

Research article”

DOI: [10.71499/jvcp.2024.3061422](https://doi.org/10.71499/jvcp.2024.3061422)

Antibacterial and antibiofilm effects of Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) 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 up 46.62%, 13.85%, and 8.95% of the essential oil respectively. 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"

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3061422

اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر سالمونلاهای جدا شده 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 جدا شده از طیور و انسان به روش 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 برآث میکرودايلوشن 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 ($p < 0.001$) باعث کاهش تولید بیوفیلیم شد. نتایج مطالعه نشان داد که اسانس آویشن شیرازی دارای اثرات ضدباکتریایی قابل توجهی می‌باشد و بیوفیلیم جدایه‌های باکتری سالمونلا را تا میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد.

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

مقدمه

سالمونلا به خانواده انتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) 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 گاستروانتریت 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 به دنبال روش‌های جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند، که یکی از این راه‌کارها استفاده از گیاهان دارویی می‌باشد (Nouri et al., 2018).

بیوفیلیم باکتری‌ها شامل تجمعاتی از میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای بین آنها است که به یک سطح متصل

شده‌اند. بیوفیلیم‌ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمری خارج سلولی باعث کاهش نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌شوند. درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بیوفیلیم دشوار بوده و پزشکان با معضلات زیادی در این زمینه روبرو هستند. به دلیل خواص متمایز و نقش بیوفیلیم‌ها در کاهش نفوذ دارو به داخل سلول‌های باکتریایی، باکتری‌های مولد بیوفیلیم مقاومت دارویی زیادی داشته و نیاز به استفاده از روش‌های درمانی متفاوت برای درمان این نوع عفونت‌ها ضرورت دارد (Alshami and Alharbi, 2014). تشکیل بیوفیلیم 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 بیوفیلیم سبب می‌گردد که باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند (Austin and Bergeron, 1995). بیوفیلیم‌ها 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 به وجود آمده است. یکی از راه‌های مبارزه با بیوفیلیم‌ها 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 بیوفیل‌ها 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. به‌طور کلی، 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 نعنائیان 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 آرتوس* (basti et al., 2017) و *سالمونلا تیفی‌موریوم* به اثبات رسیده‌است. در مطالعه‌ای که توسط سلطان دلال و همکارانش در سال ۲۰۱۹ در ارزیابی اثر ضد میکروبی اسانس گیاهی آویشن شیرازی بر سویه‌های *استافیلوکوکس آرتوس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک جداشده از مواد غذایی انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که اسانس آویشن شیرازی اثر میکروب‌کشی بسیار مناسب بر *استافیلوکوکس آرتوس*‌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 *لاکتوباسیل*‌های روده تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار گرفت. بر اساس نتایج تحقیق آنها، استفاده از اسانس آویشن باغی در شرایط مناسب بهداشتی و تغذیه‌ای تاثیر بر عملکرد جوجه‌های گوشتی نداشته و تنها بر تغییر جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش آنها تاثیر داشت (Qomsari et al., 2018). بارت و ریندرز دریافتند که اسانس آویشن بر روی 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 بیوفیلیم‌های باکتری سالمونلا انجام گرفته است. از این رو این مطالعه با هدف ارزیابی اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی علیه جدایه و بیوفیلیم‌های سویه‌های بالینی سالمونلا انجام شد.

مواد و روش کار

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر، در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر انجام شده است. برای انجام این مطالعه، ۲۶ سویه باکتری سالمونلای جداشده از طیور (B32, D24, E22, A8, A1, A5, B35, E13, E25, A11, E25, D26, A7, A10, E20, E27, D21, D23, D25, A6, E25, E1, D23, E24, A4, A13) و ۴ سویه باکتری سالمونلای جداشده از انسان (H27, H23, H22, H21) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین باکتری سالمونلا تایفی موریوم RITCC1730 به عنوان 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 موین 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 دکتور 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. ۲۰۰ گرم 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، پوشش طب آداک، ایران) و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه‌داری و ذخیره شد. نمونه‌های آماده‌شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی توام با طیف‌سنجی 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 به دست آمده توسط روش کروماتوگرافی گازی توام با طیف‌سنجی جرمی انجام گردید. طیف‌های جرمی به دست آمده از دستگاه

تغییر رنگ محلول رزازورین از رنگ آبی به رنگ صورتی نشان‌دهنده احیاء شدن 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 تایفی موریوم* (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 تلقیح شده طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد) ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی موجود در چاهک MIC و نیز

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 استریل کردن، 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 مولر هیتون براث (بیومارک، هندوستان) به داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (برند SPL استریل شده 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 حل شده 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 پارافیلیم (برند بمیس، آمریکا) برای جلوگیری از دهیدراته شدن 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.

