University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 4, 2024, 213-222

Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Thyme Essential Oil Against *Salmonella* Enteritidis and the Effects of the Essential oil at Sub-Inhibitory Concentration on Bacterial Invasion in Broiler Chickens: An Experimental Study

Faezeh Rahimi Pirmahalle[1]✉, Mohammad Hassanzadeh[2]✉, Sara Mirzaie[3]✉, Ramak Yahyaraeyat[4]✉, Jamshid Razmyar[2]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Department of Animal, Poultry and Aquatics, Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran*
[4] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

Received: *10 July 2024,* ***Accepted:*** *17 September 2024*

10.22059/jvr.2023.362598.3368

Abstract

BACKGROUND: *Salmonella* Enteritidis (SE) in chickens is associated with growth depression and mortality of young chicks. Moreover, poultry products are identified as a prominent source of SE, which can cause food-borne diseases in humans. Therefore, considering the economic and public health significance of SE, control of this bacterial infection is important.

OBJECTIVES: This study aims to assess colonization and invasion of SE after exposure to the thyme essential oils in experimentally infected broiler chickens.

METHODS: Minimum inhibitory concentration (MIC) of thyme essential oils was measured by broth microdilution method. A total of 75 one-day-old Ross 308 chicks were randomized to three experimental groups of 25 (A, B and C). At 9 days old, groups A and B were challenged with 10^8 colony-forming unit (CFU) of SE with and without previous exposure to thyme essential oils at 50% MIC. Group C (control) received a bacteria-free buffer. On days 9, 16 and 24 after the challenge, cloacal swabs and samples from visceral organs were collected from slaughtered birds and evaluated for the presence of Salmonella.

RESULTS: The MIC of thyme essential oil for SE was obtained 1.25 mg/mL. Results of experimental infection showed a significant reduction of SE in the cloaca, ceca, liver, and spleen of group A compared to group B throughout the sampling times. On day 16 after infection, Salmonella was isolated at 1 and 7.4 log CFU/g of cloacal swabs and at 3.2 and 9.2 log CFU/g of ceca in groups A and group B, respectively.

CONCLUSIONS: According to the results, previous exposure of SE to the thyme essential oil at a sub-inhibitory concentration can reduce the colonization and invasion of this pathogen in broiler chickens.

Keywords: Broiler chickens, Invasion, Minimal inhibitory concentration, *Salmonella* Enteritidis, Thyme essential oils

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).
Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Mohammad Hassanzadeh, Tel/Fax: +9821-61117000 / +9821-66933222

How to cite this article:

Rahimi Pirmahalle F, Hassanzadeh M, Mirzaie S, Yahyaraeyat R, Razmyar J. Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Thyme Essential Oil Against *Salmonella* Enteritidis and the Effects of the Essential oil at Sub-Inhibitory Concentration on Bacterial Invasion in Broiler Chickens: An Experimental Study. J Vet Res, 2024; 79(4): 223-232. doi: 10.22059/jvr.2023.362598.3368

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Chemical compounds of thyme essential oils identified by gas chromatography-mass spectrometry method.
Table 2. Mean counts (log CFU/g) of *Salmonella* in liver, spleen, ceca and cloacal swabs of groups A (Inoculated with *Salmonella*, exposed to thyme essential oil) and B (Inoculated with *Salmonella*, non-exposed to thyme essential oil). [a b] Means with unlike superscripts indicate significant differences (P<0.05).

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۹، شماره ۴، ۱۴۰۳، ۲۳۲-۲۲۳

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) روغن‌های اسانس آویشن بر ضد *سالمونلا انتریتیدیس* و ارزیابی اثر غلظت تحت مهاری آن بر میزان تهاجم باکتری در جوجه‌های گوشتی: مطالعه تجربی

فائزه رحیمی پیرمحله[۱]، محمد حسن‌زاده[۲]، سارا میرزائی[۳]، رامک یحیی‌رعیت[۴]، جمشید رزم‌یار[۲]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *گروه بیماریهای پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *گروه دام، طیور و آبزیان، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران*
[۴] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۰ تیر ماه ۱۴۰۳ ، **تاریخ پذیرش:** ۲۷ شهریور ماه ۱۴۰۳

10.22059/jvr.2023.362598.3368

چکیده

زمینه مطالعه: عفونت ناشی از *سالمونلا انتریتیدیس* در ماکیان با کاهش رشد و تلفات در جوجه‌های جوان شناخته می‌شود. همچنین محصولات طیور به‌عنوان منبع مهم *سالمونلا انتریتیدیس* که در ایجاد مسمومیت غذایی در انسان نقش دارد، در نظر گرفته می‌شوند. ازاین‌رو، نظر به اهمیت‌های اقتصادی و بهداشت عمومی عفونت‌های سالمونلایی، توجه به کنترل عفونت ناشی از آن در ماکیان ضروری است.

هدف: مطالعه حاضر باهدف ارزیابی میزان کلونیزاسیون و تهاجم باکتری مواجه‌شده با روغن‌های اسانس آویشن در جوجه‌های گوشتی تحت عفونت تجربی طراحی و اجرا شد.

روش‌کار: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) روغن‌های اسانس آویشن علیه *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از روش میکرو دایلوشن براث انجام شد. برای بررسی اثر روغن‌های اسانس بر کلونیزاسیون و تهاجم باکتری، ۷۵ قطعه جوجه یک‌روزه نژاد راس ۳۰۸ به‌صورت تصادفی به ۳ گروه (A، B و C) با ۵ تکرار و ۵ پرنده در هر تکرار تقسیم شدند. جوجه‌های گروه‌های A و B در سن ۹ روزگی به‌ترتیب با 10^8 واحد تشکیل‌دهنده کلنی باکتری کشت داده‌شده با غلظت ۵۰ درصد MIC اسانس و یا بدون آن تلقیح شدند. گروه C به‌عنوان شاهد، تنها بافر بدون باکتری دریافت کرد. در روزهای ۹، ۱۶ و ۲۴ پس از عفونت تجربی، سواب کلوآکی و نمونه‌های اندام‌های احشایی از پرنده‌های کشتارشده جمع‌آوری و ازنظر سالمونلا بررسی شدند.

