

ارزیابی مقایسه‌ای فعالیت ضدباکتریایی اسانس گیاهان شوید (*Anethum graveolens L.*) و آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم (ATCC=14028)

نازیلا اسلامی^۱، یونس انزابی^{۲*}، میرعلیرضا نورآذر^۳

چکیده

سالمونلوزیس یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام بوده که دارای گستردگی جهانی است. در سال‌های اخیر با شیوع مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، تمایل به استفاده از گیاهان دارویی برای کنترل میکروارگانیسم‌ها افزایش یافته است. هدف از تحقیق تجربی حاضر، بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان آویشن باغی و شوید بر سویه استاندارد باکتری سالمونلا تایفی موریوم (ATCC=14028) بود. اسانس گیاهان مذکور به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر استخراج گردید و ماده موثره آنها با روش کروماتوگرافی گازی/تلف سنجی جرمی (GC-MS) مشخص شد. در ادامه با استفاده از روش میکروداپلوشن برات، حداقل غلظت مهارکنندگی، حداقل غلظت کشندگی و همچنین براساس روش انتشار چاهک در آگار، حساسیت یا مقاومت دارویی باکتری مذکور نسبت به اسانس‌های بدست آمده به تنهایی و بصورت مخلوط با هم و نیز نسبت به ۳ آنتی‌بیوتیک رایج در دامپزشکی شامل اریترومیسین، اکسی‌تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین، تعیین شد. تجزیه و تحلیل GC-MS اسانس آویشن باغی و شوید به ترتیب وجود ۱۲ و ۱۱ ترکیب شیمیایی را نشان داد. بر طبق یافته‌ها، حداقل غلظت مهارکنندگی برای اسانس آویشن باغی ۰/۲۵، مخلوط اسانس‌های گیاهان آویشن باغی و شوید ۰/۵۰، داکسی‌سایکلین ۰/۰۰۷۸ و اکسی‌تتراسایکلین، ۰/۰۰۱۹۵ < میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. حداقل غلظت کشندگی ترکیبات مذکور نیز به ترتیب ۰/۲۵، ۰/۵۰، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۰۱۹۵ < میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. بیشترین حساسیت هم نسبت به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین با قطر منطقه ممناعت از رشد ۲۷ میلی‌متر و بیشترین مقاومت هم نسبت به اسانس آویشن باغی با قطر منطقه ممناعت از رشد ۱۰ میلی‌متر، ثبت شد. همچنین اسانس شوید و آنتی‌بیوتیک اریترومیسین، در هیچ‌یک از آزمایشات انجام گرفته، اثر ضدباکتریایی بر علیه باکتری مورد آزمایش نشان ندادند. به نظر می‌رسد که اسانس آویشن باغی برخلاف اسانس شوید، تاثیر ضدباکتریایی قابل توجه و

کاربردی بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: سالمونلا تایفی موریوم، شوید، آویشن، فعالیت ضدباکتریایی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۹

مقدمه

مسمومیت غذایی ناشی از عوامل بیماری‌زا یکی از مسائل مهم بهداشت عمومی در سراسر جهان است و کشورها منابع زیادی را برای غلبه بر آن صرف می‌کنند. عفونت‌های غذایی منبع نگرانی برای کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (۱). دسترسی به غذای ایمن و مغذی نه تنها کلید حفظ زندگی و ارتقای سلامت است، بلکه همچنین با حمایت از اقتصادهای ملی، توسعه پایدار را پشتیبانی می‌کند. ایمنی غذا بر همه افراد در سراسر جهان تأثیر می‌گذارد و در آینده قابل پیش بینی یک چالش جهانی برای سلامت انسان باقی خواهد ماند که مستلزم تشخیص سریع، حساس، کارآمد و ارزان آلاینده‌های مواد غذایی است (۲). به دلیل ماهیت پیشرفته سیستم پزشکی، شیوع بیماری‌های ناشی از مواد غذایی در مقیاس بزرگ، امروزه به ندرت دیده می‌شود. با این حال، شیوع‌های کوچک و موضعی در مناطق خاص هنوز وجود دارد و اگر اقدامات ریشه کنی آغاز

۱- دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
anzabi@iaut.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