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 بیوفیلیم‌ها طبق دستورالعمل ذیل انجام پذیرفت. ابتدا به آرامی میکروپلیت ۳ مرتبه توسط ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر فسفات سالین بافر (Phosphate Buffered Saline; PBS) (آسازن، 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 بیوفیلیم جدایه‌های 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، به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند و با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ (۲۰۰۹) و با آزمون t زوجی (Paired t-test)

چاهک‌های حاوی غلظت اسانس بیشتر از همه چاهک‌های آبی‌رنگ، برداشته شده و سوسپانسیون مربوط به هر یک از رقت‌های مذکور بر روی محیط مولر هیتتون 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 هیتتون آگار بود، به عنوان میزان MBC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه سه بار تکرار گردید (Sasidharan et al., 2014).

- روش انجام آزمون بیوفیلیم: برای بررسی اثر ضد بیوفیلمی اسانس آویشن شیرازی، ابتدا جدایه‌های سالمونلا با آویشن شیرازی تیمار شده و سپس قدرت تشکیل بیوفیلیم توسط هر کدام از آنها مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، هر کدام از جدایه‌های سالمونلا در محیط کشت تریپتیک سویا برات (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. بدین صورت که در گروه تیمار ۱۰۰ میکرولیتر از میزانی از عصاره آویشن که در آزمایش MIC به عنوان حداقل غلظت ممانعت‌کننده در

مورد واکاوی قرارگرفت. مقادیر $p < 0/001$ معنی‌داری در نظر گرفته‌شد.

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).

یافته‌ها

در کل ۱۴ ترکیب در اسانس آویشن شیرازی شناسایی شد. ترکیبات موجود و درصد آن به ترتیب

جدول ۱- میزان ترکیبات مختلف موجود در اسانس آویشن شیرازی استفاده‌شده در مطالعه برحسب درصد (اندازه‌گیری شده 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 ترپین (γ -Terpinene)	۶/۷۳
۱۶	۱۰/۲۷	آلفا ترپین (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 کاریوفیلن (Trans-Caryophyllene)	۱/۹۵
۳۲	۱۶/۸۵	تیمول متیل اتر (Thymol methyl ether)	۱/۲۵
۳۳	۱۶/۹۲	کارواکرول 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	۹و۸-دهیدرونویسولانگفیلن (8,9-Dehydronoisolongifolene)	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 برات 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 MBC آویشن 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 (میلی گرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم بر میلی لیتر)	شماره نمونه	حداقل غلظت مهارکنندگی (میلی گرم بر میلی لیتر)	حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم بر میلی لیتر)
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
A ₁₁	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		>۱	۰/۱۲۵
D ₂₃	۳/۱۲	۳/۱۲			سویه استاندارد (کنترل شاهد)

قرارگیری جدایه‌ها با آویشن شیرازی در سطح احتمالی یک درصد به طور معنی‌داری ($p < 0.01$) 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.

-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 به دست آمده از الیزا ریدر با آزمون t زوجی (Paired t -test) نشان داد که در معرض

جدول ۳- میانگین چگالی جذب نوری بیوفیلم به دست آمده از جدایه‌های *سالمونلا تایفی موربیوم* قبل و بعد از تیمار با آویشن شیرازی

میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (قبل)	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (بعد)	نمونه	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (قبل)	میانگین مقدار چگالی جذب نوری بیوفیلم در جدایه‌ها (بعد)	نمونه
(از تیمار)	(از تیمار)		(از تیمار)	(قبل از تیمار)	
۰/۰۳۲	۰/۱۲۵	E ₂₂	۰/۰۳۳	۰/۱۴۳	A ₁
۰/۰۳۲	۰/۱۴	E ₂₁	۰/۰۳۲	۰/۱۶۲	E ₂₅
۰/۰۳۴	۰/۲۰۲	B ₃₂	۰/۰۳۳	۰/۱۴	E ₂₃
۰/۰۳۲	۰/۱۲۷	A ₆	۰/۰۳۴	۰/۱۳۲	B ₃₃
۰/۰۳۳	۰/۱۲۰	D ₂₇	۰/۰۳۴	۰/۱۲۹	A ₅
۰/۰۳۳	۰/۲۲۷	D ₂₃	۰/۰۳۱	۰/۱۲۵	A ₁₁
۰/۰۳۲	۰/۳۵۲	A ₁₀	۰/۰۳۲	۰/۱۴	A ₈
۰/۰۳۳	۰/۱۴۶	D ₂₀	۰/۰۳۳	۰/۱۴۲	A ₇
۰/۰۳۳	۰/۱۱۹	A ₂	۰/۰۳۲	۰/۰۹۷	D ₂₆
۰/۰۳۳	۰/۱۴	H ₂₂	۰/۰۳۳	۰/۱۸۱	A ₃
۰/۰۳۲	۰/۱۱۸	B ₃₅	۰/۰۳۳	۰/۱۵۰	A ₁₃
۰/۰۳۴	۰/۱۲۴	D ₂₁	۰/۰۳۳	۰/۱۳۸	A ₄
۰/۰۳۱	۰/۱۲۷	E ₂₇	۰/۰۳۳	۰/۱۴	E ₂₆
۰/۰۳۳	۰/۱۳۷	H ₂₂	۰/۰۳۱	۰/۱۳	H ₂₄
۰/۰۳۲	۰/۱۳۵	A ₁₂	۰/۰۳۲	۰/۱۱۱	E ₂₄
۰/۰۶		B قبل	۰/۰۶۵		TSB قبل
۰/۰۳۴		B بعد	۰/۰۳۴		TSB بعد

