



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 Pirmahalle¹✉, Mohammad Hassanzadeh²✉, Sara Mirzaie³✉, Ramak Yahyaraeyat⁴✉, Jamshid Razmyar²✉

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

doi: [10.22059/jvr.2023.362598.3368](https://doi.org/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](https://doi.org/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 ($P < 0.05$).



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 پیرمحلہ^۱، محمد حسن‌زاده^۲، سارا میرزائی^۳، رامک یحیی‌رعیت^۴، جمشید رزم‌یار^۲

^۱ دانش‌آموخته 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 ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

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

doi: [10.22059/jvr.2023.362598.3368](https://doi.org/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. از این‌رو، 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.

روش کار: حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) روغن‌های اسانس آویشن علیه سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از روش میکرو دایلووشن برآورد 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 ۱۰^۸ 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 کلواکی و نمونه‌های اندام‌های احشایی از پرنده‌های کشتار شده جمع‌آوری و از نظر 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 کلواک، 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 کلواک 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

سرروارهای متحرک سالمونلا یا سالمونلاهای پاراتیفوئید از جمله سالمونلا/انتریتیدیس، باکتری‌هایی غیروابسته به میزبان می‌باشند که علاوه بر بیماری‌زایی در حیوانات اهلی و وحشی، در ایجاد مسمومیت غذایی در انسان نقش دارند. عفونت ناشی از سالمونلا در پرندگان به صورت افقی و عمودی قابل انتقال 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 از طریق 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 در زمینه جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (۲). روغن‌های اسانس منابع بالقوه ترکیبات ضد میکروبی 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 قابل استخراج 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). به‌طور کلی اثرات ضد میکروبی روغن‌های اسانس گیاهی از طریق سازوکارهای مختلفی، از جمله 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 ضد میکروبی، توسعه مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر ضد روغن‌های اسانس گیاهی را غیرمحمول 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، از جمله ایران است. به‌طور کلی 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 در مورد اثرات زیستی روغن‌های اسانس آویشن صورت گرفته است و با وجود تنوع در نسبت ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس، فعالیت ضد میکروبی 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 تیپ‌موریوم 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 ضد میکروبی روغن‌های اسانس از گیاهان مختلف شامل پونه کوهی (ارگانو)، آویشن و دارچین بر ضد سرروارهای سالمونلا/انتریکا و سویه‌های لیستریا مونوسیتوزنز نشان داده شد سالمونلا/انتریتیدیس نسبت به اثرات مهارتی روغن‌های اسانس حساسیت زیادی دارد (۱۳).

باتوجه به اهمیت سالمونلا/انتریتیدیس به‌عنوان یک عامل بیماری‌زای مشترک در صنعت طیور و نیز مسئله بهداشت عمومی، مطالعه اثرات ضد میکروبی 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 در مورد باکتری‌های بیماری‌زای طیور انجام نشده است. باتوجه به مطالب پیش‌گفت، مطالعه حاضر باهدف ارزیابی اثر روغن‌های اسانس آویشن بر کلونیزاسیون و تهاجم سالمونلا/انتریتیدیس مواجه‌شده با اسانس در غلظت تحت‌مهارتی در جوجه‌های گوشتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش کار

تهیه سویه باکتریایی و اسانس آویشن: سویه باکتریایی مورد استفاده در مطالعه حاضر، سالمونلا انتریکا سرووار انتریتیدیس NIDO 76Sa88 Nalr، فاژتایپ ۴ بود (۱۴). ابتدا گیاه آویشن تهیه شد. اسانس گیری از بخش های هوایی گیاه که ابتدا در سایه خشک و سپس پودر شده بود، به روش تقطیر و با استفاده از کلونجر، مطابق با روش گزارش شده توسط Mahmoudi و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد (۱۵). برای تحلیل ترکیبات تشکیل دهنده اسانس از روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی (GC/MS) (Gas chromatography-mass spectrometry) استفاده شد. برای این منظور، نمونه با هگزان رقیق شد و از ستون به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر از نوع BPX5 استفاده شد. شناسایی طیف ها به کمک شاخص بازداری آن ها و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف های جرمی ترکیبات استاندارد و نرم افزار 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 میکرودیولوشن برات (Microdilution Broth) با ۳ بار تکرار انجام شد (۱۸). به این ترتیب که به هر کدام از گوده های پلیت ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت تریپتیک سوی برات (TSB) (مرک، آلمان) حاوی ۵ درصد حجمی / حجمی دی متیل سولفو کساید (DMSO) به عنوان امولسیفایر اضافه شد. سپس به اولین گوده هر ردیف ۲۰۰ میکرولیتر (۱۰۰۰۰ قسمت در میلیون) اسانس آویشن اضافه شد تا رقت های سریالی مختلف در گوده های یک ردیف پلیت ایجاد شود. غلظت سوسپانسیون باکتری برابر با ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times$ ۱/۵ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر) بود. گوده های حاوی محیط کشت و دی متیل سولفو کساید، بدون اسانس و دارای باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. در ادامه محتویات گوده ها با قرار دادن پلیت ها روی شیکر اوربیتال یکنواخت شد و سپس در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. بعد از اتمام گرم خانه گذاری کدورت یا عدم کدورت گوده ها به صورت چشمی و همچنین جذب نوری توسط دستگاه قرائت میکروپلیت در ساعت صفر و پس از گذشت ۲۴ ساعت در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد. گوده حاوی کمترین غلظت از اسانس که در آن کدورتی قابل مشاهده نبود به عنوان MIC در نظر گرفته شد. به منظور ارزیابی حداقل غلظت کشندگی (MBC)، از گوده های فاقد کدورت ظاهری (غلظت های 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 گرم خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غلظتی که در آن باکتری رشد نکرده بود به عنوان MBC تعیین شد (۱۹).

