Vol 26, No. 4, Winter 2025

University of Tehran Press

Journal of Animal Production

Online ISSN: 2382-994X

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

Effects of thyme and cinnamon essential oils on fecal shedding of *Escherichia coli O157:H7* in Holstein feedlot calves fed with high concentrated diets

Behzad Khorrami[1]✉ | **Seyed Alireza Vakili**[2]

1. Corresponding Author, Department of Animal and Poultry Science, Faculty of Agricultural Technology (Aburaihan), University of Tehran, Pakdasht, Iran. E-mail: bkhorrami@ut.ac.ir
2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. E-mail: sarvakili@um.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 3 November 2024
Received in revised form
29 December 2024
Accepted 30 December 2024
Published online 2 February 2025

Keywords:
Escherichia coli
Essential oil
Feedlot calves
Medicinal plants

ABSTRACT

Objective: Cattle are the major reservoirs of the pathogenic bacteria *Escherichia coli O157:H7*, and approximately 30% of feedlot cattle shed *E. coli O157:H7*. Feedlot calves are fed high concentrate diets in order to increase feed efficiency. It has been reported that populations of *E. coli O157:H7* were higher in grain-fed than in forage-fed cattle, and when cattle were abruptly switched from a high concentrate diet to an all-forage diet, total *E. coli* populations declined 1000-fold. Therefore, strategies that decrease *E. coli O157:H7* prior to slaughter will reduce human exposures to this virulent pathogen. However, a dietary switch to forage in feedlot calves is not advocated due to feasibility, weight loss and other logistical issues, other feedstuffs rich in phenolics such as essential oils (EO) could be a more feasible alternative strategy to reduce *E. coli O157:H7* populations. Data available indicate a strong bactericidal activity of EO against pathogenic bacteria such as *E. coli O157:H7*. Among the EO, thyme (THY) and cinnamon (CIN) oil have attracted considerable attention in several literatures due to their potential antibacterial activity against ruminal microbes. The aim of the present research was to evaluate the effects of THY and CIN on *E. coli O157:H7* population in the rumen and feces of feedlot calves fed high-concentrate diets.

Method: Twenty-four growing Holstein calves (214±16 kg initial BW) were used in a completely randomized design and received their respective dietary treatments for 45 d. Treatments were: 1-control (no additive), 2-THY (5 g/d/calf), 3-CIN (5 g/d/calf) and 4- forage (sudden switch from grain diet to forage diet in the last ten days of experiment; as positive control for relative abundance of *E. coli O157:H7* in the rumen and feces). Calves were fed *ad libitum* diets consisting of 15% forage and 85% concentrate. Ruminal and fecal samples were collected from calves at the end of the experiment. Quantitative detection of *E. coli O157:H7* in samples were done using specific primers and real-time PCR method.

Results: The average dry matter intake (DMI) and daily weight gain (ADG) of feedlot calves from day 36 to day 70 of the experiment was not affected by the experimental treatments. However, DMI and ADG decreased, and feed conversion ratio increased in calves fed forage treatment from day 71 to 80 ($P<0.05$). Supplementation of THY or CIN decreased the relative abundances of *E. coli* strain *O157:H7 (rbfE)* in rumen contents ($P<0.05$), while they did not affect strain *O157:H7 (iudA)*. But forage treatment decreased the population of both strains of *E. coli O157:H7* in the rumen fluid of feedlot calves compared to the control treatment ($P<0.05$). The experimental treatments also reduced the relative abundances of both strains of *E. coli O157:H7* in the rumen and feces of feedlot calves compared to the control treatment ($P<0.05$).

Conclusion: The results showed that the use of thyme and cinnamon essential oil in feedlot calves diet can be a more suitable way compared to nutritional methods such as abruptly switched from a high grain diet to an all-forage diet to reduce the population of pathogenic bacteria *Escherichia coli O157:H7* in the rumen and reduction of its shedding in feces.

Cite this article: Khorrami, B., & Vakili, S. A. (2025). Effects of thyme and cinnamon essential oils on fecal shedding of *Escherichia coli O157:H7* in Holstein feedlot calves fed with high concentrated diets. *Journal of Animal Production*, 26 (4), 435-445. DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.384717.623811

© The Author(s).
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.384717.623811

دوره بیست و ششم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۳

انتشارات دانشگاه تهران

تولیدات دامی

شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۲-۹۹۴x

Homepage: https://jap.ut.ac.ir/

اثرات اسانس آویشن و دارچین بر دفع باکتری اشرشیاکلی O157:H7 در گوساله‌های پرواری هلشتاین تغذیه‌شده با مقادیر بالای مواد متراکم

بهزاد خرمی[۱] ✉ | سید علیرضا وکیلی[۲]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم دام و طیور، دانشکده فناوری کشاورزی (ابوریحان)، دانشگاه تهران، پاکدشت، ایران. رایانامه: bkhorrami@ut.ac.ir
۲. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: sarvakili@um.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۰
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴

