Research article: 1422”

Antibacterial and antibiofilm effects of Shirazi thyme (*Zataria multifora*) essential oil on Salmonella isolates from poultry and humans using the Minimum Inhibitory Concentration method

Zeynali, Z.[1], Shayegh, J.[2], Tofangdarzadeh, Sh.[3]*

1- D.V.M. Graduate, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran.
2- Associate Professor, Department of Veterinary, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran.
3- Assistant Professor, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Shabestar, Iran.
*Corresponding author's email: shahin.tofangdar@gmail.com
(Received: 2023/8/29 Accepted: 2023/12/22)

Abstract

Plant essential oils are complex compounds of different chemical components with different amounts. These substances are one of the potential sources of antibacterial compounds and are very effective and useful for this purpose. The aim of this study was to investigate the antibacterial effect of *Zataria multiflora* essential oil on Salmonella isolated from poultry and humans using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method. Steam distillation was used to extract the essential oil, and then the composition of the essential oil was determined using the Gas Chromatography-Mass Spectroscopy (Gc-Ms) method. Broth microdilution method was used to determine the MIC of *Zataria multiflora* essential oil. Also, ELISA was used to investigate the anti-biofilm effect of *Zataria multiflora* essential oil. Based on the results obtained in the present study, it was shown that more than 64.9% of essential oil consists of three substances: thymol, caracol, and linanol which make up46.62%, 13.85%, and 8.95% of the essential oil repectively. It was found that the MIC level For *Zataria multiflora* essential oil was in the range of 0.39-12.5 mg/ml in Salmonella isolates. Also, based on the results obtained in this study, the minimum bactericidal concentration (MBC) of applied essential oil in Salmonella isolates was in the range of 1.56-12.5 mg/ml. The placement of Salmonella bacteria isolates alongside essential oil at a possible level of 1% significantly (p<0.001) decreased biofilm production. Overall, the results of this research showed that Shirazi thyme essential oil has significant antibacterial effects and reduced biofilm production of Salmonella bacteria isolates by a significant percentage.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Biofilm, Medicinal plants, Minimum Inhibitory Concentration Method, Salmonella *Zataria multiflora.*

"مقاله پژوهشی: ۱۴۲۲"

اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر سالمونلاهای جداشده از طیور و انسان به روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد

زینال زینالی[۱]، جلال شایق[۲]، شاهین تفنگدارزاده[۳*]

۱-دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۲-دانشیار گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده علوم پایه، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:shahin.tofangdar@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۶/۷ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۱۰/۱)

چکیده

اسانس‌های گیاهی، ترکیبات پیچیده‌ای از اجزای مختلف شیمیایی با مقادیر گوناگون می‌باشند. این مواد یکی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضدباکتریایی هستند و برای این منظور بسیار موثر و مفید می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی بر سالمونلاهای جداشده از طیور و انسان به‌روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) بود. بدین منظور، برای استخراج اسانس از روش تقطیر با بخار آب استفاده شد، سپس با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-طیف جرمی (Gas chromatography-Mass Spectroscopy; Gc-Ms) ترکیب اسانس مشخص گردید. برای تعیین MIC اسانس آویشن شیرازی از روش براث میکرودایلوشن و برای بررسی اثر ضد بیوفیلمی اسانس آویشن شیرازی، از تکنیک الایزا استفاده گردید. طبق نتایج، بیش از ۶۴/۹ درصد اسانس از سه ماده تیمول، کاراکول و لینانول به ترتیب با ۴۶/۶۲، ۱۳/۸۵ و ۸/۹۵ درصد تشکیل شده بود. مشخص شد که میزان MIC برای اسانس آویشن شیرازی در جدایه‌های سالمونلا در محدوده ۱۲/۵-۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین، میزان حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration; MBC) اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در جدایه‌های سالمونلا در محدوده ۱۲/۵-۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. قرارگیری جدایه‌های باکتری سالمونلا با آویشن شیرازی در سطح احتمالی یک درصد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) باعث کاهش تولید بیوفیلم شد. نتایج مطالعه نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدباکتریایی قابل‌توجهی می‌باشد و بیوفیلم جدایه‌های باکتری سالمونلا را تا میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: گیاهان دارویی، آویشن شیرازی، سالمونلا، بیوفیلم، روش حداقل غلظت مهارکنندگی رشد.

مقدمه

سالمونلا به خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriacea) تعلق دارد، اما جزو فلور طبیعی روده انسان یا حیوان محسوب نمی‌شود. سالمونلاها جزء عوامل بیماری‌زای مهم در طیور و انسان محسوب می‌شوند که بیماری‌های متنوعی را در طیور ایجاد می‌کنند. حدود ۴۰ درصد از کل مسمومیت‌های غذایی را جنس سالمونلا ایجاد می‌کند. عمده‌ترین مواد غذایی مسئول در انتقال سالمونلا در کشور ایران تخم مرغ و گوشت مرغ می‌باشد. از جمله این بیماری‌ها می‌توان به بیماری پلوروم (اسهال سفید جوجه‌ها)، بیماری تیفوئید و پاراتیفوئید اشاره کرد (Hadian Rasnani *et al*., 1998). همچنین، سالمونلوز یکی از بیماری‌های مهم مشترک بین انسان و دام بوده و در انسان نیز باعث ایجاد تب تیفوئیدی و پاراتیفوئیدی و گاستروآنتریت می‌شود که از طریق خوردن غذاهای آلوده مانند گوشت مرغ، گوشت قرمز، شیر، تخم مرغ و آب آلوده منتقل شده و باعث ورم معده و روده، اسهال خونی، استفراغ، سردرد، بی‌حالی و در نهایت زمین‌گیری می‌شود. این عفونت می‌تواند از فردی به فرد دیگر نیز انتقال یابد. با توجه به اهمیت بهداشتی این بیماری و از آنجایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سالمونلاها بالا رفته است، محققان به‌دنبال روش‌های جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، که یکی از این راه‌کارها استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد (Nouri *et al*., 2018).