نتایج: میزان MIC اسانس آویشن برای *سالمونلا انتریتیدیس* ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد. نتایج عفونت تجربی بیانگر کاهش قابل‌توجه باکتری جداشده از کلوآک، سکوم، کبد و طحال جوجه‌های گروه A در مقایسه با گروه B در همه روزهای نمونه‌گیری بود. در روز ۱۶ پس از عفونت تجربی از کلوآک جوجه‌های A و B به‌ترتیب ۱ و ۷/۴ و از سکوم آن‌ها ۳/۲ و ۹/۲ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم سالمونلا جدا شد که اثر مهاری اسانس آویشن بر سالمونلای تلقیح‌شده به جوجه‌ها را نشان داد ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده کاهش کلونیزاسیون و تهاجم *سالمونلا انتریتیدیس* در جوجه‌های گوشتی تحت عفونت تجربی با باکتری دارای مواجهه قبلی با غلظت تحت مهاری روغن‌های اسانس آویشن بود.

کلمات کلیدی: تهاجم، جوجه‌های گوشتی، حداقل غلظت مهارکنندگی، روغن‌های اسانس آویشن، *سالمونلا انتریتیدیس*

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.
ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: *محمد حسن‌زاده، گروه بیماریهای پرندگان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

مقدمه

سروارهای متحرک سالمونلا یا سالمونلاهای پاراتیفوئید ازجمله *سالمونلا انتریتیدیس*، باکتری‌هایی غیروابسته به میزبان می‌باشند که علاوه‌بر بیماری‌زایی در حیوانات اهلی و وحشی، در ایجاد مسمومیت غذایی در انسان نقش دارند. عفونت ناشی از سالمونلا در پرندگان به‌صورت افقی و عمودی قابل‌انتقال است و در جوجه‌های کم‌سن، به‌ویژه در شرایط نگهداری غیربهداشتی و پرتنش موجب بیماری و تلفات می‌شود. پرندگان بالغ، معمولاً نشانه‌های بالینی خاصی را بروز نمی‌دهند. *سالمونلا انتریتیدیس* در روده کلونیزه می‌شود و قادر است با تهاجم ازطریق روده به اندام‌های داخلی نظیر طحال و کبد گسترش یابد. بیشتر موارد عفونت‌های ناشی از *سالمونلا انتریتیدیس* در انسان مرتبط با مصرف تخم‌مرغ و گوشت ماکیان است (۱).

گسترش سریع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، ایجاد باقی‌مانده در محصولات دام و طیور و تمایل مصرف‌کنندگان به غذاهایی با منشأ دامی عاری از آنتی‌بیوتیک، موجب افزایش علاقه محققین به مطالعه درزمینه جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (۲). روغن‌های اسانس منابع بالقوه ترکیبات ضدمیکروبی جدید به‌ویژه بر ضد عوامل بیماری‌زای باکتریایی به شمار می‌روند (۳). این ترکیبات مخلوطی از مواد با وزن مولکولی کم و فرار می‌باشند و عمدتاً از ترپن‌ها و ترکیبات فنولی مختلف تشکیل شده‌اند (۴). مقدار روغن‌های اسانس قابل‌استخراج از یک جنس گیاه و ترکیب شیمیایی آن بسته به عوامل مختلف مرتبط با تنوع جغرافیایی، آب‌وهوایی، شرایط کشت و تغییرات فصلی متفاوت است (۵). به‌طورکلی اثرات ضدمیکروبی روغن‌های اسانس گیاهی ازطریق سازوکارهای مختلفی، ازجمله اختلال در ساختار دیواره سلولی، غشای سیتوپلاسمی، ماده ژنتیکی، تنفس و سوخت‌وساز سلولی و یا اثرگذاری بر بیان ژن‌های حدت ایجاد می‌شود. وجود این سازوکارهای چندگانه در ایجاد اثرات ضدمیکروبی، توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر ضد روغن‌های اسانس گیاهی را غیرمحتمل می‌کند (۱، ۵-۸).

آویشن با نام علمی *تیموس ولگاریس* (*Thymus vulgaris*) متعلق به تیره نعنائیان (Lamiaceae) و بومی منطقه مدیترانه، شمال آفریقا و بخش‌هایی از غرب آسیا، ازجمله ایران است. به‌طورکلی جنس *تیموس* دارای ۴۰۰ گونه مختلف است که در میان آن‌ها ۴ گونه بومی ایران وجود دارد و گونه معروف *ولگاریس* به‌صورت صنعتی در کشور کشت می‌شود. اسانس آویشن دربردارنده ترکیبات زیست‌فعال مختلفی، همچون انواع فلاونوئیدها، ترپن‌ها، ترپنوئیدها و فنول‌ها است که تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) از مهم‌ترین ترکیبات فنولی آن به شمار می‌روند (۹). مطالعات بسیاری در جهان درمورد اثرات زیستی روغن‌های اسانس آویشن صورت گرفته است و با وجود تنوع در نسبت ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی قوی برای آن نشان داده شده است (۱۰). در مطالعه Hamed و همکاران در سال ۲۰۲۲ مشخص شد استفاده از عصاره روغنی آویشن در جوجه‌های گوشتی دچار عفونت تجربی با *سالمونلا تیفی‌موریوم* موارد تلفات در مقایسه با جوجه‌های مبتلا و درمان‌نشده را ۵۰ درصد کاهش می‌دهد (۱۱). همچنین Gholipour-Shoshod و همکاران در سال ۲۰۲۳ نشان دادند تجویز خوراکی اسانس آویشن به جوجه‌های گوشتی، سبب کاهش جمعیت سالمونلاهای سکومی می‌شود (۱۲). در مطالعه Escobar و همکاران در سال ۲۰۲۰ با بررسی اثر ضدمیکروبی روغن‌های اسانس از گیاهان مختلف شامل پونه کوهی (ارگانو)، آویشن و دارچین بر ضد سروارهای *سالمونلا انتریکا* و سویه‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داده شد *سالمونلا انتریتیدس* نسبت به اثرات مهاری روغن‌های اسانس حساسیت زیادی دارد (۱۳).

