

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۱ بهار ۱۳۸۶، صفحات ۳۹ - ۴۵

## مقایسه اثر ضد میکروبی رسپیتول B حاوی منتول و اسانس اکالیپتوس با

### منتوفین، منتول، اسانس اکالیپتوس

محدثه محبوبی<sup>\*</sup>، محمد اکبری، قاسم حقی، نسترن کاظم پور

بخش تحقیق و توسعه شرکت داروسازی باریج اسانس

نویسنده رابط: محدثه محبوبی، کاشان - کیلومتر ۵ مشهد اردهال بخش تحقیق و توسعه شرکت داروسازی باریج اسانس - صندوق پستی ۱۱۷۸

mahboubi@barijessence.com

تلفن: ۰۹۱۳۱۶۳۸۹۶۴

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۳/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۳/۲۲

#### چکیده:

زمینه و اهداف: برخی اسانس‌های گیاهی و اجزای شیمیائی فعال آنها، دارای اثرات ضد باکتریائی بوده و به عنوان عوامل ضد میکروبی استفاده می‌گردند. داروی رسپیتول B، (شرکت داروسازی باریج اسانس) یک ترکیب مشابه‌سازی شده با نمونه خارجی با عنوان منتوفین می‌باشد. این فرآورده از منتول و اسانس اکالیپتوس (*E. globulus*) تشکیل شده است. در این مطالعه، اثر ضد میکروبی این دو فرآورده با میزان اثر بخشی اجزای آن بر باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها، بررسی گردید.

روش بررسی: جهت مقایسه اثر ضد میکروبی دو فرآورده از روش ماکروبراث و دیسک دیفیوژن استفاده گردید.

یافته‌ها: باکتری‌های گرم مثبت، مخمرها و قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نسبت به رسپیتول B نشان دادند. بررسی اجزای این فرآورده‌ها نشان می‌دهد که خاصیت ضد میکروبی منتول از اسانس اکالیپتوس بیشتر می‌باشد. اسانس اکالیپتوس دارای خاصیت ضد میکروبی خوبی مقابل *Vibrio cholera*, *Aspergillus flavus*, *Staphylococcus aureus* می‌باشد اما بر سایر میکروب‌ها اثر چندانی ندارد. منتول دارای اثر ضد میکروبی قابل توجهی بوده و حضور آن در رسپیتول B اثر ضد میکروبی رسپیتول B را تقویت می‌کند. باکتری‌های *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* مقاومت بیشتری نسبت به رسپیتول B از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: اثر ضد میکروبی رسپیتول B مشابه منتوفین بوده و می‌توان از این فرآورده به جای نمونه خارجی استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: رسپیتول B، اسانس اکالیپتوس، منتول، منتوفین، اثر ضد میکروبی

#### مقدمه:

مقدور نبوده و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد گردیده است و یا در گرمای خشک و شدید بویژه هنگامی که غشای موکوسی مجاری تنفسی خشک شده و جوجه‌ها با مشکل تنفس مواجه می‌شوند استعمال می‌گردد (۱). طیور پس از واکسیناسیون معمولاً واکنش‌هایی را نشان می‌دهد که این امر، نه تنها باعث افت پاسخ سیستم ایمنی بدن به واکسن می‌گردد بلکه به عنوان یک عامل استرس‌زا، بازده گله را تحت

داروی رسپیتول B - دارویی مشابه با منتوفین است. منتوفین یک ترکیب گیاهی است که از منتول و اسانس اکالیپتوس تهیه شده است. رسپیتول B به دو فرم آشامیدنی و استنشاقی (اسپری در سالن) در کنترل و درمان بیماری‌های تنفسی مانند برونشیت و آنفلونزا ی طیور مصرف می‌شود. این ترکیب در مواردی که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها،

آزمایشات ضد میکروبی به همان روش *Griggs* و همکاران انجام شد (۵). به طور خلاصه ۱-۲ کلنی از هر میکروب به طور مجزا (باکترها و قارچ‌ها و مخمر) در سرم فیزیولوژی، سوسپانسیون تهیه شد و کدورت آن با 0.5 مک‌فارلند تنظیم گردید. سوسپانسیون باکتری آماده با سوآب استریل روی محیط مولر هیتون آگار و سوسپانسیون قارچ و مخمر روی محیط سابورودکستروز آگار، کشت گردید. دیسک‌های استریل (به قطر 6mm) آغشته به ۲۰ میکرولیتر از ترکیبات فوق (منتول، منتوفین، اسانس اکالیپتوس، رسپیتول B) به طور جداگانه روی کشت میکروبی قرار گرفت. پلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $35^{\circ}C$  انکوبه گردید و قطر هاله عدم رشد آنها بر حسب میلی‌متر تعیین گردید.