کلیدواژه‌ها:
اسانس
اشرشیاکلی
گوساله پرواری
گیاهان دارویی

چکیده

هدف: گاوها از مخازن اصلی باکتری بیماری‌زای اشرشیاکلی *O157:H7* به‌شمار می‌روند و تقریباً ۳۰ درصد از گاوهای پرواری اشرشیاکلی *O157:H7* را در مدفوع دفع می‌کنند. گوساله‌های پرواری به‌منظور افزایش بازده خوراک با جیره‌های با مقادیر بالای مواد متراکم تغذیه می‌شوند. گزارش شده است که جمعیت اشرشیاکلی *O157:H7* در گاوهای تغذیه‌شده با غلات بیش‌تر از گاوهای تغذیه‌شده با علوفه می‌باشد، و زمانی‌که گاوها به‌طور ناگهانی از جیره با مواد متراکم بالا به جیره تمام علوفه‌ای انتقال یافتند، جمعیت اشرشیاکلی کل تا ۱۰۰۰ برابر کاهش یافت. بنابراین، راه‌کارهایی که باعث کاهش اشرشیاکلی *O157:H7* قبل از کشتار می‌شود، قرار گرفتن انسان را در معرض این عامل بیماری‌زای خطرناک کاهش می‌دهند. با این‌حال، تغییر جیره غذایی به علوفه در گوساله‌های پرواری به‌دلیل عدم امکان‌پذیری، اتلاف وزن و دیگر مسائل مرتبط توصیه نمی‌شود، سایر مواد خوراکی غنی از ترکیبات فنلی مانند اسانس‌های گیاهی می‌تواند راه‌کار جایگزین مناسب و امکان‌پذیرتری در کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* باشد. داده‌های موجود حاکی از فعالیت قوی باکتری‌کشی اسانس‌های گیاهی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشرشیاکلی *O157:H7* است. در میان اسانس‌های گیاهی، اسانس آویشن و دارچین به‌دلیل فعالیت ضد باکتریایی بالقوه خود در برابر میکروب‌های شکمبه، در منابع بیش‌تر موردتوجه قرار گرفته‌اند. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات اسانس آویشن و دارچین بر جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در شکمبه و مدفوع گوساله‌های پرواری تغذیه‌شده با جیره‌های با مواد متراکم بالا بود.

روش پژوهش: بیست و چهار رأس گوساله نر هلشتاین (میانگین وزن اولیه ۱۶±۲۱۴ کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی مورداستفاده قرار گرفتند و به‌مدت ۴۵ روز تیمارهای آزمایشی شامل ۱- شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، ۲- آویشن (جیره پایه+ پنج گرم اسانس آویشن در روز برای هر رأس گوساله)، ۳- دارچین (جیره پایه+ پنج گرم اسانس دارچین در روز برای هر رأس گوساله) و ۴- علوفه (تغییر ناگهانی جیره از مواد متراکم به جیره کاملاً علوفه‌ای در ده روز پایانی آزمایش؛ به‌عنوان کنترل مثبت برای فراوانی نسبی باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در شکمبه و مدفوع) را دریافت نمودند. گوساله‌ها با جیره‌های حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد کنسانتره تا حد اشتها تغذیه شدند. نمونه‌های محتویات شکمبه و مدفوع از گوساله‌ها در پایان آزمایش جمع‌آوری شد. تشخیص کمی اشرشیاکلی *O157:H7* در نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی انجام شد.

یافته‌ها: میانگین مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه گوساله‌های پرواری از روز ۳۶ تا ۷۰ آزمایش تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. درحالی‌که در گوساله‌های مصرف‌کننده تیمار علوفه از روز ۷۱ تا ۸۰ میانگین مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه کاهش، و ضریب تبدیل غذایی افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزودن اسانس آویشن و دارچین موجب کاهش جمعیت سویه *اشرشیاکلی O157:H7 (rbfE)* محتویات شکمبه شد (P<۰/۰۵)، درحالی‌که سویه *اشرشیاکلی O157:H7 (iudA)* را تحت تأثیر قرار نداد. اما تیمار علوفه جمعیت هر دو سویه اشرشیاکلی *O157:H7* را در شکمبه نسبت به تیمار شاهد کاهش داد (P<۰/۰۵). هم‌چنین، تیمارهای آزمایشی جمعیت هر دو سویه اشرشیاکلی *O157:H7* را در شکمبه و مدفوع گوساله‌های پرواری نسبت به تیمار شاهد کاهش دادند (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که استفاده از اسانس آویشن و دارچین در جیره گوساله‌های پرواری می‌تواند روش مناسب‌تری در مقایسه با راه‌کارهای تغذیه‌ای از قبیل تغییر ناگهانی جیره از جیره با مواد متراکم بالا به جیره علوفه‌ای برای کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا از قبیل باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در شکمبه و کاهش دفع آن در مدفوع باشد.

استناد: خرمی، بهزاد و وکیلی، سید علیرضا (۱۴۰۳). اثرات اسانس آویشن و دارچین بر دفع باکتری اشرشیاکلی O157:H7 در گوساله‌های پرواری هلشتاین تغذیه‌شده با مقادیر بالای مواد متراکم. *نشریه تولیدات دامی*، ۲۶ (۴)، ۴۳۵- ۴۴۵.
DOI: https://doi.org/10.22059/jap.2024.384717.623811

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* از مهم‌ترین سویه‌های بیماری‌زای بومی شکمبه دام‌های نشخوارکننده به‌شمار می‌رود که به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده مسمومیت‌های غذایی و بیماری‌هایی نظیر اسهال، کولیت، سندرم همولیتیک اورمیک و حتی مرگ در انسان شناخته شده است (Majowicz *et al.*, 2014). جمعیت این باکتری در مدفوع گاوهای پرواری که برای کسب حداکثر بازدهی و افزایش وزن سریع‌تر با مقادیر بالای غلات تغذیه می‌شوند، افزایش می‌یابد و می‌تواند از 10^2 تا 10^7 سلول در گرم مدفوع برسد (Tkalcic *et al.*, 2000; Stein *et al.*, 2017). تغذیه گاوهای پرواری با جیره‌های غنی از کربوهیدرات‌های با تخمیرپذیری سریع موجب افزایش غلظت اسیدهای چرب فرّار تولیدی در شکمبه و به‌دنبال آن کاهش pH در دامنه ۵ تا ۶/۵ می‌گردد. در این شرایط اسیدهای چرب فرّار می‌توانند وارد سیتوزول باکتری‌ها شده و آن را اسیدی نمایند. بدین ترتیب سازوکارهای مقاومت به اسید در این باکتری‌ها فعال می‌شود و افزایش جمعیت اشرشیاکلی *O157:H7* مقاوم به اسید در شکمبه موجب افزایش ورود آن به روده و تشکیل جمعیت ثانویه‌ای از آن‌ها در قسمت‌های پایین‌تر دستگاه گوارش می‌شود. در نتیجه افزایش دفع، این باکتری می‌تواند منشأ اصلی آلودگی گوشت و خوراک‌های گوشتی باشد (Callaway *et al.*, 2008). این مقاومت به شرایط اسیدی موجب افزایش مقاومت به اسید معده انسان نیز می‌شود و این نوع باکتری‌ها در صورت خورده شدن می‌توانند شوک اسیدی معده را نیز تحمل کنند و باعث مسمومیت‌های غذایی شوند. بیش‌ترین موارد بیماری به‌علت مصرف گوشت قرمز گاو و یا دیگر محصولات گوشتی با پخت ناکافی می‌باشد. هم‌چنین، این باکتری بیماری‌زا می‌تواند در مزرعه به‌واسطه تماس مستقیم کارگرها و بازدیدکننده‌ها منتقل شود (Callaway *et al.*, 2008).