باتوجه‌به اهمیت *سالمونلا انتریتیدیس* به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک در صنعت طیور و نیز مسئله بهداشت عمومی، مطالعه اثرات ضدمیکروبی ترکیبات طبیعی بر رشد و حدت این باکتری اهمیت پیدا می‌کند. مطالعات متعددی در شرایط آزمایشگاهی، اثر روغن‌های اسانس با غلظت کمتر از حداقل غلظت بازدارندگی بر کاهش حدت و رشد باکتری‌های مهم در ماندگاری مواد غذایی را بررسی کرده‌اند، اما تاکنون چنین مطالعاتی درمورد باکتری‌های بیماری‌زای طیور انجام نشده است. باتوجه‌به مطالب پیش‌گفت، مطالعه حاضر باهدف ارزیابی اثر روغن‌های اسانس آویشن بر کلونیزاسیون و تهاجم *سالمونلا انتریتیدس* مواجه‌شده با اسانس در غلظت تحت مهاری در جوجه‌های گوشتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

تهیه سویه باکتریایی و اسانس آویشن: سویه باکتریایی مورداستفاده در مطالعه حاضر، *سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس* NIDO 76Sa88 Nalr، فاژتایپ ۴ بود (۱۴). ابتدا گیاه آویشن تهیه شد. اسانس‌گیری از بخش‌های هوایی گیاه که ابتدا در سایه خشک و سپس پودر شده بود، به روش تقطیر و با استفاده از کلونجر، مطابق با روش گزارش‌شده توسط Mahmoudi و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد (۱۵). برای تحلیل ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس از روش کروماتوگرافی گازی‌ـطیف‌سنجی جرمی (Gas chromatography–mass spectrometry) (GC/MS) استفاده شد. برای این منظور، نمونه با هگزان رقیق شد و از ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 استفاده شد. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و نرم‌افزار chemstation صورت گرفت (۱۶، ۱۷).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس آویشن علیه *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از روش میکرودایلوشن براث (Microdilution Broth) با ۳ بار تکرار انجام شد (۱۸). به این ترتیب که به هرکدام از گودهای پلیت ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) (مرک، آلمان) حاوی ۵ درصد حجمی / حجمی دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان امولسیفایر اضافه شد. سپس به اولین گوده هر ردیف ۲۰۰ میکرولیتر (۱۰۰۰۰ قسمت در میلیون) اسانس آویشن اضافه شد تا رقت‌های سریالی مختلف در گودهای یک ردیف پلیت ایجاد شود. غلظت سوسپانسیون باکتری برابر با ۰/۵ مک‌فارلند ($۱۰^{۸}$ × ۱/۵ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر) بود. گودهای حاوی محیط کشت و دی‌متیل‌سولفوکساید، بدون اسانس و دارای باکتری به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. در ادامه محتویات گودهها با قرار دادن پلیت‌ها روی شیکر اوربیتال یکنواخت شد و سپس در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام گرم‌خانه‌گذاری کدورت یا عدم کدورت گودهها به‌صورت چشمی و همچنین جذب نوری توسط دستگاه قرائت میکروپلیت در ساعت صفر و پس از گذشت ۲۴ ساعت در طول موج ۴۹۰نانو متر قرائت شد. گوده حاوی کمترین غلظت از اسانس که در آن کدورتی قابل‌مشاهده نبود به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. به‌منظور ارزیابی حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از گودههای فاقد کدورت ظاهری (غلظت‌های MIC و بالاتر) که رشدی در آن صورت نگرفته بود، مقدار ۱۰ میکرولیتر روی محیط آگار خوندار (مرک، آلمان) کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود به‌عنوان MBC تعیین شد (۱۹).

عفونت تجربی در جوجه‌های گوشتی: ایجاد عفونت تجربی با در نظر گرفتن دستورالعمل کمیته اخلاق کار با حیوانات و با شناسه IR.UT.VETMED.REC.1402.015 انجام شد. تعداد ۷۵ قطعه جوجه یک‌روزه نژاد راس ۳۰۸ از یک مرکز جوجه‌کشی تجاری تهیه شد. بلافاصله پس از ورود، از ۵ قطعه از جوجه‌ها به‌صورت تصادفی سواب کلوآکی تهیه و کشت شد تا از منفی بودن جوجه‌ها ازنظر آلودگی به سالمونلا اطمینان حاصل شود. جوجه‌ها به روش توزیع تصادفی ساده به ۳ گروه ۲۵ تایی (۵ تکرار و ۵ پرنده در هر تکرار) با نام‌های A و B و C تقسیم شدند. در سن ۹ روزگی به جوجه‌های گروه A، $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی *سالمونلا انتریتیدس* در حجم ۰/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین که در معرض اسانس با غلظت ۵۰ درصد MIC قرار گرفته بود با استفاده از لوله داخل چینه‌دان تلقیح شد. به پرندگان گروه B نیز همین میزان باکتری، اما از کشت بدون اسانس تلقیح شد. جوجه‌های گروه C به‌عنوان شاهد، تنها بافر با همان حجم دریافت کردند. در روزهای ۹، ۱۶ و ۲۴ پس از عفونت تجربی، سواب کلوآکی برای جداسازی سالمونلا گرفته شد. همچنین، ۵ جوجه از هر گروه در روزهای ذکرشده کشتار شد و نمونه‌های سکوم، کبد و طحال برای آزمایش‌های باکتری‌شناسی بررسی شدند. سواب‌های کلوآکی اخذشده ابتدا در نرمال سالین قرار داده شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر از ترکیب حاصله روی محیط کشت آگار زایلوز لیزین دئوکسی‌کلات (XLD) (مرک، آلمان) کشت داده شدند. کشت باکتریایی به میزان ۱۰ میکرولیتر از اندام‌های سکوم، کبد و طحال هموژن‌شده و رقت‌های ۱۰ برابر در نرمال سالین بر روی محیط XLD انجام شد. پس از ۱ شب گرم‌خانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد باکتری به‌صورت لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم تعیین و گزارش شد (۲۰).