عفونت تجربی در جوجه های 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 یک روزه نژاد راس ۳۰۸ از یک مرکز جوجه کشی تجاری تهیه شد. بلافاصله پس از ورود، از ۵ قطعه از جوجه ها به صورت تصادفی سواب کلواکی تهیه و کشت شد تا از منفی بودن جوجه ها از نظر آلودگی به سالمونلا اطمینان حاصل شود. جوجه ها به روش توزیع تصادفی ساده به ۳ گروه ۲۵ تایی (۵ تکرار و ۵ پرند در هر تکرار) با نام های A و B و C تقسیم شدند. در سن ۹ روزگی به جوجه های گروه A، ۱۰^۸ واحد تشکیل دهنده کلنی سالمونلا انتریتیدیس در حجم ۰/۲ میلی لیتر بافر فسفات سالین که در معرض اسانس با غلظت ۵۰ درصد MIC قرار گرفته بود با استفاده از لوله داخل چینه دان تلقیح شد. به پرندگان گروه B نیز همین میزان باکتری، اما از کشت بدون اسانس تلقیح شد. جوجه های گروه C به عنوان شاهد، تنها بافر با همان حجم دریافت کردند. در روزهای ۹، ۱۶ و ۲۴ پس از عفونت تجربی، سواب کلواکی برای جداسازی سالمونلا گرفته شد. همچنین، ۵ جوجه از هر گروه در روزهای ذکر شده کشتار شد و نمونه های سکوم، کبد و طحال برای آزمایش های باکتری شناسی بررسی شدند. سواب های کلواکی اخذ شده ابتدا در نرمال سالین قرار داده شدند و سپس ۱۰ میکرولیتر از ترکیب حاصله روی محیط کشت آگار زایلوز لیزین دئوکسی کلات (XLD) (مرک، آلمان) کشت داده شدند. کشت باکتریایی به میزان ۱۰ میکرولیتر از اندام های سکوم، کبد و طحال هموزن شده و رقت های ۱۰ برابر در نرمال سالین بر روی محیط XLD انجام شد. پس از ۱ شب گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد، تعداد باکتری به صورت لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم تعیین و گزارش شد (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۷ انجام شد. داده های توصیفی به صورت میانگین شمارش کلنی سالمونلا انتریتیدیس از اندام های داخلی و سواب کلواکی (لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در هر گرم) بیان شدند. برای تجزیه و تحلیل روند تغییرات داده ها در گروه های آزمایشی در روزهای ۹، ۱۶ و ۲۴ از تحلیل داده های تکراری (Repeated Measures) استفاده شد. اثرات معنی داری در سطح $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ترکیب شیمیایی روغن‌های اسانس آویشن شناسایی شده به وسیله GC/MS.