بیش از ۶۰ نوع ترکیب داشته باشند و ترکیبات اصلی ممکن است تا ۸۵ درصد اسانس را تشکیل دهند، اما گزارشات نشان می‌دهند که به طور عمده ترکیبات فنلی مسئول خواص ضد میکروبی اغلب اسانس‌های گیاهی هستند. البته نتیجه بعضی از بررسی‌ها نشانگر این موضوع است که اثرات ضدباکتریایی اسانس‌ها به صورت کامل، نسبت به اثرات تک تک اجزاء آن، بیشتر است. اسانس‌ها با داشتن خاصیت آبگریزی، موجب نفوذ در لیبید غشایی سلول باکتری‌ها شده و متعاقباً منجر به خارج شدن یون‌ها و محتویات سلولی از آن می‌شوند و خروج این مواد از سلول، با ایجاد اختلال در عملکرد سلولی، باعث مرگ آن‌ها می‌شود (۶). آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) جزء خانواده نعناعیان (لامیاسه) بوده و از گیاهان بومی ایران می‌باشد که به طور سنتی به عنوان افزودنی و چاشنی، غالباً به انواع مواد غذایی اضافه می‌شود (۶). اندام دارویی این گیاه، برگ و گل‌های آن است و از ترکیبات اصلی موجود در اسانس این گیاه، کارواکرول، تیمول، لینالول و پاراسیمن بوده که اثرات ضد میکروبی آن‌ها قبلاً به اثبات رسیده است (۷). اسانس این گیاه به دلیل داشتن ترکیبات مونوترپنی فنلی، یکی از موثرترین اسانس‌های گیاهی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی به شمار می‌رود. تیمول یکی از مهم‌ترین ترکیبات مونوترپنی اکسیژنه با خاصیت ضدباکتریایی، ضدقارچی و جلوگیری کننده از رشد و تولید مایکوتوکسین است که در اسانس آویشن و تعداد زیادی از گیاهان یافت می‌شود (۷، ۸). از دیگر گیاهانی که به عنوان داروی گیاهی از آن استفاده می‌شود شوید است. گیاه شوید (*Anethum graveolens*) متعلق به خانواده آمبلیفرا بوده و بومی جنوب اروپاست. این گیاه یک ساله که در منطقه مدیترانه، آسیای مرکزی و جنوبی هم رشد می‌کند، اکنون به طور گسترده در سراسر جهان کشت داده می‌شود. در حال حاضر، شوید غالباً به عنوان یک گیاه

نشود، می‌تواند تهدیدی بزرگ برای سلامت عمومی باشد (۳). سالمونلا یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های غذایی در سراسر جهان است. آگاهی از اینکه تعداد بسیار کم سلول‌های سالمونلا می‌تواند عفونی باشد، بر نیاز به اقدامات سختگیرانه ایمنی مواد غذایی تاکید می‌کند (۳). باکتری سالمونلا تایفی موریوم (*Salmonella Typhimurium*)، باسیلی گرم منفی، هوازی و بی‌هوازی اختیاری، به ابعاد ۰/۵ در ۳ میکرون، فاقد اسپور، متحرک و دارای تاژک پری‌تریش بوده و از شایع‌ترین عوامل باکتریایی در عفونت‌های مزمن و حاد گوارشی، به عنوان رایج‌ترین عامل سالمونلوزیس به شمار می‌رود. تغییر فلور میکروبی روده‌ای بدن با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، میزبان را بیشتر در معرض عفونت‌های سالمونلائی قرار داده و بدن را مستعد ابتلا به انواع بیماری‌های روده‌ای از جمله اسهال می‌نماید. بنابراین با وجود افزایش روز افزون تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید، مقاوم شدن باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به مشکل بزرگ جهانی تبدیل شده است (۴). از این رو محققان به سمت جایگزین‌های گیاهی روی آورده‌اند که ضمن دارا بودن اثرات ضدباکتریایی، فاقد عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی هستند. لذا امروزه نسبت تعداد داروهای گیاهی مورد استفاده در درمان بیماری‌ها در مقایسه با تعداد کل داروهای رسمی در جهان در حال فزونی است. این نسبت در کشورهایی همچون چین و هند با حدود بیش از ۷۰ درصد در بالاترین مقدار و در کشورهای همچون ایالات متحده با حدود ۲۰ درصد در حد نسبتاً پایینی قرار دارد. در این راستا بعضی از اسانس‌های گیاهی به عنوان عوامل مهم ضد میکروبی طبیعی گزارش شده‌اند (۵).