تجزیه‌وتحلیل آماری: تجزیه‌وتحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ انجام شد. داده‌های توصیفی به‌صورت میانگین شمارش کلنی *سالمونلا انتریتیدیس* از اندام‌های داخلی و سواب کلوآکی (لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم) بیان شدند. برای تجزیه‌وتحلیل روند تغییرات داده‌ها در گروه‌های آزمایشی در روزهای ۹، ۱۶ و ۲۴ از تحلیل داده‌های تکراری (Repeated Measures) استفاده شد. اثرات معنی‌داری در سطح $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی روغن‌های اسانس آویشن شناسایی‌شده به‌وسیله GC/MS.

ردیف	اجزا	زمان احتباس (دقیقه)	شاخص کواتس*(KI)	درصد	ردیف	اجزا	زمان احتباس (دقیقه)	شاخص کواتس*(KI)	درصد
۱	۲ ـ اتیل هگزانول	۸/۰۹	۸۵۵	۰/۰۷	۲۱	سیس پی‌منت ۲ ـ اِن ـ۱ ـ ال	۲۱/۵۸	۱۱۲۲	۰/۰۷
۲	تری سیکلن	۱۰/۸۹	۹۲۶	۰/۰۷	۲۲	کامفور	۲۲/۸۷	۱۱۴۶	۰/۵۶
۳	آلفا‌ـتوجن	۱۱/۰۵	۹۳۰	۱/۴۸	۲۳	بورنئول	۲۴/۰۹	۱۱۶۹	۲/۰۳
۴	آلفا‌ـپینن	۱۱/۴۴	۹۳۹	۱/۱۸	۲۴	ترپینن‌ـ۴ ـال	۲۴/۴۳	۱۱۷۷	۰/۸
۵	کامفن	۱۲/۳۲	۹۵۴	۱/۰۵	۲۵	پی‌ـسایمن‌ـ۸ ـال	۲۴/۹۲	۱۱۸۲	۰/۱۱
۶	سابینن	۱۳/۵۱	۹۷۵	۰/۰۴	۲۶	آلفا‌ـترپینئول	۲۵/۲۲	۱۱۸۸	۰/۲۷
۷	بتا‌ـپینن	۱۳/۷۷	۹۷۹	۰/۳	۲۷	تیمول، متیل اتر	۲۶/۶۹	۱۲۳۵	۰/۴۷
۸	۱ ـاوکتن‌ـ ۳ ـ ال	۱۴/۰۸	۹۷۹	۰/۷۷	۲۸	کارواکرول، متیل اتر	۲۷/۱۱	۱۲۴۴	۰/۳۵
۹	میرسن	۱۴/۳۵	۹۹۰	۱/۴	۲۹	ژرانیول	۲۷/۷۴	۱۲۵۲	۰/۱
۱۰	۳ ـ اوکتانول	۱۴/۹۳	۹۹۱	۰/۱۴	۳۰	اِل‌ـآلفا‌ـبورنیل استات	۲۹/۲۷	۱۲۸۵	۰/۳۳
۱۱	آلفا‌ـفلاندرن	۱۵/۳	۱۰۰۲	۰/۲۳	۳۱	تیمول	۲۹/۹۴	۱۲۹۰	۳۷/۶۱
۱۲	آلفا‌ـترپینن	۱۵/۸۳	۱۰۱۷	۱/۴۵	۳۲	کارواکرول	۳۰/۲۵	۱۲۹۹	۳/۴
۱۳	پی‌ـسایمن	۱۶/۳۶	۱۰۲۴	۲۷/۴۷	۳۳	تیمول استات	۳۲/۰۶	۱۳۵۲	۰/۰۸
۱۴	لیمونن	۱۶/۵	۱۰۲۹	۰/۵	۳۴	ای‌ـکاریوفیلن	۳۵/۱۶	۱۴۱۹	۰/۹۷
۱۵	۱ و ۸‌ـسینئول	۱۶/۶۸	۱۰۳۱	۰/۹۳	۳۵	گاما‌ـمورولن	۳۷/۵	۱۴۷۹	۰/۰۵
۱۶	گاما‌ـترپینن	۱۸/۰۴	۱۰۵۹	۱۰/۰۴	۳۶	جرماکردن دی	۳۷/۷۹	۱۴۸۱	۰/۰۶
۱۷	سیس‌ـسابینن هیدرات	۱۸/۷۶	۱۰۷۰	۰/۵۷	۳۷	گاما‌ـکادینن	۳۹/۱۳	۱۵۱۳	۰/۰۶
۱۸	ترپینولن	۱۹/۴	۱۰۸۸	۰/۰۸	۳۸	دلتا‌ـکادینن	۳۹/۲۷	۱۵۲۳	۰/۱۱
۱۹	پی‌ـسایمن	۱۹/۸۷	۱۰۹۱	۰/۰۵	۳۹	اسپاتولنول	۴۱/۸۳	۱۵۷۸	۰/۱۸
۲۰	لینالول	۲۰/۲۴	۱۰۹۶	۲/۴۶	۴۰	کاریوفیلن اکساید	۴۲/۰۱	۱۵۸۳	۰/۵

* Kovats index.

جدول ۲. میانگین شمارش کلنی *سالمونلا انتریتیدیس* از اندام‌های داخلی و سواب کلوآکی (لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم).