بنابراین، پژوهش‌گران و تولیدکنندگان بر توسعه روش‌هایی تمرکز کرده‌اند که از ورود این عامل بیماری‌زا به زنجیره غذایی جلوگیری نمایند. یک روش پیشنهادی جهت کاهش این باکتری در گاوهای پرواری، تغییر ناگهانی جیره از جیره بر پایه غلات به جیره بر پایه علوفه می‌باشد (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998). برای کاهش آلودگی ناشی از باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* می‌توان در انتهای دوره پرواربندی، دام‌ها را با خوراک‌های علوفه‌ای تغذیه کرد، زیرا مخاط دستگاه گوارش محل اصلی تکثیر اشرشیاکلی *O157:H7* است و با افزایش میزان مصرف فیبر، مخاط در مواد دفعی فیبری به دام می‌افتد و به شکل فیزیکی حذف می‌گردد (Low *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2007). از افزودنی‌های با خواص ضدمیکروبی مانند اسانس‌های گیاهی نیز می‌توان برای کاهش جمعیت اشرشیاکلی *O157:H7* استفاده کرد (Chao *et al.*, 2000). فعالیت‌های ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان داده شده است که به تعدادی از ترکیبات فنولیک و ترپنوئید و هم‌چنین، اجزای شیمیایی و گروه‌های ساختاری، نسبت‌های موجود در آن‌ها و اثرات متقابل بین آن‌ها مربوط می‌شود (Puvača *et al.*, 2021).

در این میان، اسانس آویشن و دارچین در مقابل تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی مانند *اشرشیاکلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی‌ماریوم* و *کامپیلوباکتر ژژونی* اثرات ضد باکتریایی از خود نشان داده‌اند (Burt *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2005). آن دسته از اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آن‌ها (یعنی تیمول، سینمالدئید، اسانس آویشن و دارچین) که بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی را در مقابل باکتری‌های شکمبه نشان می‌دهند، معمولاً بیش‌ترین توانایی را در مقابل عوامل بیماری‌زا نیز دارند (Oussalah *et al.*, 2007). براساس گزارش‌های پیشین، اسانس آویشن، دارچین و پونه کوهی جمعیت باکتری *اشرشیاکلی O157:H7* را در شرایط برون‌تنی کاهش دادند (Burt & Reinders, 2003; Senhaji *et al.*, 2007). به‌طور کلی آزمایش‌های اندکی در رابطه با استفاده از اسانس‌های گیاهی در مقابل عوامل بیماری‌زا به‌ویژه باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در شرایط درون‌تنی انجام شده است. بنابراین، در این پژوهش امکان کنترل جمعیت و کاهش دفع این باکتری به‌عنوان یکی از

مهم‌ترین عوامل آلودگی گوشت و محصولات گوشتی با استفاده از اسانس آویشن و دارچین در گوساله‌های پرواری تغذیه‌شده با مقادیر بالای مواد متراکم موردبررسی قرار گرفت.

۲. روش پژوهش

در پژوهش حاضر، اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) و دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) از شرکت اکسیر گل سرخ (مشهد، خراسان رضوی، ایران) خریداری شد. با توجه به این‌که ترکیبات فعال اسانس‌های گیاهی تحت تأثیر گونه گیاه، محل برداشت، مرحله رشدی گیاه و عوامل متعدد دیگر بسیار متفاوت می‌باشند، اسانس‌های مورداستفاده براساس ترکیب فعال عمده اندازه‌گیری‌شده توسط شرکت (برای اسانس آویشن ۴۸ درصد تیمول و اسانس دارچین ۷۰ درصد سینمالدئید) تهیه شدند. این آزمایش در واحد گاوداری مزرعه آموزشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. در این آزمایش از ۲۴ رأس گوساله نر پرواری هلشتاین با میانگین وزنی ۱۶±۲۱۴ کیلوگرم در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. گوساله‌ها با جیره‌های حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد کنسانتره تا حد اشتها تغذیه شدند. طول دوره آزمایش ۸۰ روز بود که ۳۵ روز به‌منظور عادت‌پذیری و ۴۵ روز برای دوره اصلی آزمایش در نظر گرفته شد. در طی دوره عادت‌پذیری، گوساله‌ها با استفاده از جیره‌های انتقالی (هر کدام به‌مدت یک هفته) به‌صورت تدریجی به جیره پایانی آزمایش عادت داده شدند. جیره‌های انتقالی حاوی مقادیر افزایشی کنسانتره ۴۵، ۵۵، ۶۵، ۷۵ و ۸۵ درصد از جیره مخلوط براساس درصد ماده خشک بودند. تراکم مواد مغذی جیره پایه بر مبنای جداول استاندارد احتیاجات غذایی برای گاوهای گوشتی NRC (۲۰۱۶) تنظیم شد. اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیب شیمیایی جیره پایه در جدول (۱) نشان داده شده است.