بیوفیلم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آنها است که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلم‌ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج‌سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضدمیکروبی می‌شوند. درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بیوفیلم دشوار بوده و پزشکان با معضلات زیادی در این زمینه روبرو هستند. به‌دلیل خواص متمایز و نقش بیوفیلم‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلول‌های باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلم مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به استفاده از روش‌های درمانی متفاوت برای درمان این نوع عفونت‌ها ضرورت دارد (Alshami and Alharbi, 2014). تشکیل بیوفیلم میکروارگانیسم‌ها روی مواد غذایی و سطوح تماسی با آن، مشکلات بهداشتی و زیان‌های اقتصادی ناشی از فساد مواد غذایی را تشدید می‌نماید. سالمونلاها، استافیلوکوک‌ها، باسیلوس‌ها و اشریشیاها از رایج‌ترین باکتری‌های آلوده‌کننده مواد غذایی به‌شمار می‌روند. در واقع می‌توان بیان داشت که تشکیل بیوفیلم سبب می‌گردد که باکتری‌ها به عوامل ضدمیکروبی مقاوم شوند (Austin and Bergeron, 1995). بیوفیلم‌ها به علت توانایی بالای جمعیت‌های باکتریایی در سازش با تغییرات محیط نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار مقاوم شده‌اند، این باعث شده است تعدادی از محققین ادعا کنند این مقاومت در اثر استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری به‌وجود آمده است. یکی از راه‌های مبارزه با بیوفیلم‌ها استفاده از داروهای گیاهی به جای آنتی‌بیوتیک است (Danese *et al*., 2001).

اسانس‌های گیاهی، ترکیبات پیچیده‌ای از اجزای مختلف شیمیایی با مقادیر گوناگون می‌باشند. لذا، این مواد که یکی از منابع بالقوه واجد ترکیبات ضدباکتریایی

می‌باشند، برای مبارزه با بیوفیلم‌ها بسیار موثر و مفید قلمداد می‌شوند (Bagamboula *et al*., 2004). مقایسه نتایج گزارش‌شده در مورد خواص ضدباکتریایی اسانس‌های مختلف بسیار مشکل است. از دلایل آن می‌توان به تفاوت در روش‌های مختلف بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس‌ها، منابع تهیه آنها و سویه‌های باکتریایی به‌کار برده‌شده، اشاره نمود. به‌طورکلی، ترکیبات اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش این گیاهان، واریته گیاهی، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس، روش خشک‌کردن و استخراج اسانس متفاوت می‌باشد (Marilena *et al*., 2001).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* گیاهی از خانواده نعناعیان است. تحقیقات نشان داده این گیاه اثر ضد باکتری بسیار قوی روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد. به عنوان مثال اثر اسانس این گیاه بر باکتری *اشریشیا کلای* (Barkhori-Mehni *et al*., 2017) و *استافیلوکوکس آرئوس* (basti *et al*., 2004) و *سالمونلا تایفی‌موریوم* به اثبات رسیده‌است. در مطالعه‌ای که توسط سلطان دلال و همکارانش در سال ۲۰۱۹ در ارزیابی اثر ضدمیکروبی اسانس گیاهی آویشن شیرازی بر سویه‌های *استافیلوکوکوس آرئوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از مواد غذایی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که اسانس آویشن شیرازی اثر میکروب‌کشی بسیار مناسب بر *استافیلوکوکوس آرئوس*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد (Soltan Dallal *et al*., 2012). قمصری و همکاران در مطالعه‌ای، اثرات اسانس آویشن باغی بر عملکرد و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش ایشان نشان داد که ضریب تبدیل خوراکی، خوراک مصرفی، ماندگاری و شاخص تولید جوجه‌ها در سن ۴۲ روزگی تحت تاثیر اسانس آویشن باغی قرار نگرفت. جمعیت *اشریشیا کلای* و لاکتوباسیل‌های روده تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفت. بر اساس نتایج تحقیق آنها، استفاده از اسانس آویشن باغی در شرایط مناسب بهداشتی و تغذیه‌ای تاثیری بر عملکرد جوجه‌های گوشتی نداشته و تنها بر تغییر جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش آنها تاثیر داشت (Qomsari *et al*., 2018). بارت و رینـدرز دریافتند که اسانس آویشن برروی باکتری *اشریشیا کلای* در غلظت‌های پایین ۰/۱۲ و ۰/۲۵ درصد به ترتیب اثر باکتریواستاتیکی و باکتریوسیدی دارد (Burt and Reinders, 2003). در مطالعه انجام‌شده توسط نوری و همکارانش در سال ۲۰۱۸ بر تاثیر اسانس آویشن شیرازی روی جمعیت *اشریشیا کلای* در گوشت چرخ‌کرده گوساله در طی نگه‌داری در دمای یخچالی به این نتیجه رسیدند که در بالاترین غلظت (۰/۰۳ درصد) استفاده از اسانس و در دمای ۴ درجه سلسیوس، هرچه مدت زمان نگه‌داری گوشت گوساله بیشتر شود، میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد (Nouri *et al*., 2018). حسینی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ در مطالعه‌ای اثرات اسانس آویشن کوهی بر عملکرد و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آزمایش ایشان نشان داد که ضریب تبدیل خوراکی، خوراک مصرفی، ماندگاری و شاخص تولید جوجه‌ها در سن ۴۲ روزگی تحت تاثیر اسانس آویشن کوهی قرار نگرفت (Qomsari *et al*., 2018).