نمونه‌گیری (روز پس از عفونت تجربی)	گروه‌های آزمایشی[†]	سواب کلوآکی	سکوم	کبد	طحال
۹	A	۴/۴	۶/۴	۱	۰/۴
	B	۵/۶	۹	۲	۰/۸
۱۶	A	۱[b]	۳/۲[b]	۰/۴	۰
	B	۷/۴[a]	۹/۲[a]	۰/۸	۰/۴
۲۴	A	۰	۱/۴	۰/۲	۰
	B	۰	۰	۰/۴	۰/۲

گروه A: تلقیح‌شده با سالمونلای کشت‌شده در حضور روغن‌های اسانس آویشن. گروه B: تلقیح‌شده با سالمونلای کشت‌شده بدون حضور روغن‌های اسانس آویشن.
[†] گروه C یا شاهد بدون عفونت تجربی. ازآنجاکه طی روزهای نمونه‌گیری، سالمونلا از این گروه جدا نشد، نام این گروه در جدول آورده نشده است. در هر ستون میانگین‌هایی که با حروف لاتین متفاوت مشخص شده‌اند اختلاف معنی‌داری دارند ($P<0/05$).

نتایج

ترکیب شیمیایی اسانس آویشن: بازدهی اسانس‌گیری از بخش‌های هوایی گیاه ۱/۸ درصد (حجمی/ وزنی) به دست آمد. آنالیز ترکیب شیمیایی تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانس آویشن به روش GC/MS نشان‌دهنده حضور ۴۰ ماده مختلف بود که در جدول ۱ ارائه شده است. این ترکیبات شناسایی‌شده درمجموع بیش از ۹۸ درصد از کل ترکیب روغن‌های اسانس را تشکیل دادند. همان‌طور که در جدول یادشده نشان داده شده است، تیمول (۳۷/۶۱ درصد)، پی‌ـسایمن (۲۷/۴۷ درصد) و گاما ـ ترپینن (۱۰/۰۴ درصد) فراوان‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانس بودند.

نتایج MIC و MBC: مقدار MIC و MBC روغن‌های اسانس آویشن برای سویه *سالمونلا انتریتیدیس* با منشأ طیور در مطالعه حاضر برابر با ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد.

جداسازی باکتری پس از عفونت تجربی: میانگین جداسازی و شمارش کلنی سالمونلا از هر گرم از اندام‌های موردبررسی نظیر سکوم، طحال، کبد و همچنین کشت سواب‌های کلوآکی در جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول پیش‌گفت مشاهده می‌شود، تلقیح جوجه‌ها با سالمونلای کشت‌شده با روغن‌های اسانس آویشن با غلظت تحت مهاری (گروه A) در همه روزهای نمونه‌گیری سبب کاهش فراوانی باکتری جداشده از کشت نمونه بافت‌های مختلف در مقایسه با گروه تلقیح‌شده با سالمونلای بدون مواجهه با اسانس (گروه B) شد. هرچند فقط در روز ۱۶ پس از عفونت تجربی آن هم در سواب‌های کلوآکی و سکوم این کاهش فراوانی به‌صورت معنی‌دار مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). چنانکه در این روز، در گروه‌های A و B، به‌ترتیب ۱ و ۷/۴ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم سالمونلا از سواب‌های کلوآکی و ۳/۲ و ۹/۲ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم سالمونلا از سکوم جدا شد که وجود تفاوت آماری معنی‌دار میان ۲ گروه، اثر مهاری قوی اسانس آویشن بر سالمونلای تلقیح‌شده به جوجه‌ها را نشان داد. همچنین میزان جداسازی سالمونلا در تمام نمونه‌ها با افزایش سن جوجه کاهش یافت و این کاهش فراوانی باکتری جداشده در کشت نمونه‌های کلوآک و سکوم به‌عنوان اثر متقابل با گروه‌های آزمایشی ازنظر آماری معنی‌دار بود، به‌طوری‌که به‌عنوان مثال از کشت سواب‌های کلوآکی در روز ۲۴ پس از عفونت تجربی، هیچ‌گونه باکتری جدا نشد ($P<۰/۰۵$). در این راستا، مقایسه اثرات ساده تغییرات فراوانی کلنی حاصل از کشت سواب‌های کلوآکی در روزهای مختلف نمونه‌گیری در هریک از گروه‌های A و B نیز نشان داد مواجهه باکتری با اسانس آویشن در گروه A سبب کاهش معنی‌دار میزان جداسازی سالمونلا با گذشت زمان در مقایسه با گروه B می‌شود ($P<۰/۰۵$).

بحث

خطرات ناشی از عوامل بیماری‌زای مشترک برای انسان و دام از یک‌سو و مقاومت روبه‌رشد باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های موجود از سوی دیگر موجب افزایش علاقه محققین به مطالعه اثرات ترکیبات ضدمیکروبی مختلف شده است (۲۰). از طرفی دیگر، باتوجه‌به افزایش آگاهی‌ها درمورد مضرات مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌های مولد غذا، تقاضا در مصرف‌کنندگان برای تهیه محصولات دامی که در تولید آن‌ها از هیچ‌گونه مواد شیمیایی همچون آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نشده باشد، افزایش یافته است. در این راستا، استفاده از ترکیبات طبیعی، همچون روغن‌های اسانس گیاهی که اثر مهارکنندگی و کاهش رشد باکتری‌ها را دارند، برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی دام و طیور مورد توجه قرار گرفته است (۶، ۲۱).