جدول ۱. اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره پایه گوساله‌های پرواری هلشتاین

فراسنجه	درصد
اجزای جیره (درصد)	
یونجه خشک	۱۵
دانه ذرت آسیاب‌شده	۳۴
دانه جو آسیاب‌شده	۳۴
کنجاله تخم پنبه	۱۱
کنجاله سویا	۵
کربنات کلسیم	۰/۵
مکمل ویتامینه- معدنی*	۰/۲
نمک	۰/۳
ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک)	
ماده خشک	۹۳/۱
پروتئین خام	۱۵/۵
چربی خام	۲/۸
خاکستر	۶/۴
فیبر نامحلول در شوینده خنثی	۲۱/۵
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی	۱۲/۳

* حاوی ۲۰ گرم در کیلوگرم منیزیم، ۵۰ گرم در کیلوگرم پتاسیم، ۳۰ گرم در کیلوگرم روی، ۲۰ گرم در کیلوگرم منگنز، ۳۰ گرم در کیلوگرم آهن، ۳ گرم در کیلوگرم مس، ۰/۰۱ گرم در کیلوگرم سلنیوم، ۰/۱ گرم در کیلوگرم کبالت، ۰/۱ گرم در کیلوگرم ید، ۵۰۰ واحد در گرم ویتامین A، ۱۰۰ واحد در گرم ویتامین D و ۱ واحد در گرم ویتامین E.

تیمارهای آزمایشی شامل ۱- شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)، ۲- آویشن (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله)، ۳- دارچین (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله) و ۴- علوفه (کنترل مثبت؛ تغییر ناگهانی جیره پایه به ۱۰۰ در درصد علوفه خشک یونجه در ۱۰ روز پایانی آزمایش)

بودند. در طول دوره آزمایش، جیره‌ها دو بار در روز در ساعت ۸ صبح و ۱۶ بعد از ظهر در اختیار گوساله‌ها قرار گرفتند. اسانس آویشن و دارچین با بخشی از کنسانتره مخلوط شده و روزانه یک بار به‌عنوان بخشی از کل جیره مخلوط بلافاصله قبل از تغذیه در اختیار گوساله‌ها قرار می‌گرفت تا اطمینان حاصل شود که به‌صورت کامل به‌وسیله گوساله‌ها مصرف شده است. گوساله‌ها در تمام مدت آزمایش در جایگاه‌های انفرادی نگهداری شده و به‌طور آزاد به آب و سنگ نمک دسترسی داشتند. باقیمانده خوراک گوساله‌های هر گروه آزمایشی هر روز صبح جمع‌آوری و توزین شد و میزان مصرف روزانه خوراک اندازه‌گیری شد. وزن‌کشی گوساله‌ها در شروع، روز ۳۵ و پایان آزمایش انجام شد. برای این منظور، ۱۴ تا ۱۶ ساعت قبل از وزن کشی (۴ بعدازظهر تا ۸ صبح روز بعد) گوساله‌ها از خوراک محروم شده (اما به آب دسترسی داشتند) و سپس توزین و میانگین افزایش وزن روزانه محاسبه شد.

در روز پایانی آزمایش، برای تعیین جمعیت باکتری اشرشیاکلی، از کل محتویات شکمبه (بخش مایع و جامد) به میزان ۵۰ گرم نمونه از طریق کانال گوارشی (مری) و با استفاده از پمپ خلأ قبل از خوراک‌دهی در صبح برداشته و درون ظروف مخصوص نمونه‌گیری ریخته شد. نمونه‌های مدفوع با استفاده از دستکش‌های پلاستیکی بلند استریل از طریق رکتوم جمع‌آوری گردید. حدود ۲۵ گرم مدفوع در کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار داده شد و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان اندازه‌گیری نگهداری شد. جهت اندازه‌گیری ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و عناصر معدنی جیره پایه از روش‌های توصیه‌شده استاندارد آزمایشگاهی AOAC (۲۰۰۵) استفاده شد. فیبر نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری فیبر (1010 Heat Extractor, Tecator, Sweden) و براساس روش Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شدند.

با استفاده از روش Real-Time PCR جمعیت کل باکتری‌ها و دو سویه اشرشیاکلی *O157:H7* در شکمبه و مدفوع گوساله‌ها بررسی شد. استخراج DNA از محتویات شکمبه و مدفوع با استفاده از پروتکل ارائه‌شده در کیت استخراج بایونیر (AccuPrepTM, Bioneer Corporation, Daejeon, South Korea) انجام شد. پس از اطمینان از عملکرد صحیح پرایمرها و غلظت مناسب DNA استخراج‌شده از نمونه‌ها و به‌دنبال بهینه‌نمودن شرایط PCR، شمارش و تعیین تعداد باکتری‌های موردنظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و به‌وسیله دستگاه Real-time PCR (ABI 7300; Applied Biosystems; Waltham, MA, USA) انجام شد. تغییر در جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* محتویات شکمبه و مدفوع گوساله‌های مصرف‌کننده تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گوساله‌های مصرف‌کننده جیره شاهد با استفاده از روش نسبی محاسبه شد. پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه در جدول (۲) گزارش شده است. داده‌های آزمایش با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) در قالب طرح کاملاً تصادفی (رابطه ۱) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش Lsmeans در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

$$Y_{ijk}= \mu+T_i+\varepsilon_{ij}$$ رابطه ۱)

که در آن، Y_{ijk}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر تیمار؛ و ε_{ij}، خطای آزمایشی است.

جدول ۲. طول قطعه و توالی پرایمرهای مورداستفاده در آزمایش Real-Time PCR

میکروارگانیسم	ژن	طول قطعه	پرایمر	توالی
کل باکتری‌ها	–	۱۲۰	توالی رفت	5’GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA-3’
			توالی برگشت	5’-ACGTCRTCCMCACCTTCCTC-3’
اشرشیاکلی *O157:H7*	uidA	۱۳۵	توالی رفت	5-ATGGAATTTCGCCGATTTTGC-3
			توالی برگشت	5- ATTGTTTGCCTCCCTGCTGC-3
اشرشیاکلی *O157:H7*	rfbE	۱۶۷	توالی رفت	5-GTAAATATGTGGGAACATTTGG -3
			توالی برگشت	5-GGCCTTTAAAATGTAAACAACGG -3

۳. یافته‌های پژوهش

اثر تیمارهای آزمایشی بر ماده خشک مصرفی و افزایش وزن روزانه گوساله‌های پرواری در جدول (۳) ارائه شده است. میانگین مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه گوساله‌های پرواری از روز ۳۶ تا ۷۰ دوره اصلی آزمایش تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. درحالی‌که در گوساله‌های مصرف‌کننده تیمار علوفه از روز ۷۱ تا ۸۰ آزمایش، میانگین مصرف ماده خشک و افزایش وزن روزانه نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی کاهش یافت (P<۰/۰۵).

