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

محدثه محبوبی[1]*، محمدمهدی فیض‌آبادی[2]

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 اردهال، بخش میکروب‌شناسی شرکت داروسازی باریج اسانس
صندوق‌پستی: ۱۱۷۸ تلفن: ۲۱۱۲ (۰۸۶٦٤۳٦)، نمابر: ۲۱۸۷ (۰۸٦٦٤۳٦)
پست الکترونیک: mahboubi@barijessence.com

تاریخ دریافت: ۸٦/۹/۱۱ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۲/۷

چکیده

مقدمه: حضور پاتوژن‌های بیماری‌زا در مرغداری، سلامت طیور و انسان را تهدید می‌نماید. گیاهان آویشن[1]، مرزنجوش[2]، مرزه[3] و اکالیپتوس[4] 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 آگار 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 آگار، قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها وآسپرژیلوس 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.

نتیجه‌گیری: 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 ضدعفونی‌کننده‌ها و مکمل‌های غذایی جهت کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

گل‌واژگان: مرغداری، آویشن، مرزنجوش، مرزه، اکالیپتوس، اسانس‌های گیاهی

[1] *Zataria multiflora* [2] *Origanum majorana* [3] *Satureja hortensis* [4] *Eucalyptus globules*

www.SID.ir

مقدمه

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. شکی نیست که آنتی‌بیوتیک‌های محرک 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 مقاوم به دارو 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 [۳]. تحقیقات نشان داده است که افزودن ترکیبات دارویی گیاهی به رژیم غذایی پرندگان میکروفلور روده‌ای آنان را تعدیل می‌نماید [٤]. هم‌چنین ثابت شده است که برخی از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی‌سپتیک و ضدمیکروبی [۱] و اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند [۲]. سابقه استفاده از گیاهان جهت درمان بیماری‌ها به تاریخ تولد بشر باز می‌گردد. در پی 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 مختلفی اثر ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی را مطالعه نموده‌اند [۷،۸،۹] تحقیقات نشان داده که تیمول و کارواکرول و سیناماآلدئید موجود در اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و دارچین دارای اثرات ضدباکتریایی در برابر اشریشیاکلی O_{157}[1] و سالمونلا تیفی موریوم[2] می‌باشند [۵]. هم‌چنین مشخص شده که مخلوطی از اسانس‌های میخک (۱ درصد)، آویشن (۰/۱ درصد)، نعنا فلفلی (۰/۱ درصد) و لیمو (۰/۱ درصد) می‌تواند تعداد اووسیت‌های کوکسیدیا[1] را در جوجه‌های گوشتی کاهش دهد [٦]. مطالعات مختلفی انجام شده که در آن اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه و اکالیپتوس به تنهایی 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 ۸ سوش پاتوژن *Escherichia* coli جدا شده از طیور و سوش استاندارد *E. coli* ATCC 8739 و *E. coli* O2K12 و قارچ‌های *Aspergillus niger* ATCC 16404 و دو سویه فارمی *A. niger*، *A. flavus* استفاده شد. سویه‌های باکتریایی یک شب قبل از انجام آزمایش روی محیط نوترینت آگار 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 هوازی گرمخانه‌گذاری شدند.

اسانس‌های گیاهی: اسانس‌های گیاهی آویشن، مرزنجوش، مرزه، اکالیپتوس به روش تقطیر با دستگاه کلونجر[3] تهیه شد. اجزای عمده 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 فارلند) تهیه شد به نحوی که غلظت باکتری‌ها در حدود ۱×۱۰^{۸} CFU/ml و

[1] *Escherichia* coli O157
[2] *Salmonella typhimurium*

[1] *Coccidioides immitis*
[3] Clevenger type apparatus

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت قارچ‌ها CFU/ml ۱×۱۰^{۵} باشد. از سوسپانسیون‌های مزبور با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار (باکتری‌ها) و محیط مولر هینتون 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 دی متیل سولفوکساید[1] و اتانول ۹۶ به عنوان حلال استفاده شد. کشت‌های باکتریایی و قارچی به ترتیب در دمای ۳۷ و ۲۲ درجه سانتی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری و نتایج قطر هاله 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 CFU/ml ۱×۱۰^{۶} و سوسپانسیون قارچی به CFU/ml ۱×۱۰^{۴} برسد. اسانس‌های مرزنجوش، مرزه و آویشن به نسبت مساوی با یکدیگر ترکیب و از آن‌ها سری دو برابر رقت در محدوده غلظت µg/ml ۱/۹۵–۵۰۰ 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 گرمخانه‌گذاری شدند. اولین لوله که در آن رشدی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده رشد[2] و اولین لوله‌ای که در آن رشدی بر روی محیط جامد ایجاد نکرد به عنوان حداقل غلظت‌کشنده [3] گزارش شد.