گیاه آویشن یا جنس *تیموس* دارای گونه‌ها و واریته‌های متعددی است که ازنظر مقدار و ترکیب مواد تشکیل‌دهنده اسانس تا حدی متفاوت می‌باشند (۳). در مطالعه حاضر میزان بازدهی اسانس‌گیری از گیاه آویشن ۱/۸ درصد و همانند مقدار گزارش‌شده در مطالعه Abedini و همکاران در سال ۲۰۱۴ به دست آمد (۹). این میزان در مقایسه با نتایج دیگر مطالعات مشابه که بازده استخراج اسانس آویشن را ۰/۷۳، ۰/۸۵، ۱/۲۵ و ۱/۲۷ درصد گزارش کرده بودند، بالاتر بود (۹، ۱۰). نشان داده شده است که ترکیبات اصلی روغن‌های اسانس گونه‌های مختلف آویشن تیمول و پی‌ـسایمن می‌باشند و ویژگی‌های ضدالتهابی قوی روغن‌های اسانس به مقدار ترکیبات فنولی آن‌ها بستگی دارد (۲۲، ۲۳). آنالیز ترکیبات اصلی تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانس آویشن در مطالعه حاضر نیز نشان داد تیمول، پی‌ـسایمن و گاما ـ ترپینن فراوان‌ترین ترکیبات در میان تعداد زیاد مواد مؤثره مختلف اسانس بودند که همسو با مطالعات Borugă و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Özcan و همکاران در سال ۲۰۰۴ بود (۱۰، ۲۳). بااین‌حال فراوانی این مواد در نمونه‌های مختلف به‌دلیل تنوع منبع جغرافیایی، شرایط رشد گیاه و همچنین روش استخراج اسانس متفاوت است که می‌تواند بر اثرات ضدمیکروبی روغن‌های اسانس تأثیرگذار باشد. ازاین‌رو گزارش‌ها از میزان تأثیر ضدمیکروبی روغن‌های اسانس آویشن ازطریق اندازه‌گیری میزان MIC برای یک جنس، به‌خصوص از باکتری‌های بیماری‌زا، نظیر سالمونلا نیز در مطالعات مختلف متفاوت است.

در مطالعه Nikolić و همکاران در سال ۲۰۱۴، تیمول با ۴۹/۱ و پی‌ـسایمن با ۲۰ درصد فراوان‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانس استخراج‌شده از آویشن بودند (۲۴). همچنین، Boskovic و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی ترکیبات روغن‌های اسانس آویشن و اثر مهاری بر رشد *سالمونلا انتریتیدیس*، تیمول با ۵۰/۴۸ درصد و پس از آن پی‌ـسایمن با ۲۴/۷۹ درصد را به‌عنوان مهم‌ترین اجزای تشکیل‌دهنده روغن‌های اسانس آویشن شناسایی کردند و MIC و MBC را برابر با ۳۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش نمودند (۲۵). میزان MIC و MBC روغن‌های اسانس آویشن در مطالعه حاضر، ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ارزیابی شد که بیانگر اثر ضدمیکروبی قابل‌توجه در اسانس موردبررسی است. یافته‌های مطالعه حاضر مشابه نتایج مطالعه Hoffman-Pennesi و همکاران در سال

۲۰۱۰ بود که MIC روغن‌های اسانس آویشن برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* را ۱/۸۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۶). اساس سازوکار ضدمیکروبی اصلی تیمول و دیگر ترکیبات فنولی، تخریب غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی است که به آزاد شدن لیپوپلی‌ساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی به ATP منجر می‌شود (۲۵).

اثرات روغن‌های اسانس بر حدت باکتری‌های مختلف، به‌ویژه باکتری‌هایی که در فساد مواد غذایی نقش دارند، در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. به‌عنوان مثال Azizkhani و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند روغن‌های اسانس آویشن شیرازی در کاهش تولید انتروتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌صورت وابسته به دُز مؤثر می‌باشند (۲۷). براساس مطالعات متعدد، تغییر بروز پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف ازجمله مواجهه با غلظت‌های غیرکشنده از ترکیبات ضدمیکروبی در باکتری‌ها مشاهده شده است. تصور بر آن است که باتوجه‌به نحوه عمل روغن‌های اسانس گیاهی در ایجاد اختلال در غشای سلولی که می‌تواند به مرگ سلول‌های باکتریایی منجر شود، باکتری‌های در معرض اسانس انرژی خود را از حرکت و تولید عوامل حدت که در میزان تهاجم باکتری مؤثر می‌باشند، به فرایندهای حیاتی‌تر برای بقا معطوف می‌کنند (۲۸). همچنین گزارش شده است که روغن‌های اسانس بر کوئوروم سنسینگ (Quorum sensing) باکتری‌ها که با ارتباط بین‌سلولی باکتری‌ها و هماهنگی میان آن‌ها مرتبط است نیز تأثیر می‌گذارند و از آن طریق نیز تولید عوامل حدت را کاهش می‌دهند (۲۹). علاوه‌بر تأثیرات ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها، اثر آن‌ها بر روی تنظیم سیستم ایمنی پرنده‌ها، بهبود وضعیت فلور میکروبی سیستم گوارشی و بهبود ضریب تبدیل در متون مختلف دیده می‌شود (۳۰). در یک مطالعه، مشخص شد جیره غذایی حاوی مکمل‌های آویشن، حتی باعث افزایش قابل‌توجه وزن تخم‌مرغ‌های بدست آمده از مرغ‌های تخم‌گذار می‌شود (۳۱).

مطالعات مختلفی اثرات استفاده از مقادیر مختلف روغن‌های اسانس آویشن در آب و یا جیره غذایی جوجه‌های گوشتی را بررسی کرده‌اند و برخی نتایج نشان‌دهنده اثرات مثبت در عملکرد رشد بوده است (۳۲، ۳۳). همچنین تأثیر تجویز مواد مؤثره روغن‌های اسانس ازجمله اوژنول، تیمول و سینامالدئید به جوجه‌های گوشتی در کاهش جمعیت *سالمونلا انتریتیدیس* در سکوم و کلوآک توسط Kollanoor-Johny و همکاران در سال ۲۰۱۲ گزارش شده است (۳۴)، اما پیش از این گزارشی از تأثیر روغن‌های اسانس با غلظت کم (تحت مهاری) بر میزان تهاجم *سالمونلا انتریتیدس* در اندام‌های احشایی جوجه‌های گوشتی منتشر نشده بود. سکوم، جایگاه اصلی کلونیزاسیون *سالمونلا انتریتیدیس* در جوجه‌های گوشتی است. ورود سالمونلا به داخل ماکروفاژها در پی تهاجم به سلول‌های مخاط روده و قدرت بقای باکتری داخل این سلول‌ها، زمینه انتشار عفونت در اندام‌های احشایی را فراهم می‌کند (۳۵). نتایج عفونت تجربی جوجه‌ها در مطالعه حاضر نشان‌دهنده کاهش میزان گسترش باکتری در اندام‌های احشایی، نظیر کبد و طحال به‌دلیل مواجهه باکتری با غلظت تحت مهاری روغن‌های اسانس در مقایسه با شاهد بود.