جدول ۳. اثر اسانس آویشن و دارچین بر مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه گوساله‌های پرواری هلشتاین

صفت موردمطالعه	تیمارهای آزمایشی*				خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	شاهد	آویشن	دارچین	علوفه		
روز ۳۶ تا ۷۰						
ماده خشک مصرفی روزانه (کیلوگرم)	۷/۷۴	۷/۶۸	۷/۵۹	۷/۷۲	۰/۳۰۸	۰/۳۵
میانگین افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)	۱/۱۹	۱/۲۸	۱/۲۴	۱/۲۱	۰/۰۴۸	۰/۲۸
ضریب تبدیل غذایی	۶/۴۸	۶/۰۱	۶/۱۱	۶/۴۰	۰/۱۲۴	۰/۰۷
روز ۷۱ تا ۸۰						
ماده خشک مصرفی روزانه (کیلوگرم)	۸/۰۴^{a}	۸/۰۹^{a}	۷/۹۵^{a}	۷/۱۳^{b}	۰/۱۲۹	۰/۰۳
میانگین افزایش وزن روزانه (کیلوگرم)	۱/۲۳^{a}	۱/۳۴^{a}	۱/۲۸^{a}	۰/۹۴^{b}	۰/۰۵۲	۰/۰۱
ضریب تبدیل غذایی	۶/۵۴^{b}	۶/۰۲^{b}	۵/۹۱^{b}	۷/۵۷^{a}	۰/۱۵۳	۰/۰۱

* تیمارهای آزمایشی: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)؛ آویشن (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ دارچین (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ علوفه (کنترل مثبت؛ تغییر ناگهانی جیره پایه به صد در درصد علوفه در ده روز پایانی آزمایش).
اعداد با حروف غیر مشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

اثر تیمارهای آزمایشی بر فراوانی نسبی جمعیت دو سویه بیماری‌زا و مقاوم به اسید باکتری اشرشیاکلی سویه *O157:H7* در محتویات شکمبه و مدفوع گوساله‌های پرواری در جدول (۴) گزارش شده است.

جدول ٤. اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت باکتری اشرشیاکلی O157:H7 در محتویات شکمبه و مدفوع گوساله‌های پرواری هلشتاین

جمعیت باکتری اشرشیاکلی	تیمارهای آزمایشی*				خطای معیار میانگین‌ها	معنی‌داری
	شاهد	آویشن	دارچین	علوفه		
محتویات شکمبه						
اشرشیاکلی O157:H7 (iudA)	۱/۰۰^{a}	۰/۷۹^{ab}	۰/۸۴^{ab}	۰/۳۶^{b}	۰/۱۶۰	۰/۰۵
اشرشیاکلی O157:H7 (rbfE)	۱/۰۰^{a}	۰/۱۲^{b}	۰/۲۳^{b}	۰/۳۷^{b}	۰/۱۱۳	۰/۰۳
مدفوع						
اشرشیاکلی O157:H7 (iudA)	۱/۰۰^{a}	۰/۰۹^{c}	۰/۱۶^{b}	۰/۰۷^{c}	۰/۰۳۱	<۰/۰۱
اشرشیاکلی O157:H7 (rbfE)	۱/۰۰^{a}	۰/۰۴^{c}	۰/۱۱^{b}	۰/۰۳^{c}	۰/۰۱۲	<۰/۰۱

* تیمارهای آزمایشی: شاهد (جیره پایه بدون افزودنی)؛ آویشن (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس آویشن در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ دارچین (جیره پایه به‌علاوه پنج گرم اسانس دارچین در روز به‌ازای هر رأس گوساله)؛ علوفه (کنترل مثبت؛ تغییر ناگهانی جیره پایه به صد در درصد علوفه در ده روز پایانی آزمایش).
اعداد با حروف غیر مشابه در هر ردیف اختلافشان در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار است.

استفاده از اسانس آویشن یا دارچین موجب کاهش جمعیت سویه اشرشیاکلی O157:H7 (rbfE) محتویات شکمبه شد (P<۰/۰۵)، در حالی سویه اشرشیاکلی O157:H7 (iudA) را تحت تأثیر قرار ندادند، تیمار علوفه جمعیت هر دو سویه

اشرشیاکلی را در محتویات شکمبه نسبت به تیمار شاهد کاهش داد (P<۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی تعداد هر دو سویه باکتری اشرشیاکلی را در مدفوع گوساله‌های پرواری کاهش دادند (P<۰/۰۵).

۴. بحث

اطلاعات اندکی در رابطه با اثر اسانس‌های گیاهی آویشن و دارچین بر عملکرد گاوهای پرواری وجود دارد. با توجه به این‌که در روز ۳۶ تا ۷۰ دوره اصلی آزمایش مصرف ماده خشک تحت تأثیر افزودن اسانس به جیره قرار نگرفت، عدم تغییر در میانگین افزایش وزن روزانه گوساله‌ها قابل انتظار بود. در پژوهشی مشابه، استفاده از اسانس آویشن تا سطح ۸ میلی‌لیتر در روز به‌ازای هر رأس گاو پرواری نژاد نلور ماده خشک مصرفی را تحت تأثیر قرار نداد (Castro Filho *et al.*, 2021). به همین ترتیب، افزودن سینمالدئید (۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک) به جیره بره‌های پرواری تأثیر معنی‌داری بر ماده خشک مصرفی نداشت (Chaves *et al.*, 2008). گزارش شده است. افزودن مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری به جیره بره‌های پرواری میانگین افزایش وزن روزانه را افزایش داد، هرچند میزان مصرف خوراک تحت تأثیر قرار نگرفت (رحمتی‌زاده و همکاران، ۱۴۰۱). با این وجود، نتایج یک مطالعه فراتحلیلی بر روی ۳۰ آزمایش نشان داد که افزودن اسانس‌های گیاهی به جیره می‌تواند میزان مصرف خوراک و میانگین افزایش وزن روزانه را در گاوهای پرواری افزایش دهد (Orzuna-Orzuna *et al.*, 2022). اثر اسانس‌های گیاهی بر عملکرد گوساله‌های پرواری با توجه به نوع اسانس، دز مورداستفاده، نوع جیره مصرفی، سطح تولید و شرایط فیزیولوژی حیوان بسیار متغیر است (Calsamiglia *et al.*, 2007).