نتایج

اسانس‌های آویشن، مرزه، مرزنجوش و اکالیپتوس استفاده شده در این مطالعه از نظر نوع و میزان ماده موثره با یکدیگر 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 مرزنجوش و ۸۰ درصد اکالیپتول (۱،۸ – سینئول) و۱/۲ درصد آلفا پینن 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 دی متیل سولفوکساید استفاده شد و غلظت ۲ میلی‌گرم از اسانس‌های مرزه، مرزنجوش، آویشن و اکالیپتوس در پایه دو حلال فوق بر باکتری‌ها و قارچ‌ها اثر داده شد. نتایج نشان داد که نوع حلال، تفاوت معنی‌داری در اثربخشی اسانس ایجاد می‌نماید ($p<۰/۰۰۱$). هنگامی‌که اسانس در پایه الکل حل شود نسبت به زمانی که از دی متیل سولفوکساید 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 مرزنجوش و کمترین اثر مربوط به اسانس اکالیپتوس می‌باشد. زمانی که اسانس‌ها با یکدیگر ترکیب می‌شوند در پایه الکل ترکیب مرزه و آویشن دارای بیشترین اثر و در پایه دی متیل سولفوکساید بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به مرزنجوش و آویشن می‌باشد. در پایه الکل ترکیب سه تایی مرزه، مرزنجوش و آویشن دارای اثر کمتری نسبت به ترکیب دوتایی مرزه و آویشن و اثر بیشتری نسبت به مرزنجوش 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، مرزنجوش و آویشن حساستر از باکتری‌های فوق می‌باشند، ولی باکتری‌های مورد مطالعه نسبت به اسانس اکالیپتوس از قارچ‌ها حساستر بودند (نمودار شماره ۳). قارچ‌ها تفاوت معنی‌داری نسبت به اسانس‌های فوق در قطر هاله عدم رشد نشان می‌دهند ($p<۰/۰۰۱$). بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به ترکیب مرزه و آویشن می‌باشد (۴۵ میلی‌متر).

[1] DMSO [2] MIC [3] MLC

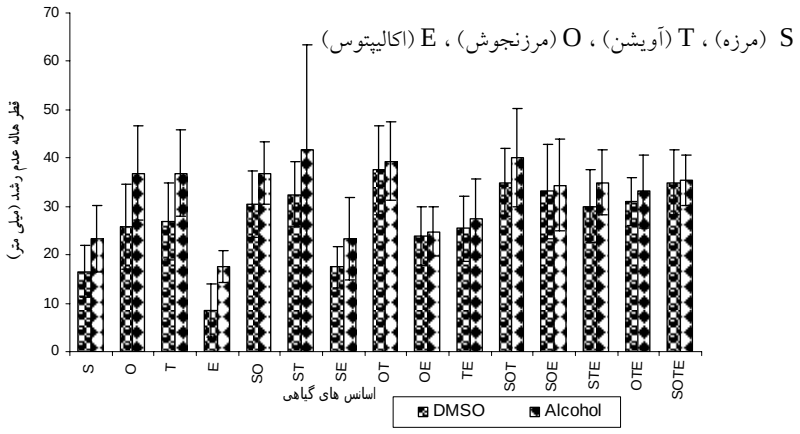
Archive of SID
www.SID.ir

هنگامی که اثر اسانس به تنهایی روی قارچ بررسی شود اسانس آویشن با قطر هاله عدم رشد ۳۸ میلی‌متر دارای بیشترین اثر و اکالیپتوس با قطر هاله عدم رشد ۱۱/٤ میلی‌متر دارای کمترین اثر می‌باشد (نمودار شماره ۳).