با توجه به بررسی‌های انجام‌شده، مشخص گردید که مطالعات بسیار کمی در جهت تعیین تاثیر اسانس

آویشن شیرازی علیه جدایه و بیوفیلم‌های باکتری سالمونلا انجام گرفته است. از این رو این مطالعه با هدف ارزیابی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه جدایه و بیوفیلم‌های سویه‌های بالینی سالمونلا انجام شد.

مواد و روش‌کار

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر، در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر انجام شده‌است. برای انجام این مطالعه، ۲۶ سویه باکتری سالمونلای جداشده از طیور (A11،E25،E13،B35،A5،A1،A8،E22،D24،B32، A6،D25،D23،D21،E27،E20،A10،A7،D26،E25، A13،A4،E24،D23،E1،E25) و۴ سویه باکتری سالمونلای جداشده از انسان (H_{21}، H_{22}، H_{23} و H_{27}) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* RITCC1730 به‌عنوان سویه استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. تمام باکتری‌ها از ذخیره باکتریایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد شبستر اخذ شدند که به روش‌های استاندارد جداسازی و شناسایی شده بودند (Bulte and Jakob, 1995). تجزیه و تحلیل اسانس با استفاده از روش Gc-Ms (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy; Gc-Ms) (مدل QP 5050، شیماتسو، ژاپن) انجام گرفت. آنالیز GC با استفاده از ستون مویین Hp5، و تحت دمای کوره ۲۲۰ الی ۲۹۰ درجه سلسیوس انجام گرفت، دمای ستون با گرادیان دمایی ۵۰ درجه سلسیوس در ۳ دقیقه شروع و خاتمه دما به ترتیب از ۵۰ تا ۲۴۰ درجه سلسیوس انتخاب شد. سرعت جریان گاز حامل هلیوم یک لیتر در دقیقه انتخاب شد و دتکتور دستگاه مجهز به آشکارساز جرمی انتخابی در حالت ضربه الکترون بود (با انرژی ۷۰ الکترون ولت). دمای خط انتقال انژکتور و Ms به ترتیب در ۲۲۰ و ۲۹۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. مولفه‌ها بر اساس مقایسه زمان نگه‌داری نسبی(Retention Time; RT) و طیف جرمی آن‌ها با استانداردها، داده‌های کتابخانه وایلی ۲۰۰۱ و سیستم GC-MS و داده‌های موجود در منابع علمی شناسایی شدند (Adams, 2001). آلکان‌ها نیز به عنوان نقاط مرجع در محاسبه شاخص‌های حفظ نسبی (Relative Strength Index; RRI) استفاده شدند.

به منظور تهیه اسانس از سرشاخه‌های گیاه آویشن شیرازی خشک‌شده، استفاده شد. ۲۰۰گرم از پودر گیاه خشک پس از توزین (ترازوی دیجیتال AND مدل EK 610i، چین) با دستگاه کلونجر (شرکت آزما تجهیز با سایز بالن ۵۰۰ میلی‌لیتری، ایران) به مدت ۳ ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس تهیه‌شده بعد از جداکردن توسط سدیم سولفات بی‌آب (مرک، آلمان) آب‌زدایی و سپس در یک ظرف سربسته رنگی برای انجام آزمون‌های میکروبی در یخچال (مدل فن‌دار، پویش‌طب آداک، ایران) و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری و ذخیره شد. نمونه‌های آماده‌شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف سنجی جرمی (GC-MS) تزریق گردیدند. از آنجایی که ترکیبات موجود در اسانس‌ها به لحاظ وزن مولکولی و قطبیت بعنوان مواد فرار شناخته می‌شوند، از این‌رو عمل جداسازی و شناسایی ترکیبات متشکله اسانس به‌دست‌آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف‌سنجی جرمی انجام گردید. طیف‌های جرمی به‌دست آمده از دستگاه

GC-MS با طیف‌های جرمی استاندارد موجود در منابع و داخل خود دستگاه مقایسه گردید. استوک اولیه اسانس آویشن شیرازی با رقت ۶۱۲۰ میکرولیتر بر میلی‌متر توسط محلول دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyl sulfoxide; DMSO) ۵ درصد (مرک، آلمان) رقیق شد. سپس جهت استریل‌کردن، از فیلترهای میکروبی سرسرنگی ۲/۰ میکرون عبور داده شد. این استوک برای استفاده در مراحل بعد در یخچال نگه‌داری شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی، از روش براث میکرودایلوشن استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولرهینتون براث (بیومارک، هندوستان) به داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (برند SPL استریل‌شده با اشعه گاما با قطر و عمق هر چاهک به ترتیب ۶/۵ و ۱۱ میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس آویشن شیرازی حل‌شده در حلال DMSO (مرک، آلمان) با غلظت نهایی ۱۰ درصد، در چاهک اول اضافه شده و به صورت سریالی (Two-Fold) رقیق شد و در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک‌فارلند با چگالی جذب نوری برابر با ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پس از آن پلیت به وسیله پارافیلم (برند بمیس، آمریکا) برای جلوگیری از دهیدراته‌شدن پوشانده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری ۳۰ میکرولیتر از رزازورین (Resazurin) ۰/۰۱ درصد (مرک، آلمان) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه گردید و دوباره به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. تغییر رنگ محلول رزازورین از رنگ آبی به رنگ صورتی نشان‌دهنده احیاءشدن رزازورین و در نتیجه رشد باکتری است. بعد از گرمخانه‌گذاری آخرین چاهک با کمترین غلظت از ماده گیاهی که به رنگ آبی است، به عنوان مقدار MIC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید. برای هر میکروپلیت یک سری کنترل نیز در نظر گرفته شد که شامل:

-کنترل مثبت: ردیفی که در آن به جای اسانس ۱۰۰ میکرولیتر سیپروفلوکساسین (۱ mg/ml) اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط کشت + آنتی‌بیوتیک + باکتری).