از آن جایی که فرمول‌های فوق دارای امولسیفایرهایی فاقد خاصیت ضد میکروبی می‌باشند در محیط کشت به راحتی حل می‌گردند. حداقل غلظت مهار کننده رشد و حداقل غلظت کشنده رشد با استفاده از سری دو برابر رقت ماکرو برات دایلوژن ( $1000-15/625 \mu g/ml$ ) در محیط *MHB* برای سویه‌های باکتریایی و *MHB* حاوی ۲٪ دکستروز برای سویه‌های قارچی تعیین گردید (۶).

#### یافته‌ها:

قطر هاله عدم رشد منتول بر میکروارگانیسم‌ها از رسپیتول B و منتوفین بیشتر و همچنین قطر هاله عدم رشد اسانس اکالیپتوس از رسپیتول B، منتوفین و منتول کمتر است (جدول شماره ۱). بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و کاندیدا آلیکانس نسبت به ترکیبات فوق حساستر از سایر باکتری‌های گرم منفی بودند. این نتایج در استاتیلوکوکوس اورئوس و کاندیدا آلیکانس با نتایج مربوط به حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) منطبق است. در باکتری‌های گرم منفی *Klebsiella pneumoniae* قطر هاله عدم رشد بزرگتری نسبت به سایر باکتری‌های گرم منفی و *P.aeruginosa* و *E.coli* و *S.typhi* قطر هاله عدم رشد کوچکتری نسبت به ترکیبات فوق نشان دادند (جدول شماره ۱).

اسانس اکالیپتوس بر سویه‌های بالینی *Vibrio cholera*، *S. aureus* و قارچ *A. flavus* (نمونه کلینیکی طیور) موثر بوده ولی بر سایر میکروارگانیسم‌ها تأثیر چندانی نداشت. اثر ضد میکروبی منتول بر مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شده در جدول شماره ۱ چشمگیر بود ولی بر *E. coli*، *S. typhi*، *P.aeruginosa* تأثیر قابل توجهی نداشت. در بین باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شده *Bacillus subtilis* نسبت به

تأثیر قرار داده و باعث افزایش تلفات می‌گردد. منتوفین باعث پاسخ بهتر سیستم ایمنی بدن طیور گردیده و با ممانعت از واکنش‌های حاد ناشی از واکنش، موجب کاهش تلفات و افزایش بازده گله می‌گردد (۲). تحقیقات بیشتر در کشور آفریقای جنوبی نشان می‌دهد که مصرف منتوفین در آب آشامیدنی، علائم بیماری کزیزای عفونی ناشی از هموفیلوس پاراگالیناروم (*Haemophilus paragalarum*) را به شدت کاهش می‌دهد (۲). اثر منتوفین بر گله‌های مرغ نژاد گوشتی که بیماری نیوکاسل *VV* همراه با عفونت *Oribacterium rhinotracheal* داشته‌اند در یک گروه شاهد همراه با آموکسی‌سیلین و بدون آن در کشور مصر مورد بررسی قرار گرفته است (۲) این نتایج نشان‌دهنده وزن‌گیری بهتر گروه درمان شده با گروه منتوفین می‌باشد. رسپیتول B یک ترکیب گیاهی است که مواد موثره آن دقیقاً مشابه منتوفین می‌باشد و مرکب از منتول و اسانس اکالیپتوس می‌باشد (۳). اسانس اکالیپتوس با روش تقطیر از برگ‌ها و سرشاخه‌های جوان *Eucalyptus globulus L.B* استخراج می‌شود. اجزای مهم اسانس عبارتند از ۸۰٪  $\alpha$ -۸- سینئول (اکالیپتول)، پاراسمین، آلفا - پی‌نین می‌باشد. منتول جزء اصلی اسانس گیاه نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) می‌باشد (۴). در این مطالعه اثر ضد میکروبی رسپیتول B و منتوفین و محلول اکالیپتوس و منتول بر باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمر بررسی گردید.