از روز ۷۱ تا ۸۰ آزمایش، میزان مصرف ماده خشک در تیمار حاوی علوفه کاهش یافت. با کاهش مصرف ماده خشک، کاهش در میانگین افزایش وزن روزانه و به‌دنبال آن افزایش ضریب تبدیل غذایی قابل پیش‌بینی بود. تغییر جیره گاوهای پرواری از دانه بالا به علوفه در پنج روز آخر دوره پروار می‌تواند موجب وزن از دست‌رفته تا یک کیلوگرم به‌ازای هر رأس گردد. چنین اتلاف وزنی اثرات منفی بر عملکرد رشد گاوهای پرواری و خصوصیات لاشه خواهد داشت (Stanton & Schutz, 2000). افزایش سطح علوفه در جیره گوساله‌های جوان می‌تواند موجب کاهش ماده خشک مصرفی و افزایش پرشدگی شکمبه شود، بنابراین، با توجه به ظرفیت محدود شکمبه در گوساله‌های پرواری جوان، افزایش وزن روزانه نیز روند کاهشی خواهد داشت (Aragona *et al.*, 2021). از این‌رو، تغییر ناگهانی جیره از مواد متراکم به علوفه در گوساله‌های پرواری با وجود داشتن تأثیرات مثبت در کاهش دفع باکتری‌های بیماری‌زا مانند اشرشیاکلی *O157:H7*، می‌تواند اثر منفی شدید بر افزایش وزن روزانه دام‌ها داشته باشد.

تغییرات ناگهانی در جیره گاوها می‌تواند به‌عنوان یک روش ترجیحی در تغییر شیوع اشرشیاکلی *O157:H7* مدنظر قرار گیرد. یک روش پیشنهادی جهت کاهش این نوع باکتری‌ها می‌تواند تغییر ناگهانی جیره با مواد متراکم بالا به جیره بر پایه علوفه باشد (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998). از این روش در مطالعه حاضر به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد و تغییر ناگهانی جیره از مواد متراکم بالا (۸۵ درصد) به جیره حاوی علوفه (۱۰۰ درصد یونجه خشک) به‌مدت ۱۰ روز موجب کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در مقایسه با تیمار شاهد گردید. این فرضیه از اینجا منشأ می‌گیرد که مشاهدات مربوط به حیواناتی که جیره علوفه‌ای مصرف کردند تعداد بسیار کم‌تری از اشرشیاکلی و اشرشیاکلی مقاوم به اسید را در مدفوع خود نسبت به حیواناتی که جیره‌های با مواد متراکم بالا دریافت نمودند نشان دادند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تغذیه گاوها با علوفه به‌جای دانه خطر ابتلا به بیماری حاصل از باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* را کاهش می‌دهد (Callaway *et al.*, 2008). مطالعات بسیار زیادی نشان داده‌اند که گاوهایی که یک جیره علوفه‌ای دریافت می‌کردند

نسبت به گاوهایی که جیره حاوی ذرت دریافت می‌کردند تعداد باکتری‌های کلی‌فرم کل و اشرشیاکلی کم‌تری قبل از کشتار داشتند. ترکیبات فیبری علوفه ممکن است موجب تخریب دیواره گوارشی شوند و به‌صورت فیزیکی این باکتری را حذف کنند و موجب کاهش تشکیل کلنی و دفع آن گردند (Diez-Gonzalez *et al.*, 1998).

مطالعاتی که اثرات علوفه را بر زنده‌مانی باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در مدفوع موردارزیابی قرار داده‌اند دریافتند که علوفه‌ها با کیفیت پایین موجب مرگ سریع‌تر جمعیت‌های اشرشیاکلی *O157:H7* می‌شوند که نشان‌دهنده نقش احتمالی ترکیبات شیمیایی یا ثانویه علوفه (مانند تانن‌ها و ...) در دفع از طریق مدفوع می‌باشد (Franz *et al.*, 2005). در مجموع، نتایج به دست آمده از این مطالعات تأکید بر دستکاری جیره گاوها از دانه بالا به علوفه بالا قبل از کشتار دارند که می‌تواند یک روش قدرتمند در کاهش جمعیت‌های اشرشیاکلی انتروهموراژیک در گاوها باشد. اما، سازوکار آن تاکنون ناشناخته و اثرات آن متناقض است. درحالی‌که تغییر جیره به سمت علوفه در سامانه‌های پرواری به‌دلیل عدم امکان‌پذیری، اتلاف وزن و دیگر مسائل مرتبط توصیه نمی‌شود، استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌تواند راه‌کار جایگزین مناسب و امکان‌پذیرتری در کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* باشد (Callaway *et al.*, 2008). بنابراین، استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌عنوان بهبود دهنده‌های تخمیر شکمبه (Calsamiglia *et al.*, 2007; Benchaar *et al.*, 2021) و کاهش‌دهنده باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در حیوان زنده پیشنهاد شده‌اند (Jacob *et al.*, 2009).