-کنترل منفی: ردیفی که در آن به جای اسانس،۱۰۰ میکرولیتر از حلال (DMSO ۱۰ درصد) در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط کشت + DMSO + باکتری).

-کنترل استریل بودن مواد گیاهی: ردیفی که در آن مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط کشت + اسانس).

-کنترل رشد باکتری: ردیفی که در آن ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* (RITCC1730) در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط کشت + باکتری).

برای تعیین MBC، (کمترین غلظت از ماده گیاهی است که قادر به کشتن ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح‌شده طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد) ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی موجود در چاهک MIC و نیز

چاهک‌های حاوی غلظت اسانس بیشتر از همه چاهک‌های آبی‌رنگ، برداشته شده و سوسپانسیون مربوط به هر یک از رقت‌های مذکور بر روی محیط مولر هینتون آگار متفاوت تلقیح گردید. پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، از نظر رشد باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت چاهکی که قادر به کشتن ۹۹/۹ درصد از باکتری‌های تلقیح‌شده بر روی محیط مولر هینتون آگار بود، به عنوان میزان MBC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید (Sasidharan *et al*., 2014).

-**روش انجام آزمون بیوفیلم**: برای بررسی اثر ضد بیوفیلمی اسانس آویشن شیرازی، ابتدا جدایه‌های سالمونلا با آویشن شیرازی تیمار شده و سپس قدرت تشکیل بیوفیلم توسط هر کدام از آنها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، هر کدام از جدایه‌های سالمونلا در محیط کشت تریپتیک سویا براث (Tryptic Soy Broth; TSB) (بیومارک، هندوستان) حاوی یک درصد گلوکز کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک‌فارلند (با چگالی جذب نوری برابر با ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. در مرحله بعد، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به داخل سه چاهک میکروپلیت ریخته شد. در ادامه نمونه‌ها در دو گروه شاهد (کنترل) و گروه آزمایش یا تیمار آویشن شیرازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. بدین‌صورت که در گروه تیمار ۱۰۰ میکرولیتر از میزانی از عصاره آویشن که در آزمایش MIC به عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کننده در نظر گرفته شده بود، به چاهک‌ها علاوه گردید. در گروه شاهد ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO ۱۰ درصد اضافه گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سلسیوس آزمایش سنجش تولید بیوفیلم‌ها طبق دستورالعمل ذیل انجام پذیرفت. ابتدا به آرامی میکروپلیت ۳ مرتبه توسط ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر فسفات سالین بافر (Phosphate Buffered Saline; PBS) (آساژن، ایران) شسته و به صورت وارونه قرار داده شد تا چاهک خشک گردد. سپس به تمام چاهک‌ها ۱۵۰ میکرولیتر رنگ کریستال‌ویوله ۱ درصد آبی اضافه شده و پس از ۳۰ دقیقه پلیت‌ها در زیر آب دیونیزه با فشار کم شسته شده تا رنگ اضافی از گودهها خارج شود. میکروپلیت در محیط آزمایشگاه خشک شده و سپس رنگ‌های باند شده با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد (کیمیا الکل زنجان، ایران) آزاد شد. چگالی جذب نوری (Optical Density; OD) هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (مدل BioTec ELx 800، شرکت بیوتک، آمریکا) اندازه‌گیری گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار شده و از محیط کشت TSB شده به عنوان کنترل منفی استفاده شده و از الکل ۹۶ درصد به عنوان بلانک استفاده شد. توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه های مورد آزمایش بر اساس جذب نوری (OCC) ثبت گردید (Sasidharan *et al*., 2014).

- **تحلیل آماری داده‌ها**: داده‌های حاصله از آزمایش‌های تعیین MIC و MBC ترکیبات مورد آزمایش، به‌صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند و با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (۲۰۰۹) و با آزمون t زوجی (Paired *t*-test)

مورد واکاوی قرارگرفت. مقادیر $p<۰/۰۰۱$ معنی‌داری در نظر گرفته‌شد.

یافته‌ها

در کل ۱۴ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی شد. ترکیبات موجود و درصد آن به ترتیب فراوانی در جدول ۱ نشان داده شده است. بیشترین ترکیبات اسانس آویشن شیرازی را تیمول با ۴۶/۶۲ درصد، کارواکرول با ۱۳/۸۵ درصد و لینالول با ۸/۹۵ درصد تشکیل داده بود (این سه ماده در مجموع ۶۹/۴۲ درصد اسانس را تشکیل می‌دهند).