#### مواد و روش‌ها:

مواد شیمیایی: داروی رسپیتول B، محلول منتول و محلول حاوی اسانس اکالیپتوس از شرکت داروسازی باریج اسانس تهیه شد. داروی منتوفین از شرکت *Ewabo* آلمان تهیه گردید. محلول منتول از لحاظ مواد جانبی کاملاً مشابه فرمول رسپیتول B است اما از لحاظ مواد موثره فاقد اسانس اکالیپتوس و میزان منتول دو برابر نسبت به رسپیتول B است و در محلول اکالیپتوس، مواد جانبی با رسپیتول B یکسان و دارای دوبرابر اسانس اکالیپتوس و فاقد منتول می‌باشد.

سوش‌های میکروبی: در این مطالعه از سویه‌های *B.subtilis*، *S.aureus* ATCC25923 ATCC6051، *B.cereus* ATCC1247، *S.typhi* ATCC14028، *S.marscenes* ATCC1187، *P.aeruginosa* ATCC 10031 و سویه کلینیکی *V. cholerae* استفاده گردید. همچنین از ۲ سوش قارچی *A.flavus* (جدا شده از طیور) و *A.niger* ATCC 16404 و از مخمر *C. albicans* ATCC 10231 استفاده گردید.

#### روش کار:

بزرگتر می باشد (جدول شماره ۱) ولی *MBC*، *MIC* آن، با سایر باکتری‌های گرم منفی برابر است. *MIC* قارچهای *C. albicans*، *A. niger* از *A. flavus* *MIC* باکتریهای گرم منفی کمتر بود. *MBC* *A. flavus*، *A. niger* حدود ۴ برابر *MIC* آن بوده و لی در *MBC*، *S. aureus*، *C. albicans* برای همه ترکیبات فوق دو برابر *MIC* آن تعیین گردید. اسانس اکالیپتوس نسبت به *S. aureus* کمترین *MIC* را دارا می باشد. در بین باکتری‌های گرم منفی *MBC* مربوط به *S. typhi* از همه بیشتر بوده که نشان می دهد برای از بین بردن این پاتوژن دوز بیشتری از فرآورده لازم است. اثر منتوفین و رسپیتول *B* بر همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده یکسان است که نشان می دهد که این ۲ فرمول (منتوفین، رسپیتول) دقیقاً دارای ترکیبات مشابه با یکدیگر می باشند.

ترکیبات فوق مقاوم تر از *S. aureus*، *B. cereus* و قارچ *A. flavus* است و قارچ *A. niger* نسبت به *A. flavus* مقاومت بیشتری نشان داد. حداقل غلظت کشندگی باکتری (*minimal bactericidal concentration: MBC*) مربوط به *Bacillus subtilis*، *Bacillus cereus* از همه باکتری‌های مطالعه شده بیشتر بوده و میزان آن حدود ۴ برابر بیشتر از *MIC* آن تعیین گردید (جدول شماره ۲). حداقل غلظت مهار کننده رشد (*MICs*)، مربوط به *S. aureus*، *A. niger*، *A. flavus*، *C. albicans* کمتر از *MIC* ی مربوط به باکتری‌های گرم منفی می باشد. قطر هاله عدم رشد رسپیتول *B*، منتوفین و منتول بر *K. pneumoniae* از همه باکتری‌های گرم منفی

جدول شماره ۱: هاله ممانعت رشد میکروبی (میلی متر)

	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
Respitol B	۱۶.۴	۱۳.۴	۱۲	-	-	۹.۲	۴۳.۳	۸.۴	۱۹.۱	۲۵.۲	۱۴.۷۵	۲۳
Mentofin	۱۵.۷	۱۱.۲	۱۱.۴	-	-	۸.۸	۳۹.۳	۸.۴	۱۹.۳	۲۸.۵	۱۶.۲۵	۲۳
Menthol	۲۲.۸	۲۳.۴	۲۱.۷	۸.۸	-	۱۲.۷	>۷۰	۹.۶	۲۴.۱	۳۹.۵	۳۵	۳۰
Eucalyptus oil	۱۴.۲	-	۶.۸	-	-	۷.۵	۸	۸.۲	۱۴.۷	۶.۵	۸	۱۲.۵