اسانس‌ها مایعات روغنی معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان نظیر دانه، ریشه، جوانه، پوست، شاخه، برگ، غنچه و گل بدست می‌آیند. اسانس‌ها می‌توانند تا

اضافه می‌شد. عملیات اسانس‌گیری حدود ۳ ساعت به طول انجامیده و در نهایت اسانس خالص هر گیاه توسط قیف دکانتور جمع‌آوری و به طور جداگانه در داخل شیشه سربسته ریخته شده و تا زمان انجام آزمایشات مورد نظر، در یخچال ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی / طیف سنجی جرمی (GC/MS)

نمونه اسانس آویشن و شوید با استفاده از پروتکل راهنما (۱۱) با دستگاه GC-MS (گاز کروماتوگرافی (B7۸۹۰، Agilent، ایالات متحده)، طیف سنج جرمی (A۵۸۷۷، Agilent، USA)) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این ابزار مجهز به آنژکتور اسپلیت/بدون شکاف بود. برای تجزیه و تحلیل ترکیبات مورد نظر ستون HP5-MS 60 متر و ضخامت فیلم ۰,۲۵ میکرومتر با قطر داخلی ۰,۲۵ میلی متر استفاده شده است. دمای محل تزریق، دمای رابط و دمای محل یونیزاسیون به ترتیب ۲۵۰، ۲۷۰ و ۲۳۰ درجه سانتی گراد است. برنامه دمایی ستون با دمای اولیه ۵۰ درجه سانتیگراد شروع می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در این دما ننگه داشته می‌شود سپس دمای ستون با گرادیان ۱۰ دقیقه به ۱۵۰ درجه سانتیگراد رسیده و در این دما ثابت می‌ماند. به مدت ۲ دقیقه و در نهایت با شیب ۲۰ درجه سانتی گراد به دمای ۲۸۰ درجه سانتی گراد در دقیقه رسید و به مدت ۵ دقیقه در این دما باقی ماند و نسبت تقسیم ۱ به ۵ و حجم تزریق ۰,۵ میکرولیتر بود. اجزای روغن جدا شدند و کروماتوگرام به دست آمده با مقایسه طیف جرمی با طیف های موجود در کتابخانه های موسسه ملی استاندارد و فناوری (NIST) شناسایی شد.

آنتی بیوتیک‌های مورد نظر و نحوه آماده‌سازی آن‌ها برای

تحقیق

و ادویه معطر سنتی پرطرفدار استفاده می‌شود (۹). سابقه استفاده از گیاه مذکور بسیار طولانی بوده و به بیش از ۵۰۰۰ سال می‌رسد. مطالعات قبلی نشان داده که شوید اثرات ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد درد، محافظتی و ضد ترشح معده، اثر شل‌کنندگی عضلات صاف، افزایش چربی خون، افزایش غلظت پروژسترون و بسیاری اثرات دیگر را القا می‌کند (۱۰).

با توجه به اینکه برای کاربردی کردن مصرف اسانس‌های گیاهی در طب مکمل، ابتدا بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها در ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا در محیط آزمایشگاهی ضرورت دارد، لذا هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاهان آویشن باغی و شوید بر یک سویه استاندارد سالمونلا تایفی موریوم (ATCC=14028) در مقایسه با ۳ آنتی بیوتیک رایج در رشته دامپزشکی شامل اریترومايسين، اکسی‌تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) بود.

مواد و روش کار

مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر، در بازه زمانی شش ماهه دوم سال ۱۴۰۰، در دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز انجام گرفته است.

تهیه اسانس از گیاهان مورد آزمایش

بدین منظور ابتدا برگ خشک شده گیاه آویشن باغی از یکی از عطاری‌های شهر تبریز خریداری شد. گیاه شوید نیز از بازار تره‌بار شهر تبریز تهیه و در سایه خشک گردید. با مراجعه به هرباریوم دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، هویت علمی گیاهان تهیه شده، تأیید گردید. سپس استخراج اسانس گیاهان فوق‌الذکر به روش تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلونجر انجام شد. بدین ترتیب که ۶۰ گرم از برگ خشک شده هر گیاه به یک بالن منتقل شده و سپس مقدار ۳۰۰ میلی‌لیتر نیز آب مقطر (به نسبت ۱ به ۵) در بالن دیگری

کدورت معادل کدورت لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک-فارلند، تهیه شد (۱۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد

حداقل غلظت بازدارندگی از رشد اسانس‌های تهیه شده و آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، به روش میکرورقیق‌سازی مایع و با استفاده از میکروپلیت ۹۶ چاهکی تعیین شد (۱۲). بدین منظور برای سنجش MIC هر یک از ترکیبات ذکر شده، ابتدا در هر چاهک یکی از ردیف‌ها بطور جداگانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هیتون‌براث (مرک-آلمان) را اضافه نموده، سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده با رقت ۰/۵ مک فارلند، به همه چاهک‌ها اضافه می‌شد. در ادامه به هر کدام از چاهک‌های شماره ۱ تا شماره ۱۰، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی (Serial two-fold dilutions) از اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش (معادل ۰/۱۹۵ الی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه می‌گردید. لازم به ذکر است که چاهک شماره ۱۱ فقط حاوی محیط کشت مولر هیتون‌براث به اضافه سوسپانسیون باکتریایی، به عنوان کنترل منفی و چاهک شماره ۱۲ حاوی محیط کشت مذکور به اضافه اسانس‌ها و یا آنتی‌بیوتیک‌ها (بسته به مورد)، به عنوان کنترل مثبت، با حجم نهائی مشابه حجم نهائی دیگر چاهک‌ها، در نظر گرفته می‌شد. در نهایت پس از مخلوط کردن یکنواخت محتویات همه چاهک‌ها توسط شیکر، میکروپلیت به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده می‌شد. پس از طی مدت مذکور، محتویات چاهک‌ها از نظر وجود یا عدم وجود کدورت مورد بررسی قرار می‌گرفتند. رقت چاهکی که حاوی کمترین غلظت (بالاترین رقت) از اسانس یا آنتی‌بیوتیک مورد آزمایش بوده و باعث جلوگیری از رشد باکتری شده بود (مشاهده عدم ایجاد کدورت)، به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد باکتری مورد آزمایش

آنتی‌بیوتیک‌های داکسی‌سایکلین (Vibramycin®)، به‌شاد (دارو، ایران) با میزان ماده موثره ۱۰۰ میلی‌گرم/گرم و اریترومایسین (Peditamycin®)، داروسازی اکسیر، ایران) با میزان ماده موثره ۴۰۰ میلی‌گرم/گرم از یک داروخانه انسانی و آنتی‌بیوتیک اکسی‌تراسایکلین (Terramycin®)، رویان دارو، ایران) با میزان ماده موثره ۲۰۰ میلی‌گرم/گرم از یک داروخانه دامپزشکی در سطح شهر تبریز تهیه شدند. برای تهیه سوسپانسیون از آنتی‌بیوتیک‌ها، پس از تهیه پودر از آن‌ها بوسیله هاون، مقدار یک گرم از هر آنتی‌بیوتیک را داخل ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و محلولی یکنواخت تهیه می‌کردیم.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی

باکتری سالمونلا تائیفی مورویوم (ATCC=14028) از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (تهران-ایران) تهیه شد. در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشکده دامپزشکی، برای احیای باکتری فوق، ابتدا از کرایوبانک یک ساچمه آغشته به محلول باکتری مورد نظر را برداشته و در ۳ میلی‌لیتر محیط کشت آبگوشت عصاره قلب و مغز (مرک-آلمان) تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری می‌نمودیم تا باکتری مورد نظر احیاء شده و تکثیر یابد. در ادامه، به منظور به‌دست آوردن کلنی‌های خالص از باکتری مذکور، پس از سانتی‌فیوژ کردن محتویات محیط کشت فوق به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه (دستگاه سانتی‌فیوژ ۱۶ شاخه مدل HB190، بهداد، ایران)، از رسوب حاصله به مقدار کافی (معادل محتویات یک لوپ پر) برداشته و بر روی محیط جامد عصاره قلب و مغز (مرک-آلمان) کشت داده و باز هم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری کردیم. سپس، از کلنی‌های حاصله به مقدار لازم برداشته و با مشاهده مستقیم چشمی، سوسپانسیونی با

توسط ترکیب مورد نظر (MIC)، ثبت شد (۱۲). همچنین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ترکیب دو اسانس مورد آزمایش به صورت مخلوط مساوی با یکدیگر هم به روش ذکر شده در بالا، مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش، از غلظت‌های معادل MIC هر یک از ترکیبات مورد آزمایش در مرحله قبل و نیز غلظت‌های کمتر و بیشتر از غلظت مربوط به MIC ترکیبات مورد آزمایش، استفاده شد. بدین منظور در شرایط کاملاً استریل و در نزدیکی شعله به مقدار کافی از غلظت‌های مدنظر ذکر شده را بوسیله آنس برداشته و بر روی محیط کشت جامد عصاره قلب و مغز به صورت نقطه‌ای کشت می‌دادیم. در ادامه پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، بالاترین رقتی از ترکیب مورد آزمایش (کمترین غلظت) که منجر به عدم رشد باکتری مورد نظر می‌شد، به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی هر یک از ترکیبات مورد آزمایش، در نظر گرفته می‌شد (۱۲).

