

مجله میکروبی 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*، محمد اکبری، قاسم حقی، نسترن کاظم پور

بخش تحقیق و توسعه شرکت داروسازی باریج اسانس

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

mahboubi@barijessence.com

تلفن: ۹۱۳۱۶۳۸۹۶۴

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

چکیده

زمینه و اهداف: برخی اسانس‌های گیاهی و اجزای شیمیایی فعال آنها، دارای اثرات ضد باکتریایی 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 *Staphylococcus aureus*، *Aspergillus flavus*، *Vibrio cholera* 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 واکنش‌های 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 آنفلوآنزای طیور مصرف می‌شود. این ترکیب در مواردی که مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها،

تأثیر قرار داده و باعث افزایش تلفات می‌گردد. متوفین باعث پاسخ بهتر سیستم ایمنی بدن طیور گردیده و با ممانعت از واکنش‌های حاد ناشی از واکسن، موجب کاهش تلفات و افزایش بازده گله می‌گردد (۲). تحقیقات بیشتر در کشور آفریقای جنوبی نشان می‌دهد که مصرف متوفین در آب آشامیدنی، علائم بیماری کریزای عفونی ناشی از هموفیلوس پاراگالیناروم (*Haemophilus paragalinarum*) را به شدت کاهش می‌دهد (۲). اثر متوفین بر گله‌های مرغ نژاد گوشتی که بیماری نیوکاسل *VV* همراه با عفونت *Orintobacterium 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 متوفین می‌باشد. رسپیتول - B یک ترکیب گیاهی است که مواد موثره آن دقیقاً مشابه متوفین 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٪ او-۱ سیئول (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 متوفین 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 متوفین 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 دو برابر اسانس اکالیپتوس و فاقد منتول می‌باشد.

سوش‌های میکروبی: در این مطالعه از سویه‌های *B.subtilis*, *B.cereus* ATCC1247, *S.aureus* ATCC25923, *S.typhi* ATCC14028, *S.marscene* ATCC1187, *P.aeruginosa* ATCC9027, *E.coli* ATCC87, *V. cholerae* ATCC 10031 39 و سویه کلینیکی *K.pneumoniae* ATCC 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:

آزمایشات ضد میکروبی به همان روش *Griggs* و همکاران انجام شد (۵). به طور خلاصه ۲-۱ 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 سواب 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، متوفین، 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 فرمول های فوق دارای امولسیفایرهایی فاقد خاصیت ضد میکروبی می باشند در محیط کشت به راحتی حل می گردند. حداقل غلظت مهار کننده رشد و حداقل غلظت کشنده رشد با استفاده از سری دو برابر رقت ماکرو برات دایلو شدن ($1000-15/625 \mu g/ml$) 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 متوفین بیشتر و همچنین قطر هاله عدم رشد اسانس اکالیپتوس از رسپیتول B، متوفین و منتول کمتر است (جدول شماره ۱). بر اساس قطر هاله عدم رشد باکتری‌های گرم مثبت و کانیدیدا آلیکانس نسبت به ترکیبات فوق حساستر از سایر باکتری‌های گرم منفی بودند. این نتایج در استافیلوکوکوس اورئوس و کانیدیدا 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 سویه های 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 ترکیبات فوق مقاوم‌تر 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*، متوفین و منتول بر *K. pneumoniae* از همه باکتری‌های گرم منفی بزرگتر می باشد (جدول شماره ۱) ولی *MBC*، *MIC* آن، با سایر باکتری‌های گرم منفی برابر است. *MIC*ی قارچهای *C. albicans*،

باکتریهای گرم منفی کمتر بود. *MIC* از *A.flavus A.niger* باکتریهای گرم منفی کمتر بود. *MBC*ی *A.flavus*، *A.niger* حدود ۴ برابر *MIC*ی آن بوده ولی در *MBC*، *S. aureus*، *C. abicans* برای همه ترکیبات فوق دو برابر *MIC*ی 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 متوفین و رسپیتول *B* بر همه میکروارگانیسم‌های مطالعه شده یکسان است که نشان می دهد که این ۲ فرمول (متوفین، رسپیتول *B*) دقیقاً دارای ترکیبات مشابه با یکدیگر می باشند.

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.marscens</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>S.typhi</i>	<i>V.chloreae</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

		S.aureus	B.cereus	B.subtilis	E.coli	P.aeruginosa	S.mariscens	K.pneumoniae	S.typhi	V.chloreae	C.albicans	A.niger	A.flavus
Respitol B	a	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰
Mentofin	a	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰
Menthole	a	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰
Eucalyptus	a	۶۲.۵	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۲۵	۱۲۵	۱۲۵
	b	۲۵۰	>۱۰۰۰	>۱۰۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰

a =MIC (µg/ml)
b=MBC (µg/ml)

بحث:

وجود سینتول 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 می دهد (۲). همه این خواص مربوط به اجزای تشکیل دهنده فرمول رسپیتول B یعنی اسانس اکالیپتوس و منتول می باشد (۳-۱).

اسانس اکالیپتوس یک ترکیب ضد التهابی، ضد عفونی کننده و ضد باکتری ضعیف، ضد ویروس، ضد نزله و خلط آور می باشد. این اسانس از التهاب غشاهای موکوسی مخاط بینی، مخاط حلق - بینی، التهاب

اسانس های گیاهی، ترکیب پیچیده ای از اجزای مختلف شیمیائی با مقادیر گوناگون می باشند. بعلا 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.

رسپیتول B به عنوان یک ترکیب ۱۰۰٪ گیاهی و محلول در آب، مشابه با نمونه خارجی (منتوفین) طراحی شده است. این فرآورده، به علت

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 برون سلولی (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 مسلیوم به حداکثر برسد (۸، ۱۸). بر روی اثر ضد میکروبی متتول کار زیادی انجام نشده است. متتول جزء اصلی اسانس نعنائلفلی است (۴).

نتیجه گیری:

متتول 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 متتول دارای اثر میکروب‌کشی خوبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و مخمرها و قارچ‌ها می‌باشد اما اثر میکروب‌کشی آن بر *E. coli*، *P. aeruginosa* و *S. typhi* بسیار ضعیف است. در مورد اثر متتول بر برخی سویه‌های میکروبی حداقل غلظت مهارکننده رشد با حداقل غلظت کشنده رشد برابر است. در فرمول متتوفین یا رسپیتول *B* اثر بالای ضد میکروبی متتول بوسیله اسانس اکالیپتوس کاهش می‌یابد به طوری که اثر ضد میکروبی متتول از متتوفین 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 می‌نماید همچنین از جناب آقای مهندس حجازی مدیر عامل شرکت داروسازی بارپج اسانس به طور ویژه قدردانی می‌نماید.

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 پلاسما 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. aureus*، *S. pyogenes*، *S. pneumoniae* 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 هردو 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*-های *resistance S. aureus (MRSA)*، *P. acnes*، *B. cereus*، *E. faeca T. lis*، *Alicyclobacillus acidoterrestris* و قارچ *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 لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی، احتمالاً مانع از رسیدن ترکیبات فعال اسانس به غشای سیتوپلاسمی باکتری‌های گرم منفی می‌شود (۱۴، ۱۵) همچنین اسانس اکالیپتوس نسبت به باسیلوس سوبتیلیس و سرئوس بی تاثیر بود که این اثر شاید به خاطر اشکال مقاوم سلولی است که باکتری در شرایط نامناسب تولید می‌کند. اکالیپتومول موجود در اسانس اکالیپتوس به تنهایی هیچگونه فعالیتی، ضد کپک

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*, 1th 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 *phytomedicals* 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 *Penicillium 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.