ازآنجاکه چسبیدن و تهاجم *سالمونلا انتریتیدس* به سلول‌های روده برای کلونیزاسیون در دستگاه گوارش و گسترش به اندام‌های احشایی، نظیر کبد و طحال ضروری است، کاهش میزان حدت باکتری درپی مواجهه قبلی با غلظت تحت مهاری روغن‌های اسانس به‌صورت بالقوه می‌تواند شدت عفونت‌های گوارشی و سیستمیک پرنده و درنتیجه بروز تلفات در جوجه‌های جوان و همچنین میزان آلودگی لاشه طیور به سالمونلا را کاهش دهد. همچنین کاهش جمعیت سویه *سالمونلا انتریتیدیس* جداشده از ماکیان در سکوم و کلوآک، تحت تأثیر غلظت تحت مهاری اسانس آویشن که به‌ویژه در روز ۱۶ پس از عفونت تجربی ازلحاظ آماری معنی‌دار و در حدود ۶ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی در گرم بود، بیانگر پتانسیل استفاده از اسانس آویشن در غلظت تحت مهاری و بسیار کم باهدف کاهش تهاجم *سالمونلا انتریتیدیس* و درنتیجه پیشگیری از عفونت سیستمیک شدید و همچنین کنترل دفع باکتری و انتشار آن در گله است.

نتیجه‌گیری نهایی: طیور و فراورده‌های آن‌ها نظیر گوشت و تخم‌مرغ به‌عنوان منابع اصلی انتقال *سالمونلا انتریتیدیس* به انسان و گسترش آن در محیط شناخته شده‌اند. سالمونلوز در جوجه‌های جوان به‌دلیل ایجاد تلفات بالا و کاهش رشد سبب خسارات اقتصادی در صنعت طیور و در انسان به‌عنوان شایع‌ترین نوع مسمومیت‌های غذایی ازنظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. روغن‌های اسانس آویشن به‌دلیل غنی بودن از ترکیبات فنولی، به‌ویژه تیمول و اثرات ضدمیکروبی آن‌ها جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد مواجهه *سالمونلا انتریتیدیس* با غلظت تحت مهاری اسانس آویشن به‌طور معنی‌داری میزان کلونیزاسیون باکتری در سکوم و تهاجم باکتری به اندام‌های احشایی، نظیر کبد و طحال جوجه‌های گوشتی را کاهش می‌دهد. ازاین‌رو روغن‌های اسانس آویشن

با غلظت تحت مهاری ممکن است در پیشگیری از وقوع عفونت سیستمیک در جوجه‌ها کمک‌کننده باشند و با کاهش دفع سالمونلا در کنترل انتشار آن در گله مؤثر عمل کنند.

سپاسگزاری

از پرسنل محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی و بخش بیماریهای پرندگان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای همکاری در اجرای طرح تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Aljuwayd M, Malli IA, Kwon YM. Application of eugenol in poultry to control *Salmonella colonization* and spread. Vet Sci. 2023;10(2):151. doi: 10.3390/vetsci10020151 PMID: 36851455

2. Castro-Vargas RE, Herrera-Sánchez MP, Rodríguez-Hernández R, Rondón-Barragán IS. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview. Vet World. 2020;13(10):2070. doi: 10.14202/vetworld.2020.2070-2084 PMID: 33281339

3. Mutlu-Ingok A, Devecioglu D, Dikmetas DN, Karbancioglu-Guler F, Capanoglu E. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review. Molecules. 2020;25(20):4711. doi: 10.3390/molecules25204711 PMID: 33066611

4. Olfati A, Hosseini SM. The effects of dietary supplementation of encapsulated thyme essential oil on growth, pro-inflammatory cytokines, and serum amino acid profiles of broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. Ann Anim Sci. 2022;22(1):189-200. doi: 10.2478/aoas-2021-0029

5. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. Pharmaceuticals. 2013;6(12):1451-1474. doi: 10.3390/ph6121451 PMID: 24287491

6. Frazzon APG, Correa MS, Lauer Júnior CM, Frazzon J. Modulation of gene expression by essential oils in bacteria. Adv Biotech Microbiol. 2018;8(2):1-3. doi: 10.19080/AIBM.2018.08.555731

7. Ju J, Xie Y, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(20):3281-3292. doi: 10.1080/10408398.2018.1488159 PMID: 29902072

8. Braschi G, Serrazanetti DI, Siroli L, Patrignani F, De Angelis M, Lanciotti R. Gene expression responses of *Listeria monocytogenes* scott A exposed to sub-lethal concentrations of natural antimicrobials. Int J Food Microbiol. 2018;286:170-178. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.026 PMID: 30172105

9. Gedikoğlu A, Sökmen M, Çivit A. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. Food Sci Nutr. 2019;7(5):1704-1714. doi: 10.1002/fsn3.1007 PMID: 31139383

10. Borugă O, Jianu C, Mişcă C, Goleţ I, Gruia AT, Horhat FG. *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. J Med Life. 2014;7(3):56-60. PMID: 25870697

11. Hamed EA, Abdelaty MF, Sorour HK, Elmasry D, Abdelmagid MA, Saleh MA, AbdelRahman MA. A pilot study on the effect of thyme microemulsion compared with antibiotic as treatment of *Salmonella enteritidis* in broiler. Vet Med Int. 2022;24:2022:3647523. doi: 10.1155/2022/3647523 PMID: 35251587

12. Gholipour-Shoshod A, Rahimi S, Salehi TZ, Torshizi MA, Behnamifar A, Ebrahimi T, et al. Evaluating the competitiveness of medicinal plants with antibiotics to control *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in broiler chickens. Iran J Vet Med. 2023;17(2):155-166. doi: 10.32598/ijvm.17.2.1005233

13. Escobar A, Perez M, Romanelli G, Blustein G. Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. Arab J Chem. 2020;13(12):9243-69. PMID: 10.1016/j.arabjc.2020.11.009

14. Bohez L, Ducatelle R, Pasmans F, Botteldoorn N, Haesebrouck F, Van Immerseel F. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. Vet Microbiol. 2006;116(1-3): 202-210. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.03.007 PMID: 16647227

15. Mahmoudi R, Ehsani A, Zare P. Phytochemical, antibacterial and antioxidant properties of *Cuminum cyminum* L. J Essent Oil Res. 2012;22(3):311-321. (In Persian).