جدول ۱- میزان ترکیبات مختلف موجود در اسانس آویشن شیرازی استفاده‌شده در مطالعه برحسب درصد (اندازه‌گیری‌شده با روش Gc-Ms)

شماره پیک	زمان بازداری به دقیقه	نام ماده	درصد در ترکیب
۳۶	۱۷/۳۸	تیمول (Thymol)	۴۶/۶۲
۳۸	۱۷/۵۴	کارواکرول (Carvacrol)	۱۳/۸۵
۲۴	۱۴/۲۳	لینالول (Linalool)	۸/۹۵
۱۸	۱۲/۱۶	گاما ترپن (γ-Terpinene)	۶/۷۳
۱۶	۱۰/۲۷	آلفا ترپن (α-Terpinene)	۵/۷۲
۲۰	۱۴/۲۵	پارا سیمن (Para-Cymene)	۴/۷۲
۹	۹/۵۰	۳-اکتانون (3-octanone)	۲/۴۲
۴۰	۱۸/۳۲	ترانس کاریوفلن (Trans-Caryophyllene)	۱/۹۵
۳۲	۱۶/۸۵	تیمول متیل اتر (Thymol methyl ether)	۱/۲۵
۳۳	۱۶/۹۲	کارواکول متیل اتر(Carvacrol methyl ether)	۱/۱۱
۴۲	۱۸/۵۸	استیل تیمول (Acetylthymol)	۰/۸۲
۴۴	۲۲/۵۲	ویرید فلورن (Viridiflorene)	۰/۶۵
۴۷	۲۳/۲۴	کاریوفیلن اکسید (Caryophyllene oxide)	۰/۴۵
۳۵	۱۷/۰۱	۸و۹-دهیدرونویسولانگفیلن(-8,9 Dehydroneoisolongifolene)	۰/۳۲
		مجموع (Total)	۹۷/۸۰

-نتایج آزمون حساسیت ضد میکروبی

-آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی یا MIC: نتایج حاصل از تعیین MIC آویشن شیرازی بر جدایه‌های سالمونلا با بکارگیری روش براث میکرودایلوشن در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MIC برای اسانس آویشن شیرازی در جدایه‌های سالمونلا در محدوده ۱۲/۵- ۰/۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میانگین کلی MIC در رابطه با باکتری‌های کارشده ۶/۲۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

-آزمون حداقل غلظت کشندگی یا MBC: میزان MBCآویشن شیرازی در جدایه‌های سالمونلا در محدوده ۱۲/۵-۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۲). میانگین کلی MBC در رابطه با باکتری‌ها ۶/۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

جدول ۲- **حداقل** غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس آویشن شیرازی

شماره نمونه	حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	شماره نمونه	حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
A_1	۳/۱۲	۶/۲۵	E_{22}	۳/۱۲	۶/۲۵
E_{25}	۳/۱۲	۶/۲۵	D_{24}	۱/۵۶	۳/۱۲
E_{13}	۳/۱۲	۶/۲۵	B_{32}	۶/۲۵	۱۲/۵
B_{35}	۳/۱۲	۶/۲۵	A_6	۶/۲۵	۱۲/۵
A_5	۳/۱۲	۶/۲۵	D_{25}	۰/۷۸	۱/۵۶
A11	۶/۲۵	۶/۲۵	D_{23}	۱/۵۶	۳/۱۲
A_8	۰/۳۹	۱/۵۶	A_{10}	۶/۲۵	۱۲/۵
A_7	۳/۱۲	۶/۲۵	E_1	۶/۲۵	۶/۲۵
D_{26}	۱/۵۶	۳/۱۲	H_{22}	۶/۲۵	۶/۲۵
E_{25}	۱/۵۶	۳/۱۲	E_{25}	۱۲/۵	۱۲/۵
A_{13}	۳/۱۲	۳/۱۲	D_{21}	۱۲/۵	۱۲/۵
A_4	۳/۱۲	۳/۱۲	E_{27}	۱۲/۵	۱۲/۵
H_{23}	۶/۲۵	۶/۲۵	H_{27}	۱۲/۵	۱۲/۵
H_{21}	۱۲/۵	۱۲/۵	E_{20}	۶/۲۵	۶/۲۵
E_{24}	۱۲/۵	۱۲/۵	سویه استاندارد	۰/۱۲۵	>۱
D_{23}	۳/۱۲	۳/۱۲	(کنترل شاهد)		

-اثر ضد بیوفیلمی آویشن شیرازی: میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها پس از قرارگرفتن به مدت ۵ ثانیه در معرض اسانس آویشن شیرازی کاهش یافت. آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده از الایزا ریدر با آزمون t زوجی (Paired *t*-test) نشان داد که در معرض قرارگیری جدایه‌ها با آویشن شیرازی در سطح احتمالی یک درصد به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) باعث کاهش تولید بیوفیلم می‌گردد (جدول ۳). در بررسی ۲۶ نمونه باکتری سالمونلا از نظر قدرت ایجاد بیوفیلم، همه باکتری‌ها قدرت ایجاد بیوفیلم را داشتند.

جدول ۳- **میانگین چگالی جذب نوری بیوفیلم به‌دست‌آمده از جدایه‌های *سالمونلا تایفی‌موریوم* قبل و بعد از تیمار با آویشن شیرازی**