جدول شماره ۲: بررسی خاصیت ضد میکروبی با استفاده از روش ماکروبراث دیلوژن

		<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
Respitol B	a	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Mentofin	a	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Menthol	a	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰
Eucalyptus oil	a	۶۲.۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۲۵۰

a =MIC (µg/ml)

b=MBC (µg/ml)

**بحث :**

رسپیتول B به عنوان یک ترکیب ۱۰۰٪ گیاهی و محلول در آب، مشابه با نمونه خارجی (منتوفین) طراحی شده است. این فرآورده، به علت وجود سینئول مانع از بسته شدن مجاری تنفسی و ترشح موکوس گردیده و دارای اثرات ضد التهابی و ضد درد به صورت موضعی می باشد (۱،۹). جهت پیشگیری و کنترل و درمان بیماری های تنفسی نظیر CRD، برونشیت، آنفلونزا، نیوکاسل، ORT و کریزای عفونی مورد استفاده قرار گرفته و عوارض بعد از واکسیناسیون را در طیور کاهش

اسانس های گیاهی، ترکیب پیچیده ای از اجزای مختلف شیمیایی با مقادیر گوناگون می باشند. بعلاوه تغییرات زیاد در این ترکیبات، اثرات بیولوژیکی اسانس ها متفاوت می باشد. خواص ضد میکروبی برخی از اسانس های گیاهی شناخته شده است (۷). با توجه به این خواص و سایر اثرات بیولوژیکی، اسانس ها بعنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک ها با اهداف درمانی (۷) و یا در فرآورده های آرایشی - بهداشتی و نیز صنایع غذایی (۸) مورد توجه قرار گرفته اند.

باسیلوس سوبتیلیس و سرئوس بی تاثیر بود که این اثر شاید به خاطر اشکال مقاوم سلولی است که باکتری در شرایط نامناسب تولید می‌کند. اکالیپتوس موجود در اسانس اکالیپتوس به تنهایی هیچگونه فعالیتی، ضد کپک های آزمایش شده نشان نمی دهد (۱۶) در حالی که در مطالعه فوق اسانس اکالیپتوس دارای، اثر ضد قارچی بوده (جدول شماره ۲) نشان دهنده این واقعیت است که احتمالاً در بعضی شرایط اجزای فیتوشیمیایی خاص با سایر اجزا دارای اثر سینرژیسمی می باشد. قارچ‌ها، نسبت به اسانس‌های گیاهی حساستر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند. اطلاعات کمی در مورد نحوه عملکرد اسانس‌ها و مشتقات آنها روی سلول‌های قارچی وجود دارد. به طور کلی فرآورده‌های گیاهی منجر به گرانوله شدن سیتوپلاسم (۱۷)، گسیختگی غشاء سیتوپلاسمی (۱۵، ۱۸) و غیرفعال شدن یا ممانعت از فعالیت آنزیم‌های درون سلولی و برون‌سلولی (۸)، متلاشی شدن دیواره سلولی (۹) و تخریب سیستم انتقال الکترون (۲۰) می‌باشد این رخداد‌های سلولی به طور مستقل و یا به صورت همزمان، می‌تواند با ممانعت از رشد مسیلیوم به حداکثر برسد (۸، ۱۸). بر روی اثر ضد میکروبی متول کار زیادی انجام نشده است. متول جزء اصلی اسانس نعنائفلی است (۴). **نتیجه گیری:**