16. Perez N, Altube MJ, Barbosa LRS, Romero EL, Perez AP. *Thymus vulgaris* essential oil+ tobramycin within nanostructured archaeolipid carriers: A new approach against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Phytomedicine. 2022;102:154179. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154179 PMID: 35671606

17. McLafferty FW, Stauffer DB, Loh SY. Comparative evaluations of mass spectral data bases. J Am Soc Mass Spectrom.1991;2(5):438-440. doi: 10.1016/1044-0305(91)85011-T PMID: 24242696

18. Pirš T, Avberšek J, Zdovc I, Krt B, Andlovic A, Lejko-Zupanc T, et al. Antimicrobial susceptibility of animal and human isolates of *Clostridium difficile* by broth microdilution. J Med Microbiol. 2013;62(9):1478-1485. doi: 10.1099/jmm.0.058875-0 PMID: 23861298

19. Sharifi A, Ahmadi A, Mohammadzadeh A. *Streptococcus pneumoniae* quorum sensing and biofilm formation are affected by *Thymus daenensis*, *Satureja hortensis*, and *Origanum vulgare* essential oils. Acta Microbiol Immunol Hung. 2018;65(3):345-359. doi: 10.1556/030.65.2018.013 PMID: 29471691

20. Parisi OI, Scrivano L, Sinicropi MS, Puoci F. Polymeric nanoparticle constructs as devices for antibacterial therapy. Curr Opin Pharmacol. 2017;36:72-77. doi: 10.1016/j.coph.2017.08.004 PMID: 28892800

21. Bonetti A, Tugnoli B, Rossi B, Giovagnoni G, Piva A, Grilli E. Nature-identical compounds and organic acids reduce *E. coli* K88 growth and virulence gene expression in vitro. Toxins. 2020;12(8):468. doi: 10.3390/toxins12080468 PMID: 32717891

22. Posgay M, Greff B, Kapcsándi V, Lakatos E. Effect of *Thymus vulgaris* L. essential oil and thymol on the microbiological properties of meat and meat products: A review. Heliyon. 2022;8(10):e10812. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10812 PMID: 36247140

23. Özcan M, Chalchat JC. Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. Bulgarian J Plant Physiol. 2004;30(3-4):68-73.

24. Nikolić M, Glamočlija J, Ferreira IC, Calhelha RC, Fernandes Â, Marković T, et al. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. Ind Crops Prod. 2014;52:183-190. doi: 10.1016/j.indcrop.2013.10.006

25. Boskovic M, Zdravkovic N, Ivanovic J, Janjic J, Djordjevic J, Starcevic M, et al. Antimicrobial activity of thyme (*Thymus vulgaris*) and oregano (*Origanum vulgare*) essential oils against some food-borne microorganisms. Procedia Food Sci. 2015;5:18-21. doi: 10.1016/j.profoo.2015.09.005

26. Hoffman-Pennesi D, Wu C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. J Appl Poult Res. 2010;19(4):432-443. doi: 10.3382/japr.2009-00141

27. Azizkhani M, Misaghi A, Basti AA, Gandomi H, Hosseini H. Effects of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E in *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Int J Food Microbiol. 2013;163(2-3):159-165. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.020 PMID: 23558199

28. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. Medicines. 2017;4(3):58. doi: 10.3390/medicines4030058 PMID: 28930272

29. Sharchi R, Shayegh J, Hosseinzadeh S. Anti-quorum sensing and antibacterial activities of *Satureja sahendica* hydroalcoholic extract against avian isolate of *Salmonella typhimurium*. Iran J Vet Sci Technol. 2020;12(1):71-9. doi: 10.22067/veterinary.v12i1.85433

30. Gholami-Ahangaran M, Ahmadi-Dastgerdi A, Azizi S, Basiratpour A, Zokaei M, Derakhshan M. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. Vet Med Sci. 2022;8(1):267-288. doi: 10.1002/vms3.663 PMID: 34761555

31. Cimrin, T. Thyme (*Thymbra spicata* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and vitamin E supplementation of laying hens. S Afr J Anim Sci. 2019;49(5):912-919. doi: 10.4314/sajas.v49i5.15

32. Kalantar M, Hosseini SM, Yang L, Raza SH, Gui L, Rezaie M, et al. Performance, immune, and carcass characteristics of broiler chickens as affected by thyme and licorice or enzyme supplemented diets. Open J Anim Sci. 2017;7(02):105. doi: 10.4236/ojas.2017.72009

33. Feizi A, Bijanzad P. Evaluating the effects of *Thymus vulgaris* extract on growth performance parameters in broiler chicken. Large Anim Clin Res. 2010;4(12):39-45. (In Persian).

34. Kollanoor-Johny A, Upadhyay A, Baskaran SA, Upadhyaya I, Mooyottu S, Mishra N, et al. Effect of therapeutic supplementation of the plant compounds trans-cinnamaldehyde and eugenol on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization in market-age broiler chickens. J Appl Poult Res. 2012;21(4):816-822. doi: 10.3382/japr.2012-00540

35. Stern NJ. *Salmonella* species and *Campylobacter jejuni* cecal colonization model in broilers. Poult Sci. 2008;87(11):2399-2403. doi: 10.3382/ps.2008-00140 PMID: 18931193