نمونه	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (قبل از تیمار)	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (بعد از تیمار)	نمونه	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (قبل از تیمار)	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (بعد از تیمار)
A_1	۰/۱۴۳	۰/۰۳۳	E_{22}	۰/۱۲۵	۰/۰۳۲
E_{25}	۰/۱۶۲	۰/۰۳۲	E_{21}	۰/۱۴	۰/۰۳۲
E_{23}	۰/۱۴	۰/۰۳۳	B_{32}	۰/۲۰۲	۰/۰۳۴
B_{33}	۰/۱۳۲	۰/۰۳۴	A_6	۰/۱۲۷	۰/۰۳۲
A_5	۰/۱۲۹	۰/۰۳۴	D_{27}	۰/۱۲۰	۰/۰۳۳
A_{11}	۰/۱۲۵	۰/۰۳۱	D_{23}	۰/۲۲۷	۰/۰۳۳
A_8	۰/۱۴	۰/۰۳۲	A_{10}	۰/۳۵۲	۰/۰۳۲
A_7	۰/۱۴۲	۰/۰۳۳	D_{20}	۰/۱۴۶	۰/۰۳۳
D_{26}	۰/۰۹۷	۰/۰۳۲	A_2	۰/۱۱۹	۰/۰۳۳
A_3	۰/۱۸۱	۰/۰۳۳	H_{22}	۰/۱۴	۰/۰۳۳
A_{13}	۰/۱۵۰	۰/۰۳۳	B35	۰/۱۱۸	۰/۰۳۲
A_4	۰/۱۳۸	۰/۰۳۳	D_{21}	۰/۱۲۴	۰/۰۳۴
E_{26}	۰/۱۴	۰/۰۳۳	E_{27}	۰/۱۲۷	۰/۰۳۱
H_{24}	۰/۱۳	۰/۰۳۱	H_{22}	۰/۱۳۷	۰/۰۳۳
E_{24}	۰/۱۱۱	۰/۰۳۲	A_{12}	۰/۱۳۵	۰/۰۳۲
TSB قبل		۰/۰۶۵	قبلB		۰/۰۶
TSB بعد		۰/۰۳۴	بعدB		۰/۰۳۴

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ترکیبات اصلی اسانس شیرازی با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی مشخص شدند و مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس، به‌ترتیب تیمول و کاروکراول با ۴۶/۶۲ و ۱۳/۸۵ درصد به‌دست آمد. در بررسی‌های مختلف، مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن شیرازی شناسایی شده است که از آن جمله می‌توان به نتایج مطالعه صادق‌زاده و همکارانش اشاره نمود. ایشان ۱۳ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی نمودند که عمده‌ترین آن‌ها را تیمول با ۵۲/۴ درصد، گاماترپینن با ۱۷/۱ درصد، پاراسیمین با ۱۳/۲ درصد و کاراکرول با ۱/۶ درصد تشکیل می‌داد (Sadeghzadeh *et al*., 2006).

با بررسی واریته‌های مختلف گیاه اسانس شیرازی ، مهم‌ترین ترکیبات آن به ترتیب تیمول و کارواکرول تعیین شده است که میانگین مقدار آن‌ها به ترتیب ۱۵ و ۳۰ درصد گزارش شده است (Farahpour *et al*., 2021). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد تیمول به دست‌آمده به مقدار قابل توجهی از مقدار میانگین گزارش‌شده آن بالاتر بوده و برعکس مقدار کارواکرول

به مقدار قابل توجهی از مقدار میانگین مذکور پایین‌تر است (جدول ۱). ترکیب شیمیایی اسانس‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله منشأ جغرافیایی، شرایط آب-وهوایی و خاک، مرحله چرخه رشد و فصول برداشت، تغییر می‌کند که این تغییر می‌تواند باعث تفاوت‌هایی در خواص ضدباکتریایی آن‌ها نیز باشد. با توجه به اثبات خاصیت ضد باکتریایی تیمول و کاراکرول (این دو ترکیب بسیار به یکدیگر شبیه بوده و تفاوت آنها در داشتن گروه هیدروکسیل در جایگاه‌های مختلف در حلقه فنلی است) در مطالعات متعدد، از آنجایی‌که اسانس به‌دست‌آمده از آویشن شیرازی در روش به کار برده شده در این تحقیق دارای میزان بالایی از تیمول نسبت به میانگین گزارش‌شده در منابع علمی می‌باشد، لذا با وجود میزان کارواکرول کمتر، اسانس به‌دست آمده در مطالعه حاضر می‌تواند خواص ضدمیکروبی بیشتری نسبت به اسانس‌های مشابه داشته باشد (Fazeli *et al.*, 2007). به‌طور مشابهی، در تحقیقی که محبوبی و همکارانش انجام دادند گزارش کردند که خاصیت ضدمیکروبی تیمول در گیاهان آویشن و مرنجوش از خواص ضدمیکروبی کارواکرول موجود در آن بیشتر است (Mahboubi and Feizabadi, 2009).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، در جدایه‌های سالمونلا به ترتیب میزان MIC و MBC برای اسانس آویشن شیرازی در محدوده ۱۲/۵-۰/۳۹ و ۵۶/۵-۱/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست‌آمد و این اسانس در تمام جدایه‌های باکتری سالمونلا به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) توانایی کاهش تولید بیوفیلم را داشت، هر چند که در تمام ۲۶ نمونه باکتری سالمونلا همه باکتری‌ها قدرت ایجاد بیوفیلم را داشتند. اما با توجه به نتایج جدول ۳ این کاهش بیوفیلم در بهترین مقدار در مورد نمونه سالمونلای A_{10}، ۱۰/۶ برابر کمتر شده بود (از مقایسه چگالی دانسیته نوری) ملک اوغلی و همکاران وی در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۸، حساسیت آنتی‌بیوتیکی *استافیلوکوکوس آرئوس*، *اشریشیا کلای*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* را نسبت به اسانس‌های گیاهان دارویی مانند آویشن و زنیان مورد بررسی قرار دادند (Malekoghli *et al.*, 2019). در مطالعه ایشان، رشد باکتری‌های مورد بررسی به‌وسیله اسانس‌ها مهار شد. بیشترین حساسیت به اسانس‌ها به ترتیب مربوط به *استافیلوکوکوس آرئوس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* بود. MIC اسانس آویشن برای *استافیلوکوکوس آرئوس*، *سالمونلا*، *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* به‌ترتیب ۰/۱۹، ۰/۳۹، ۰/۷۸ و ۱/۵۶ و MBC آن به‌ترتیب ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در کل نتایج مطالعه ملک اوغلی و همکاران نشان داد که باکتری‌های گرم مثبت حساس‌تر از باکتری‌های گرم منفی نسبت به اسانس‌های زنیان و آویشن هستند. یافته‌های مطالعه ایشان نیز نظیر نتایج مطالعه حاضر حاکی از برخورداری اسانس گیاه آویشن شیرازی از اثرات ضدباکتریایی در مهار رشد میکروب‌ها به‌خصوص باکتری سالمونلا بود. در مطالعه فوق، MIC و MBC اسانس آویشن در خصوص باکتری سالمونلا، ۰/۷۸ و ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که نشان می‌دهد اسانسی که آنها به کار برده بودند، خواص آنتی باکتریایی کمتری نسبت به اسانس به کار برده شده در تحقیق حاضر (میزان MIC و MBC ۰/۳۹ و ۱/۵۶) داشت (جدول ۲).