متول دارای اثر ضد خارش، ضد درد و دارای اثرات آنتی‌سپتیک بوده به طوری که از این جزء به طور وسیعی برای تسکین علائم برونشیت و گرفتگی بینی استفاده می‌شود و به صورت داخلی بعنوان ضد نفخ و مسکن معده استعمال می‌گردد. نتایج آزمایشات ما به خوبی نشان می‌دهد که متول دارای اثر میکروب‌کشی خوبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها و قارچ‌ها می‌باشد اما اثر میکروب‌کشی آن بر *E. coli* و *P. aeruginosa* بسیار ضعیف است. در مورد اثر متول بر برخی سویه‌های میکروبی حداقل غلظت مهارکننده رشد با حداقل غلظت کشنده رشد برابر است. در فرمول منتوفین یا رسپیتول *B* اثر بالای ضد میکروبی متول بوسیله اسانس اکالیپتوس کاهش می‌یابد به طوری که اثر ضد میکروبی متول از منتوفین یا رسپیتول *B* بیشتر و اثر اسانس اکالیپتوس از آن دو کمتر است.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از آقایان محسن بخردی، مهندس علیرضا صفایی، مهندس محسن بذرافشان و دکتر مجید ترابی گودرزی که ما را در اجرای این طرح یاری نمودند، تشکر و قدردانی مینمایم همچنین از جناب آقای مهندس حجازی مدیر عامل شرکت داروسازی باریج اسانس به طور ویژه قدردانی مینمایم.

می‌دهد (۲). همه این خواص مربوط به اجزای تشکیل‌دهنده فرمول رسپیتول *B* یعنی اسانس اکالیپتوس و متول می‌باشد (۳-۱).

اسانس اکالیپتوس یک ترکیب ضد التهابی، ضد عفونی‌کننده و ضد باکتری ضعیف، ضد ویروس، ضد زلزله و خلط‌آور می‌باشد. این اسانس از التهاب غشاهای موکوسی مخاط بینی، مخاط حلق - بینی، التهاب گوش و سینوس‌ها و التهاب واژن ممانعت می‌کند (۹). *Jouad et al.* نشان داده اند که عصاره برگ اکالیپتوس به طور چشمگیری غلظت پایه انسولین پلازما را کاهش می‌دهد و به مصرف عصاره برگ اکالیپتوس در درمان دیابت ملیتوس اعتبار می‌بخشد (۱۰) اسانس اکالیپتوس از سنتز پروستاگلاندین ممانعت کرده و هنگامی که به صورت موضعی مصرف گردد دارای اثرات *hyperemic* می‌باشد. همچنین دارای اثرات خلط‌آوری و ضد سرفه بوده و عملکرد ضعیف ریه‌ها را بهبود می‌بخشد (۹). فعالیت ضد باکتریایی عصاره برگ اکالیپتوس بر *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. aureus* و هموفیلوس آنفلونزا که از بیماران با اختلالات تنفسی جدا شده حاکی از تاثیر آن بر باکتری‌ها ذکر شده در شرایط برون تنی می‌باشد (۱۱). فعالیت ضد باکتریایی اسانس اکالیپتوس با استفاده از تکنیک میکروآتمسفر یک در مقابل *E. coli*, *E. coli clp514* مقاوم به چندین دارو که از نمونه ادرار جدا شده بودند نشان دهنده موثر بودن این اسانس در مقابل هر دو باکتری خصوصاً *E. coli clp514* می‌باشد. میزان *MIC* برای هر دو باکتری در محدوده  $70-60 \mu l$  است (۱۲). در مطالعه ما که با استفاده از تکنیک ماکروبراث دیلوشن و دیسک دیفیوژن انجام شد نشان داده شد که اسانس اکالیپتوس در مقابل *E. coli 8739* فاقد اثر ضد باکتری می‌باشد. همچنین فعالیت ضد میکروبی عصاره برگ ۲۶ گونه اکالیپتوس با یکدیگر مقایسه شده است. عصاره برگ گونه‌های *E. globulus*, *E. maculata*, *E. viminalis* به طور مشخصی از رشد باکتری‌های *Methicillin-resistance S. aureus (MRSA)*، *P. acnes*، *B. cereus*، *E. faecalis*، *Alicyclobacillus acidote*، *rrestris* و قارچ *T. mentagrophytes* ممانعت می‌کند اما فعالیت ضد باکتری قوی علیه باکتری‌های گرم منفی نشان نداده است (۱۳). در این مطالعه مشاهده شد که اسانس اکالیپتوس تهیه شده از گیاه بومی ایران نیز فاقد اثر بر روی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که علت احتمالی آن حضور لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی، احتمالاً مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود (۱۴، ۱۵) همچنین اسانس اکالیپتوس نسبت به