ردیف	اجزا	زمان احتیاس (دقیقه)	شاخص کوواتس* (KI)	درصد	ردیف	اجزا	زمان احتیاس (دقیقه)	شاخص کوواتس* (KI)	درصد
۱	۲- اتیل هگزانول	۸/۰۹	۸۵۵	۰/۰۷	۲۱	سیس پی-منت ۲-ان-۱-ال	۲۱/۵۸	۱۱۲۲	۰/۰۷
۲	تری سیکلن	۱۰/۸۹	۹۲۶	۰/۰۷	۲۲	کامفور	۲۲/۸۷	۱۱۴۶	۰/۵۶
۳	آلفا-توجن	۱۱/۰۵	۹۳۰	۱/۴۸	۲۳	بورنول	۲۴/۰۹	۱۱۶۹	۲/۰۳
۴	آلفا-پینن	۱۱/۴۴	۹۳۹	۱/۱۸	۲۴	تریپن-۴ال	۲۴/۴۳	۱۱۷۷	۰/۸
۵	کامفن	۱۲/۳۲	۹۵۴	۱/۰۵	۲۵	پی-سایمن-۸ال	۲۴/۹۲	۱۱۸۲	۰/۱۱
۶	سابینن	۱۳/۵۱	۹۷۵	۰/۰۴	۲۶	آلفا-تریپنول	۲۵/۲۲	۱۱۸۸	۰/۲۷
۷	بتا-پینن	۱۳/۷۷	۹۷۹	۰/۳	۲۷	تیمول، متیل اتر	۲۶/۶۹	۱۲۳۵	۰/۴۷
۸	۱-اوکتن-۳-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-اوکتانول	۱۴/۹۳	۹۹۱	۰/۱۴	۳۰	ال-آلفا-جورنیل استات	۲۹/۲۷	۱۲۸۵	۰/۳۳
۱۱	آلفا-فلاندرن	۱۵/۳	۱۰۰۲	۰/۲۳	۳۱	تیمول	۲۹/۹۴	۱۲۹۰	۳۷/۶۱
۱۲	آلفا-تریپنن	۱۵/۸۳	۱۰۱۷	۱/۴۵	۳۲	کارواکرول	۳۰/۲۵	۱۲۹۹	۳/۴
۱۳	پی-سایمن	۱۶/۳۶	۱۰۲۴	۲۷/۴۷	۳۳	تیمول استات	۳۲/۰۶	۱۳۵۲	۰/۰۸
۱۴	لیمونن	۱۶/۵	۱۰۲۹	۰/۵	۳۴	ای-کاریوفیلن	۳۵/۱۶	۱۴۱۹	۰/۹۷
۱۵	۱ و ۸-سیننول	۱۶/۶۸	۱۰۳۱	۰/۹۳	۳۵	گامل-مورولن	۳۷/۵	۱۴۷۹	۰/۰۵
۱۶	گامل-تریپنن	۱۸/۰۴	۱۰۵۹	۱۰/۰۴	۳۶	جرماکردن دی	۳۷/۷۹	۱۴۸۱	۰/۰۶
۱۷	سیس-سایمن هیدرات	۱۸/۷۶	۱۰۷۰	۰/۵۷	۳۷	گامل-کادینن	۳۹/۱۳	۱۵۱۳	۰/۰۶
۱۸	تریپنولن	۱۹/۴	۱۰۸۸	۰/۰۸	۳۸	دلتا-کادینن	۳۹/۲۷	۱۵۲۳	۰/۱۱
۱۹	پی-سایمن	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 تشکیل دهنده کلنی در هر گرم).

نمونه گیری (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	۳/۳ ^b	۰/۴	.
	B	۷/۴ ^a	۹/۳ ^a	۰/۸	۰/۴
۲۴	A	.	۱/۴	۰/۲	.
	B	.	.	۰/۴	۰/۲

گروه A: تلقیح شده با سالمونلای کشت شده در حضور روغن‌های اسانس آویشن. گروه B: تلقیح شده با سالمونلای کشت شده بدون حضور روغن‌های اسانس آویشن. [†] گروه C یا شاهد بدون عفونت تجربی. از آنجا که 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 تشکیل دهنده روغن‌های اسانس آویشن به روش GC/MS نشان دهنده حضور ۴۰ ماده مختلف بود که در جدول ۱ ارائه شده است. این ترکیبات شناسایی شده در مجموع 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)، پی-سایمن (۲۷/۴۷ درصد) و گاما - تریپنن (۱۰/۰۴ درصد) فراوان‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده 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 مورد بررسی نظیر سکوم، طحال، کبد و همچنین کشت سواب‌های کلواکی 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 تحت‌مهراری (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 کلواکی و سکوم این کاهش فراوانی به‌صورت معنی‌دار مشاهده شد ($P < 0.05$). چنانکه در این روز، در گروه‌های A و B، به ترتیب ۱ و ۷/۴ لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی بر گرم سالمونلا از سواب‌های کلواکی 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 مهراری 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 کلواک و سکوم به‌عنوان اثر متقابل با گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار بود، به‌طوری‌که به‌عنوان مثال از کشت سواب‌های کلواکی در روز ۲۴ پس از عفونت تجربی، هیچ‌گونه باکتری جدا نشد ($P < 0.05$). در این راستا، مقایسه اثرات ساده تغییرات فراوانی کلنی حاصل از کشت سواب‌های کلواکی در روزهای مختلف نمونه‌گیری در هر یک 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 ($P < 0.05$).

