol-B with mentofin containing menthol, eucalyptus oil. *Iranian J. of medical Microbiol.* 2007; 1 (1): 39 – 45.
- 16.** Souza ALD, Lima LDO, Freire KDL and Sousa KPD. Inhibitory action of some essential oils and phytomedicals on the growth of various molds isolated from foods. *Brazilian archives of biology and technol.* 2004; 48 (2): 245 - 50.
- 17.** Kraft K and Hobbs C. Pocket guide to herbal medicine, 1th Ed, New York, Thieme Stuttgart. 2004, pp: 61 – 2.