نتایج مشابه دیگری توسط باگامبولا و همکاران در سال ۲۰۰۴ در خصوص اثرات اسانس گیاه آویشن و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر باکتری *شیگلا سونئی* (*Shigell sonnei*) و *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexneri*) به‌دست آمده است (Bagamboula *et al.*, 2004). در مطالعه قربانی و سلمان در سال ۲۰۱۸، اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های اتانولی آویشن، رازیانه، جعفری، گشنیز و پونه روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس آرئوس*، *اشریشیا کلای*، کلبسیلا و *سالمونلا تیفی‌موریوم* مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت و نتایج آن بیانگر آن بود که عصاره‌های اتانولی آویشن، جعفری، رازیانه، گشنیز و پونه در بررسی به روش انتشار و دیسک کاغذی، تاثیری بر مهار رشد کلبسیلا، *اشریشیا کلای* و سالمونلا نداشتند (Gorbani and Salman, 2018). نتایج مطالعه ایشان از نظر اثر مهاری آویشن شیرازی بر باکتری‌های مختلف نظیر سالمونلا، با نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی ندارد، زیرا که در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده نشان داد که اسانس آویشن به‌صورت معنی‌داری سبب مهار رشد و فعالیت باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* شد. طی مطالعه‌ای دیگر در کشور ترکیه در سال ۲۰۰۳، ساگدیک و اوزجان نشان داد که عصاره دانه گیاه رازیانه هیچ‌گونه اثر مهارکننده رشدی روی ۱۵ میکروارگانیسم ازجمله *استافیلوکوکوس ارئوس*، اشریشیا *کلای* و سالمونلا ندارد. نتایج این پژوهش با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر مطابقت ندارد (Sağdıç and Özcan, 2003). در مطالعه‌ای دیگر کیم و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که عصاره زردچوبه مهارکننده تشکیل بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس موتانس* می‌باشد. بنابراین، اثرات اسانس آویشن شیرازی و عصاره‌های گیاهی دیگر بر تشکیل بیوفیلم را می‌توان با اثرات این ماده بر رشد باکتری‌هایی نظیر سالمونلا مرتبط دانست (Kim *et al.*, 2008).

در مطالعه پویا و همکاران در سال ۱۳۹۴ اثر عصاره گیاه آویشن شیرازی بر بیوفیلم باکتری‌های موجود در مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که عصاره آویشن شیرازی دارای خاصیت ضدمیکروبی بوده و سبب کاهش تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های مورد بررسی شده است (Pouya *et al.*, 2014). نتایج این مطالعه از نظر خواص ضدباکتریایی اسانس گیاه آویشن شیرازی با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر، آویشن شیرازی به طور معنی‌داری ($p<۰/۰۰۱$) باعث کاهش تولید بیوفیلم جدایه‌های باکتری سالمونلا شد (جدول ۳). علاوه بر آویشن، بسیاری از گیاهان دارویی دیگر نیز سبب کاهش بیوفیلم شده‌اند (Kim *et al.*, 2008). نتایج مطالعه الشامی در سال ۲۰۱۴ نشان داد که عصاره چای ترش مهارکننده تشکیل بیوفیلم *کاندیدا آلبیکنس* است (Alshami and Alharbi, 2014). نتایج مطالعه نماسیوایام و روی نیز حاکی از آن بود که عصاره گیاه سنجد مهارکننده تشکیل بیوفیلم *اشریشیا کلای* با غلظت‌های مختلف می‌باشد (Namasivayam and Roy 2013).

در نهایت، مطالعه حاضر نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی می‌باشد و بیوفیلم جدایه‌های باکتری سالمونلا را تا درصد زیادی کاهش می‌دهد. یافته‌های مطالعه این نوید

را می‌دهد که استفاده از این اسانس می‌تواند روشی برای جایگزین‌کردن آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی با اسانس‌های گیاهی طبیعی باشد.