سازوکار اصلی اسانس‌های گیاهی در شکمبه مربوط به اثرات ضدمیکروبی ترکیبات فعال آن‌هاست. ترکیبات اصلی اسانس آویشن تیمول و کارواکرول و اسانس دارچین سینمالدئید و یوگنول می‌باشد (Calsamiglia *et al.*, 2007). سازوکار عمل اسانس دارچین به‌طور دقیق مشخص نیست، اما سازوکار عمل سینمالدئید احتمالاً مربوط به اثرات متقابل آن با پروتئین‌ها در پری‌پلاسم یا بخش‌های درونی‌تر سلول باشد (Helander *et al.*, 1998). سازوکار عمل و تأثیر اسانس‌های گیاهی وابسته به ساختمان شیمیایی و نوع گروه عاملی آن‌ها می‌باشد (Cieslak *et al.*, 2013). فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن مربوط به ساختار فنولیک ترکیب فعال آن یعنی تیمول مربوط می‌شود. ترکیبات ثانویه گیاهی با ساختار فنولیک، به‌عنوان عوامل ضدمیکروبی در مقایسه با ترکیبات غیرفنولیک به خاطر وجود یک گروه هیدروکسیل مؤثرتر هستند. ساختار فنولیک می‌تواند منجر به تخریب غشای سلولی، غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها و کمبود سوبستراهایی گردد که برای سوخت‌وساز سلول ضروری هستند (Calsamiglia *et al.*, 2007). اثرات ضدمیکروبی قوی‌تر اسانس آویشن در مقابل باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در مقایسه با اسانس دارچین در پژوهش حاضر هم احتمالاً به‌دلیل وجود ترکیبات فنولیک آن می‌باشد.

در یک مطالعه، Burt & Reinders (۲۰۰۳) خواص ضد باکتریایی اسانس پونه کوهی و آویشن را در شرایط برون‌تنی بر باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* بررسی نمودند و نشان دادند که این ترکیبات موجب کاهش تعداد این باکتری شدند. هم‌چنین، سایر پژوهش‌گران اثر ضدباکتریایی اسانس دارچین را در مقابل باکتری اشرشیاکلی سروتیپ *O157:H7* گزارش کرده‌اند (Senhaji *et al.*, 2007). اسانس‌های گیاهی کارواکرول، یوگنول و تیمول تعداد باکتری اشرشیاکلی مدفوع گاوها را کاهش دادند (Varel & Miller, 2004). سایر پژوهش‌گران فعالیت ضدمیکروبی اسانس آویشن و دارچین را در مقابل باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* نشان داده‌اند (Valero & Salmer, 2003; Moreira *et al.*, 2005). در پژوهشی دیگر، استفاده از تیمول دفع باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* را تا ۵۰ درصد در گاوهای پرواری، کاهش داد (Wells *et al.*, 2006). آزمایش‌های محدودی در رابطه با استفاده از اسانس‌های گیاهی در مقابل باکتری اشرشیاکلی بیماری‌زا در شرایط درون‌تنی در نشخوارکنندگان وجود دارد. به‌دلیل بیماری‌زابودن این سویه از باکتری، روش‌هایی که بر کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در غذاهای حیوانی قبل از ورود به زنجیره غذایی تمرکز کرده‌اند، پتانسیل کاهش

بیماری‌های انسانی را دارا می باشند (Callaway *et al*., 2008). در راستای این پژوهش‌ها نتایج مشابهی به هنگام استفاده از اسانس آویشن و دارچین در پژوهش حاضر حاصل شد که به موجب آن تعداد باکتری اشرشیاکلی *O157:H7* در مدفوع گوساله‌های موردآزمایش نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. با این وجود، اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در مقابل عوامل بیماری‌زا در مدفوع ناشناخته است.

۵. نتیجه‌گیری

براساس نتایج پژوهش حاضر، استفاده از اسانس‌های گیاهی آویشن و دارچین در جیره گوساله‌های پرواری می‌تواند روش مناسب‌تری در مقایسه با راه‌کارهای تغذیه‌ای مانند تغییر ناگهانی جیره برای کاهش جمعیت باکتری بیماری‌زای *اشرشیاکلی O157:H7* در شکمبه و کاهش دفع آن باشد. مکمل‌سازی اسانس‌های گیاهی در جیره می‌تواند روشی مناسب برای کاهش آلودگی‌های گوشت و فرآورده‌های آن باشد که هم موجب کاهش نگرانی‌های ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها بر سلامت مصرف‌کنندگان گردد و هم روشی نسبتاً کم‌هزینه و عملی برای کنترل همه‌گیری‌های ناشی از مسمویت غذایی با گوشت و فرآورده‌های گوشتی را در جامعه ایجاد نماید. هرچند پژوهش‌ها در این زمینه بسیار محدود می‌باشد و مطالعات بیش‌تری بر روی حیوان نیاز است تا به‌طور کامل این امر اثبات گردد.

۶. ملاحظات اخلاقی

نویسندگان اصول اخلاقی را در انجام و انتشار این پژوهش علمی رعایت نموده‌اند و این موضوع مورد تأیید همه آن‌هاست.

۷. مشارکت نویسندگان

بهزاد خرمی: مدیریت پروژه و انجام آزمایش، جمع‌آوری داده‌ها و انجام محاسبات، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، تحلیل و تفسیر اطلاعات و نتایج، تهیه پیش‌نویس اصلی مقاله؛
سید علیرضا وکیلی: مشارکت در طراحی آزمایش، بررسی و کنترل نتایج، ویرایش و بازبینی مقاله.

۸. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۹. حامی مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

۱۰. منابع

رحمتی‌زاده، م.، هژبری، ف.، و کفیل‌زاده، ف. (۱۴۰۱). تأثیر افزودن مخلوطی از اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و رزماری به جیره بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و متابولیت‌های خون بره‌های پرواری. *علوم دامی ایران*، ۵۳ (۴)، ۲۸۵-۲۷۳.

References

AOAC. (2005). Association of official analytical chemist official methods of analysis, AOAC, Washington, DC. 14th Ed.

Aragona, K. M., Dennis, T. S., Suarez-Mena, F. X., Quigley, J. D., Hu, W., Hill, T. M., & Schlotterbeck, R. L. (2021). Effect of increasing the amount of hay fed on Holstein calf performance and digestibility from 2 to 4 months of age. *Journal of Dairy Science*, 104(2), 1620-1629. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19487.