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

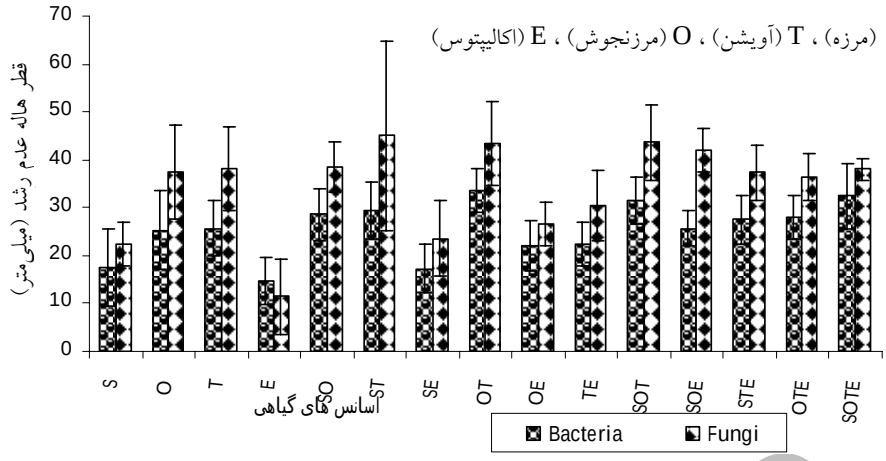
نام گیاه	نام علمی گیاه	موارد استفاده از گیاه	مواد موثره گیاه
آویشن	*Zataria multiflora*	تقویت بینایی، تقویت معده، ضدکرم، رفع بوی بددهان، ضدمیکروب	تیمول (۲۷ درصد)، کارواکرول (۳۹ درصد)
مرزه	*Satureja hortensis*	مقوی معده، بادشکن، ضد نزله، رفع اسهال و ضدکرم	کارواکرول (۳۸/۹ درصد)
مرزنجوش	*Origanum majorana*	بازکننده گرفتگی‌های دماغی و ضدعفونی کننده، التیام‌دهنده زخم‌ها	تیمول (۲۱/۱درصد) و کارواکرول (٦۲ درصد)
اکالیپتوس	*Eucalyptus globules*	ضدعفونی کننده، ضدویروس	اکالیپتول (۸۰ درصد)، آلفاپینن (۱/۲ درصد)

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



نمودار شماره ۲- شاخص‌های قطر هاله عدم رشد بر حسب نوع حلال و نوع اسانس

Archive of SID
www.SID.ir



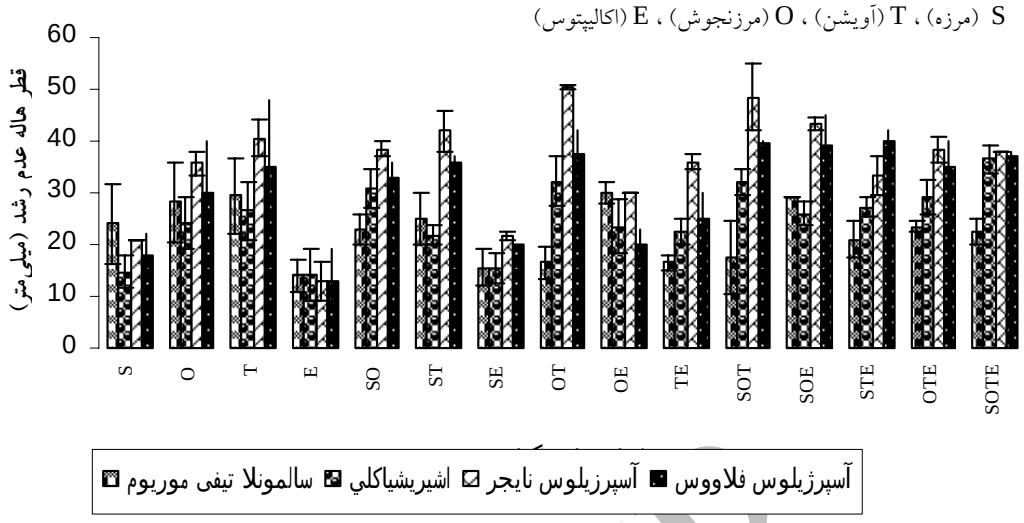
نمودار شماره ۳- شاخص‌های آماری قطر هاله عدم رشد برحسب نوع میکروارگانیزم