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه ترکیبات اصلی اسانس شیرازی با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی گازی مشخص شدند و مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهنده اسانس، به ترتیب تیمول و کارواکرول با ۴۶/۶۲ و ۱۳/۸۵ درصد به دست 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 وارته‌های 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 دست آمده به مقدار قابل توجهی از مقدار میانگین گزارش شده آن بالاتر بوده و برعکس مقدار کارواکرول

توجه به نتایج جدول ۳ این کاهش بیوفیلیم در بهترین مقدار در مورد نمونه سالمونلای A₁₀، ۱۰/۶ برابر کمتر شده بود (از مقایسه چگالی دانسیته نوری) ملک اوغلی و همکاران وی در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۸، حساسیت آنتی‌بیوتیکی استافیلوکوکوس آرتوس، اشیریشیا کلای، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیغی‌موریوم را نسبت به اسانس‌های گیاهان دارویی مانند آویشن و زینان مورد بررسی قرار دادند (Malekoghli et al., 2019). در مطالعه ایشان، رشد باکتری‌های مورد بررسی به وسیله اسانس‌ها مهار شد. بیشترین حساسیت به اسانس‌ها به ترتیب مربوط به استافیلوکوکوس آرتوس، سالمونلا تیغی‌موریوم، اشیریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا بود. MIC اسانس آویشن برای استافیلوکوکوس آرتوس، سالمونلا، اشیریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۳۹، ۰/۷۸ و ۱/۵۶ و MBC آن به ترتیب 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 زینان 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 به خصوص 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 آنتی‌باکتریایی کمتری نسبت به اسانس به کار برده شده در تحقیق حاضر (میزان MIC و MBC ۰/۳۹ و ۱/۵۶) داشت (جدول ۲).

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 آنجایی که اسانس به دست آمده از آویشن شیرازی در روش به کار برده شده در این تحقیق دارای میزان بالایی از تیمول نسبت به میانگین گزارش شده در منابع علمی می‌باشد، لذا با وجود میزان کارواکرول کمتر، اسانس به دست آمده در مطالعه حاضر می‌تواند خواص ضد میکروبی بیشتری نسبت به اسانس‌های مشابه داشته باشد (Fazeli et al., 2007). به طور مشابهی، در تحقیقی که محبوبی و همکارانش انجام دادند گزارش کردند که خاصیت ضد میکروبی تیمول در گیاهان آویشن و مرنجوش از خواص ضد میکروبی کارواکرول موجود در آن بیشتر است (Mahboubi and Feizabadi, 2009).

بر اساس نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر، در جدایه‌های سالمونلا به ترتیب میزان MIC و MBC برای اسانس آویشن شیرازی در محدوده ۰/۳۹-۱۲/۵ و ۱/۱۲-۵۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و این اسانس در تمام جدایه‌های باکتری سالمونلا به طور معنی‌داری ($p < 0.001$) توانایی کاهش تولید بیوفیلیم را داشت، هر چند که در تمام ۲۶ نمونه باکتری سالمونلا همه باکتری‌ها قدرت ایجاد بیوفیلیم را داشتند. اما با

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 ضد میکروبی 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 به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد. لازم به ذکر است که در مطالعه حاضر، آویشن شیرازی به طور معنی‌داری ($p < 0/001$) 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 ناماسیویام 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

نتایج مشابه دیگری توسط باگامبولا و همکاران در سال ۲۰۰۴ در خصوص اثرات اسانس گیاه آویشن و ترکیبات کارواکرول و تیمول بر باکتری *شیگلا سوئی* (*Shigella sonnei*) و *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexneri*) به دست 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 آئوس*، *اشریشیا کلای*، *کلبسیلا* و *سالمونلا تیفی موریوم* 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، تأثیری بر مهار رشد *کلبسیلا*، *اشریشیا کلای* و *سالمونلا* نداشتند (Gorbani and Salman, 2018). نتایج مطالعه ایشان از نظر اثر مهارتی آویشن شیرازی بر باکتری‌های مختلف نظیر سالمونلا، با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی ندارد، زیرا که در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده نشان داد که اسانس آویشن به صورت معنی‌داری سبب مهار رشد و فعالیت باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* 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 میکروارگانیزم از جمله *استافیلوکوکوس آئوس*، *اشریشیا کلای* و *سالمونلا* ندارد. نتایج این پژوهش با نتایج به دست آمده 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

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

حرفه‌ای رشته دامپزشکی می‌باشد. نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر به جهت کمک و مساعدت در انجام تحقیق حاضر، قدردانی می‌نمایند.

سپاسگزاری

اطلاعات ارائه‌شده در این مقاله، برگرفته از نتایج پایان‌نامه با کد پژوهشی (۱۹۵۲۹۱۳۷۸۱۶۷۲۲۷۹۱۳۹۸۹۰۴۰۰) در رشته دکترای

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 Sabzaevan 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). Poultry carcass *Salmonella* infection at industrial slaughterhouse and the effect suspension-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]