Benchaar, C. (2021). Diet supplementation with thyme oil and its main component thymol failed to favorably alter rumen fermentation, improve nutrient utilization, or enhance milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 324-336. https://doi.org/10.3168/jds.2020-18401.

Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibcaterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli O157:H7*. *Letters in Applied Microbiology*, 36, 162-167. https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01285.x.

Callaway, T. R., Edrington, T. S., Brabban, A. D., & Anderson, R. C. (2008). Bacteriophage isolated from feedlot cattle can reduce *Escherichia coli O157:H7* populations in ruminant gastrointestinal tracts. *Foodborne Pathogens and Disease*, 5, 183-192. https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0057.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P., Castillejos, L., & Ferret, F. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580-2595. https://doi.org/10.3168/jds.2006-644.

Castro Filho, E. S., Júnior, L. C. R., Ezequiel, J. M. B., Salles, M. S. V., Almeida, M. T. C., Perez, H. L., & van Cleef, E. H. C. B. (2021). Effect of thyme essential oil supplementation on feed intake, apparent digestibility, rumen fermentation, blood parameters and *in vitro* methane yield of Nellore cattle. *Livestock Science*, 244, 104349. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104349.

Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 639-649. https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177.

Chaves, A.V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Science*, 117, 215-224. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.12.013.

Diez-Gonzalez, F., Callaway, T. R., Kizoulis, M. G., & Russell, J. B. (1998). Grain feeding and the dissemination of acid-resistant *Escherichia coli* from cattle. *Science*, 281, 1666-1668. https://doi: 10.1126/science.281.5383.16.

Franz, E., van Diepeningen, A. D., de Vos, O. J., & van Bruggen, A. H. C. (2005). Effects of cattle feeding regimen and soil management type on the fate of *Escherichia coli O157:H7* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* in manure, manure-amended soil, and lettuce. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6165-6174. https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6165-6174.2005.

Jacob, M. E., Callaway, T. R., & Nagaraja, T. G. (2009). Dietary interactions and interventions affecting *Escherichia coli O157* colonization and shedding in cattle. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 785-792. https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6165-6174.2005.

Lim, J.Y., Li, J., Sheng, H., Besser, T. E., Potter, K., & Hovde, C. J. (2007). *Escherichia coli O157:H7* colonization at the rectoanal junction of long-duration culture-positive cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1380-1382. https://doi.org/10.1128/AEM.02242-06.

Low, J. C., McKendrick, I. J., McKechnie, C., Fenlon, D. R., Naylor, S. W, Currie, C., Smith, D. G. E, Allison, L., & Gally, D. L. (2005). Rectal carriage of enterohemorrhagic *Escherichia coli O157* in slaughtered cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 93-97. https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.93-97.2005.

Majowicz S. E., Scallan E., & Jones-Bitton A., Sargeant, J. M., Stapleton, J., Angulo, F. J., Yeung, D. H., & Kril, M. D. (2014). Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: a systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(6), 447-455. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1704.

Moreira, M. R., Ponce, A. G., Del Valle, C. E., & Roura, S. I. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*, 38, 565-70. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012.

NRC. 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 8th ed. National Academies Press.

Orzuna-Orzuna, G. F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Miranda-Romero, L. A., Mendoza-Martínez, G. D., & Santiago-Figueroa, I. (2022). Meta-Analysis of Essential Oils Use for Beef Cattle Feed: Rumen Fermentation, Blood Metabolites, Meat Quality, Performance and, Environmental and Economic Impact. *Fermentation*, 8, 254. https://doi.org/10.3390/fermentation8060254.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli O157:H7*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. Food Control, 18, 414-420.

Puvača, N., Milenković, J., Coghill, T. G., Bursić, V., Petrović, A., Tanasković, S., Pelić, M., Pelić, D. L., & Miljković, T. (2021). Antimicrobial Activity of Selected Essential Oils against Selected Pathogenic Bacteria: *In Vitro* Study. *Antibiotics*, 10, 546. https://doi.org/10.3390/antibiotics10050546.

Rahmatizadeh, M., Hozhabri, F., & Kafilzadeh, F. (2023). The effect of adding a mixture of peppermint, thyme and rosemary essential oils to diet on growth performance, rumen fermentation parameters and blood metabolites of fattening lambs. *Iranian Journal of Animal Science*, 53(4), 273-285. (In persian). 10.22059/ijas.2022.340407.653879.

SAS Institute. (2004). SAS®/STAT Software, Release 9.4. SAS Institute, Inc., Cary, NC. USA.

Senhaji, O., Faid, M & Kalalou, I. (2007). Inactivation of *Escherichia coli O157:H7* by Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum*. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 11(2), 234-236. https://doi.org/10.1590/S1413-86702007000200013.

Stanton, T. L., & Schutz, D. (2000). Effect of switching from high grain to hay five days prior to slaughter on finishing cattle performance. In, Colorado State University Annual Report, Ft. Collins, CO.

Stein, R. A., & Katz, D. E. (2017). *Escherichia coli*, cattle and the propagation of disease. *FEMS Microbiology Letters*, 364 (6), fnx050. https://doi.org/10.1093/femsle/fnx050.

Tkalcic, S., Brown, C. A., Harmon, B. G., Jain, A. V., Mueller, E. P. O., Parks, A., Jacobsen, K. L., Martin, S. A., Zhao, T., & Doyle, M. P. (2000). Effects of diet on rumen proliferation and fecal shedding of *Escherichia coli O157:H7* in calves. *Journal of Food Protection*, 63, 1630-1636. https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.12.1630.

Valero, M., & Salmer, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 73-81. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00484-1.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

Varel, V. H., & Miller, D. N. (2004). Eugenol stimulates lactate accumulation yet inhibits volatile fatty acid production and eliminates coliform bacteria in cattle and swine waste. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1001-1005. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02386.x.

Wells, J. E., Berry, E. D., & Varel, V. H. (2006). Effects of essential oils on viability of *Escherichia coli O157:H7* in treated beef cattle manure slurries and on prevalence from treated feedlot surfaces. *Journal of Animal Science*, 84 (Suppl. 1), 356-357. https://doi.org/10.1111/jam.12689.