در باکتری‌ها بیشترین اثر مربوط به اسانس مرزنجوش و آویشن با قطر ۳۳/۵ میلی‌متر است. اثر اسانس آویشن و مرزنجوش بر باکتری‌ها تقریباً برابر و اسانس اکالیپتوس با قطر هاله عدم رشد ۱٤/٦ میلی‌متر دارای اثر ضعیف‌تری می‌باشد (نمودار شماره ۳). در مقایسه اثر اسانس‌ها بر روی میکروارگانیسم‌های مختلف، سوش‌های آسپرژیلوس نایجر از سایرین نسبت به اسانس‌های گیاهی حساس‌تر می‌باشند آسپرژیلوس نایجر از آسپرژیلوس فلاوس حساس‌تر است و میزان حساسیت سویه‌های مختلف باکتریایی نسبت به اسانس‌های گیاهی به نوع باکتری و اسانس مورد بررسی بستگی دارد. در بین ایزوله‌های میکروبی مورد مطالعه، اسانس مرزه، دارای بیشترین اثر بر سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد و کمترین اثربخشی این اسانس روی سویه‌های اشیریشیاکلی است. به طورکلی اشیریشیاکلی از سالمونلا تیفی موریوم نسبت به اسانس‌های آویشن، مرزنجوش، مرزه مقاوم‌تر است. ترکیب چندتایی اسانس‌ها میزان حساسیت سالمونلا تیفی موریوم را کاهش می‌دهد و در بعضی ترکیبات اسانسی سوش‌های اشیریشیاکلی از سالمونلاتیفی موریوم حساس‌تر می‌شوند (نمودار شماره ٤). با توجه به نمودارهای فوق صرف‌نظر از نوع حلال، اثر ترکیب دوتایی اسانس‌های آویشن، مرزنجوش و مرزه، آویشن و مرزنجوش، مرزه نسبت به سایر ترکیبات مورد مطالعه بیشتر است به همین علت میزان حداقل غلظت مهارکننده رشد و حداقل غلظت کشندگی رشد در برابر ۳ سوش استاندارد تعیین شد (جدول شماره ۳). میزان حداقل غلظت مهارکنندگی رشد برای قارچ‌ها کوچکتر از باکتری‌های مورد بررسی است ولی حداقل غلظت کشندگی همه اسانس‌ها برای قارچ‌ها چهار برابر حداقل غلظت مهارکنندگی آن است. این تحقیق نشان داده است که اسانس‌های فوق دارای اثر مهاری قوی‌تری نسبت به قارچ‌ها در مقایسه با اثر قارچ‌کشی هستند. در بین دو میکروارگانیسم مطالعه شده *E. coli* با حداقل غلظت مهارکنندگی کوچکتر، از سالمونلا تیفی موریوم حساستر است (جدول شماره۲). که با نتایج نمودار شماره ٤ مطابقت دارد. ترکیب دوتایی مرزه - مرزنجوش و مرزنجوش- آویشن بر اشیریشیاکلی موثرتر از سالمونلا تیفی موریوم است.

بحث

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

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار شماره ٤- شاخص‌های آماری قطر هاله عدم رشد برای سوش‌های مختلف میکروبی

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

	TO		ST		SO	
باکتری	MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
اشریشیاکلی	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰	۱۲۵	۲۵۰
سالمونلا تیفی موریوم	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰	۱۲۵	۵۰۰
آسپرژیلوس نایجر	٦۳	۵۰۰	٦۳	۵۰۰	٦۳	۵۰۰

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 µg/ml اندازه‌گیری شده است.

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 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 شیب 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 سینرژیستی می‌باشند [۱۳]. به همین علت اثر ضدمیکروبی مرزنجوش از مرزه بیشتر است. اکالیپتوس با ۸۰ درصد اکالیپتول دارای کمترین اثر ضدمیکروبی می‌باشد ثابت شده است که تیمول، کارواکرول دارای اثر ضدمیکروبی زیاد هستند در حالی که اکالیپتول دارای اثرات ضدمیکروبی ضعیفی می‌باشد [١٤]. زمانی که از دی متیل سولفوکساید به عنوان حلال استفاده شود قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها نسبت به اسانس اکالیپتوس حساس‌تر می‌باشند در حالی که اگر از اتانول به عنوان حلال استفاده شود اثر ضدباکتری 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]. اکالیپتول موجود در اسانس اکالیپتوس به تنهایی هیچ‌گونه فعالیتی در مقابل قارچ‌ها نشان نمی‌دهد [١٦]. اسانس‌های گیاهی روی قارچ‌ها دارای اثر مهارکنندگی بیشتری نسبت به باکتری‌ها هستند ولی اسانس‌های گیاهی اثر باکتری‌کشی قوی‌تری در مقایسه با اثر قارچ‌کشی

Archive of SID
www.SID.ir

دارند. اسانس اکالیپتوس یک ترکیب ضدالتهابی، ضدعفونی‌کننده 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 ضدعفونی‌کننده‌ها و مکمل‌های غذایی جهت کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان 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.

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.*

Archive of SID
www.SID.ir

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.

Archive of SID

www.SID.ir