سپاسگزاری

اطلاعات ارائه‌شده در این مقاله، برگرفته از نتایج پایان‌نامه با کد پژوهشی (۱۹۵۲۹۱۳۷۸۱۶۷۲۲۷۹۱۳۹۸۹۰۴۰۰) در رشته دکترای حرفه‌ای رشته دامپزشکی می‌باشد. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر به‌جهت کمک و مساعدت در انجام تحقیق حاضر، قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

منابع

- Adams, R.P. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corp.: Carol Stream, USA.pp: 25-36.
- Alshami, I and Alharbi, A.E. (2014). Hibiscus sabdariffa extract inhibits in vitro biofilm formation capacity of Candida albicans isolated from recurrent urinary tract infections. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 4(2): 104-108.
- Austin, J.W and Bergeron, G. (1995). Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. Journal of Dairy Research, 62(3): 509-519.
- Bagamboula, C.F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. Food microbiology, 21(1): 33-42.
- Barkhori-Mehni, S., Khanzadi, S., Hashemi, M. and Azizzadeh, M. (2017). Antibacterial activity of Zataria multiflora boiss essential oil against some fish spoilage bacteria. Journal of Human Environment and Health Promotion, 2(4): 220-225.
- Basti, A,. Razavilar, V., Misaghi A., Abbasifar, R., Radmehr B., et al. (2004). Effect of Zataria multiflora Boiss. essential oil on probability of growth initiation of Salmonella typhimurium in a brain heart infusion broth. The Journal of Medicinal Plants, 3 (9): 85-92 [In Persian].
- Bulte, M. and Jakob, P. (1995). The use of a PCR-generated inva probe for the detection of Salmonella spp. In artificially and naturally contaminated food. International Journal of Food Microbiology, 26 (3): 335-344.
- Burt, S.A. and Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against Escherichia coli O157:H7. Letters in Applied Microbiology, 36(3): 162-167.
- Danese, P.N., Pratt, L.A. and Kolter, R. (2001). Biofilm formation as a developmental process. In Methods in enzymology ,Academic Press, 336:19-26.
- Farahpour, M.R., Sheikh, S., Kafshdooz, E and Sonboli, A. (2021). Accelerative effect of topical Zataria multiflora essential oil against infected wound model by modulating inflammation, angiogenesis, and collagen biosynthesis. Pharmaceutical Biology, 59(1): 1-10.
- Gorbani, M. and Salman, A. (2018). Evaluation of Antibacterial Properties of Coriander, Oregano, Fennel, Thyme and parsley extracts, on Pathogenic Bacteria Staphylococcus aureus (ATCC 33591) , Escherichia coli (ATCC 23591) , Klebsiella (ATCC 10031) and Salmonella Typhimurium. Journal of Sabzaevar Medicine University Journal, 25(4):591-598. [In Persian]

- Fazeli, M.R., Amin, G., Attari, M.M., Ashtiani, H., Jamalifar, H. and Samadi N. (2007). Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (Zataria multiflora) against some food-borne bacteria. Food control, 18(6): 646-9.
- Hadian Rasnani, Z., Oghabi, F. and Valai, N. (1998). Poultary carcass Salmonella infection at industrial slaughterhouse and the effect suspention-cooling. KAUMS Journal (FEYZ), 1(4): 67-74. [In Persian]
- Kim, J.E., Kim, H.E., Hwang, J.K., Lee, H.J., Kwon, H.K., et al. (2008). Antibacterial characteristics of Curcuma xanthorrhiza extract on Streptococcus mutans biofilm. The Journal of Microbiology, 46: 228-232.
- Mahboubi, M. and Feizabadi, M. (2009). The Antimicrobial Activity of Thyme, Sweet Marjoram, Savory and Eucalyptus oils on Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aspergillus niger and Aspergillus flavus. The Journal of Medicinal Plants; 8 (30) : 137-144 [In Persian].
- Malekogli, R., Dadashzade, K. and Ardabili F. (2019). Investigating the antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Salmonella typhimurium to essential oils of zenian and thyme. The 6th National Conference of Medicinal Plants of Traditional Medicine and Organic Agriculture, Hamedan- Iran. [In Persian]
- Marilena, M., Bersani, C. and Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67(3): 187-195.
- Namasivayam, S.K.R. and Roy, E.A. (2013). Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of Escherichia coli. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2): 486-489.
- Nouri, N., Rukni, N., Akhundzadeh, A., Mithaghi, A. and Alipour, S. (2018). Investigating the effect of Shirazi thyme essential oil and preservation degree on the growth rate of E.COLI 0157:H7 in hamburger using the Hurdle Technology system. Journal of Veterinary Research, 63(3): 247-252. [In Persian]
- Pouya, R., Sobhanipour, A. and bulqasem D. (2014). Investigation of the effect of Shirazi thyme plant extract on the biofilm of bacteria (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus) present in food. International Development Conference Focusing on Agriculture, Environment and Tourism. Tabriz, Iran. [In Persian]
- Qomsari, A., Hosseini, S.A. and Afshar F. (2018). Effects of garden thyme essential oil on performance and intestinal microbial population of broiler chickens. 2nd National Conference on New Researches in Animal Science, Birjand, Iran. [In Persian]
- Sadeghzadeh, L., Sefidkon, F., and Oliya, P. (2006). Investigating the composition and antimicrobial properties of Shirazi thyme essential oil (Zataria mulrifolra).Pajohesh Sazandeghi, 19(2): 52-56. [In Persian]
- Sağdıç, O. and Özcan, M. (2003). Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. Food Control, 14(3): 141-143.
- Sasidharan, N.K., Sreekala, S.R., Jacob, J. and Nambisan, B. (2014). In vitro synergistic effect of curcumin in combination with third generation cephalosporins against bacteria associated with infectious diarrhea. BioMed Research International, 2014: 1-8.
- Soltan Dallal, M., Bayat, M., Yazdi, M.H., Aghaamiri, S., Mashkani, M. G., Mohtasab, T.P.A., et al. (2012). Antimicrobial effect of Zataria multiflora on antibiotic-resistant Staphylococcus aureus strains isolated from food. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences, 17(2): 21-29. [In Persian]