## فهرست مراجع:

1. Riechelmann H, Brommer C, Hinni M. Response of human ciliated respiratory cells to a mixture of *menthol*, *eucalyptus oil* and *pine needle oil*. *Arzneimittelforschung*. 1997,**47**:1035-1039.
2. Barbour EK, Dankar S. Essential oils of *Eucalyptus* and *peppermint* improve the homogeneity of immune responses and performance in MG/H9N2-infected broilers. *J Am Holistic Vet Med Assoc* 2005, **24**:23-27.
3. Barbour EK, Elhakim RG, Kaadi MS, Shaib HA, Gerges DD, Nehme PAE. Evaluation of the Histopathology of the Respiratory System in Essential Oil-Treated Broilers Following a Challenge With *Mycoplasma gallisepticum* and/or *H9N2 Influenza Virus*. *Intern Appl Res Vet Med* 2006, **4**(4):293-300.
4. Aghel N, Yamini Y, Hadjiakhoondi A. Comparison between the essential oil and super critical carbon dioxide extraction of *Mentha piperita* L. cultivated in Iran. *Daru* 2002, **10**(2):67-9.
5. Griggs J K, Manandhar NP, Towers GHN, and Taylor RSL. The effects of storage on the biological activity of medicinal plants from Nepal. *J. Ethnopharmacol* 2001, **77**: 247-252.
6. Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z, Kustrak D. Natural antimycotics from Uroatin plants, in plant derived antimycotics-current trends and future prospects (eds, M. Rai, D. Mares), Haworth press, New York 2003, pp:41-84
7. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agent. *Clinical microbiology review* 1999, **12**:564-582.
8. Brull S, Coote P. Preservative agents in foods, Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of food microbiology* 1999, **50**: 1-17.
9. Kraft K, Hobbs C, *Pocket guide to herbal medicine*, 1<sup>th</sup> ed, New york, Thieme Stuttgart, 2004, pp: 61-62.
10. Jouad H, Maghrani M, El Hassani RA, Eddouks M. Hypoglycemic Activity of Aqueous Extract of *Eucalyptus globulus* in normal and streptozotocin induced Diabetic Rats., *Journal of Herbs. Spices & Medicinal plants* 2004, **10**(4):19-28.
11. Salari MH, Amin G, Shirazi MH, Hafezi M., Mohammadypour M. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaf extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders, *Clin. Microbiol infect* 2006, **12**(2): 194-196.
12. Mounchid K, Bourjilat F, Dersi N, Aboussavira T, Rachidai A, Tantaoui – Elaraki. A, Alaoui – Ismaili.. The susceptibility of *Escherichia coli* strains to essential oils of *R. officinalis* and *E. globulus*. *African Biotechnology* 2005, **4** (10): 1175-76.
13. Takahashi T, Kokubo R, Sakaino M. Antimicrobial activities of *Eucalyptus* leaf extract and flavonoids from *Eucalyptus maculate*. *Letters in Applied microbiology* 2004, **39**(1):60-64.
14. Mckeegan KS, Borges – walmsley MI, walmsley AR . Microbial and viral drug resistance mechanisms, *Tends in microbiology* 2002, **10**:85-145.
15. Jurven BJ, Kanner J, Sched F, and weisslowicz H. Factors that interact with the antibacterial of thyme and essential oil and its active constituents. *Journal of Applied microbiology* 1994, **76**: 626-31.

16. Souza ALD, Lima LDO, Freire KDL, Sousa KPD. Inhibitory action of some *Essential oils* and *phytomedicinals* on the growth of various molds isolated from foods. *Brazilian archives of Biology and technology* 2004, **48**(2): 245-50.
17. Cox SD, Mann CM, and markham JL. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied microbiology* 2002, **88**:170-75.
18. Caccioni DLR, Guizzardi, Biondi, DM, Renda A, Roberto G. Relationships between volatile components of citrus fruit essential oil and antimicrobial action on *Pencillium digitatum* and *Penicillium italicum*, *International journal of food microbiology* 2000. **88**: 170-75.
19. Odhav B, Juglal S, and Govinden R. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxins producing fungi. *European food research and technology* 2002, **65**:683-7.
20. Issov CC., Koutsoumanis K., and Nychas G JE. Inhibition of *salmonella enteridis* and *staphylococcus aureus* on nutrient broth by *mint* essential oil food *research international* 2000, **48**:273-80.