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 ضد میکروبی مختلف شده است (۲۰). از طرفی دیگر، با توجه به افزایش آگاهی‌ها در مورد 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 از نظر 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 پی‌سایمن 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، پی‌سایمن و گاما - تربینن فراوان‌ترین ترکیبات در میان تعداد زیاد مواد مؤثره مختلف اسانس بودند که همسو با مطالعات Borugã و همکاران در سال ۲۰۱۴ و Özcan و همکاران در سال ۲۰۰۴ بود (۱۰، ۲۳). با این حال فراوانی این مواد در نمونه‌های مختلف به دلیل تنوع منبع جغرافیایی، شرایط رشد گیاه و همچنین روش استخراج اسانس متفاوت است که می‌تواند بر اثرات ضد میکروبی روغن‌های اسانس تأثیرگذار باشد. از این رو گزارش‌ها از میزان تأثیر ضد میکروبی روغن‌های اسانس آویشن از طریق 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 پی‌سایمن 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 مهراری بر رشد سالمونلا/انتریتیدیس، تیمول با ۵۰/۴۸ درصد و پس از آن پی‌سایمن 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 ضد میکروبی قابل توجه در اسانس مورد بررسی است. یافته‌های مطالعه حاضر مشابه نتایج مطالعه Hoffman-Pennesi و همکاران در سال

۲۰۱۰ بود که MIC روغن‌های اسانس آویشن برای *سالمونلا تیفی‌موریوم* را $1/83$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۶). اساس سازوکار ضد میکروبی 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 انترتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌صورت وابسته به دُز مؤثر می‌باشند (۲۷). براساس مطالعات متعدد، تغییر بروز پاسخ به تنش‌های محیطی مختلف از جمله مواجهه با غلظت‌های غیرکشنده از ترکیبات ضد میکروبی در باکتری‌ها مشاهده شده است. تصور بر آن است که با توجه به 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 بین سلولی باکتری‌ها و هماهنگی میان آن‌ها مرتبط است نیز تأثیر می‌گذارند و از آن طریق نیز تولید عوامل حدت را کاهش می‌دهند (۲۹). علاوه بر تأثیرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد التهابی 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 قابل توجه 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 از جمله اوژنول، تیمول و سینامالدئید به جوجه‌های گوشتی در کاهش جمعیت *سالمونلا انتریتیدیس* در سکوم و کلواک 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 انتریتیدیس* 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 به دلیل مواجهه باکتری با غلظت تحت مهاری روغن‌های اسانس در مقایسه با شاهد بود.

از آنجاکه چسبیدن و تهاجم *سالمونلا انتریتیدیس* به سلول‌های روده برای کلونیزاسیون در دستگاه گوارش و گسترش به اندام‌های احشایی، نظیر کبد و طحال ضروری است، کاهش میزان حدت باکتری در پی مواجهه قبلی با غلظت تحت مهاری روغن‌های اسانس به‌صورت بالقوه می‌تواند شدت عفونت‌های گوارشی و سیستمیک پرنده و در نتیجه بروز تلفات در جوجه‌های جوان و همچنین میزان آلودگی لاشه طیور به *سالمونلا* را کاهش دهد. همچنین کاهش جمعیت سویه *سالمونلا انتریتیدیس* جدا شده از ماکیان در سکوم و کلواک، تحت تأثیر غلظت تحت مهاری اسانس آویشن که به‌ویژه در روز ۱۶ پس از عفونت تجربی از لحاظ 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 در نتیجه 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 به دلیل ایجاد تلفات بالا و کاهش رشد سبب خسارات اقتصادی در صنعت طیور و در انسان به‌عنوان شایع‌ترین نوع مسمومیت‌های غذایی از نظر بهداشت عمومی حائز اهمیت است. روغن‌های اسانس آویشن به دلیل غنی بودن از ترکیبات فنولی، به‌ویژه تیمول و اثرات ضد میکروبی 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. از این رو 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 میکروبی‌شناسی 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. Boruğã O, Jianu C, Mișcă C, Goleț 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](https://doi.org/10.1002/vms3.663) PMID: [34761555](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/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](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00140) PMID: [18931193](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18931193/)