تعیین اثر ضدباکتریایی ترکیبات مورد آزمایش به روش

انتشار محتویات چاهک در آگار

برای تعیین مقاومت و یا حساسیت باکتری مورد آزمایش نسبت به ترکیبات مورد نظر در تحقیق حاضر (همان اسانس‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در مرحله قبل)، از روش انتشار محتویات چاهک در آگار استفاده شد. بدین منظور ابتدا محیط مولر هینتون آگار (مرک-آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده آماده می‌گردید. سپس تحت شرایط استریل چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر و به عمق ۰/۵ سانتی‌متر در سطح محیط کشت مذکور ایجاد می‌شد. در ادامه با استفاده از سوسپانسیون میکروبی مربوط به

کشت جوان (کشت جدید ۲۴ ساعته) از باکتری سالمونلا تایفی موریوم (ATCC=14028) که کدورتی معادل کدورت لوله شماره ۰/۵ استاندارد مک‌فارلند داشت، کشت یکنواخت در سطح محیط کشت مذکور انجام می‌گردید. در ادامه توسط سرسمپلر استریل، در هر چاهک ایجاد شده، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از اسانس آویشن و محلول تهیه شده از آنتی‌بیوتیک‌های داکسی‌سایکلین و اکسی‌تتراسایکلین که غلظتی معادل غلظت MIC مربوط به هر یک از ترکیبات مورد آزمایش در مرحله قبل داشتند، تلقیح می‌شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و در نهایت منطقه عدم رشد باکتری بر روی پلیت در اطراف هر یک از چاهک‌ها، بطور جداگانه و بوسیله کولیس اندازه‌گیری و ثبت می‌شد (۱۲). لازم به ذکر است که با توجه به عدم مشاهده خاصیت ضد میکروبی از اسانس شوید و آنتی‌بیوتیک اریترومايسين در آزمایشات تعیین MIC و MBC، ترکیبات مذکور، در این مرحله از آزمایش شرکت داده نشدند.

آنالیز آماری

در پژوهش حاضر، جهت بررسی و مقایسه تفاوت‌های مشاهده شده در میزان MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌ها و اسانس‌ها از آمار توصیفی و نیز برای یافتن ارتباط بین میانگین قطر مناطق عدم رشد اسانس و آنتی‌بیوتیک‌ها، از آزمون آماری پس‌اوریانس دانکن در دامنه معنی‌داری $p\text{-value} < 0/001$ استفاده گردید.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها، اسانس آویشن باغی شامل ۱۲ ماده مختلف بود. بیشترین ترکیب شناسایی شده (۲۲٪) آن Tymol شناسایی شد. سایر ترکیبات این اسانس در جدول ۱ نشان داده شده است. اسانس شوید دارای ۱۱ ترکیب بود که Apiol با

جدول ۱- ترکیبات موجود در اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)

زمان نگهداری (R.T)	مقدار (%)	ترکیبات اصلی
۶/۹۸۹	۲۲/۰	Tymol
۷/۱۸۸	۹/۰	carvacrol
۷/۴۷۹	۷/۶۵	m-Thymol
۸/۱۱۴	۱۰/۰	p-Cymene
۸/۱۶۴	۵/۰	gamma.-Terpinene
۸/۳۲۹	۴/۱۵	Benzene, 2-methoxy-1-methyl-4-(1-methylethyl
۸/۴۳۱	۳/۶۷	Caryophyllene oxide
۸/۵۲۴	۰/۶	Camphene
۸/۷۱۸	۰/۶	Endo-borneol
۹/۰۰۱	۱/۴۵	Eucalyptol
۹/۲۷۲	۵/۱۵	3-Carene
۹/۳۱	۴/۰۵	Caryophyllene

جدول ۲- ترکیبات موجود در اسانس شوید (*Anethum graveolens*)

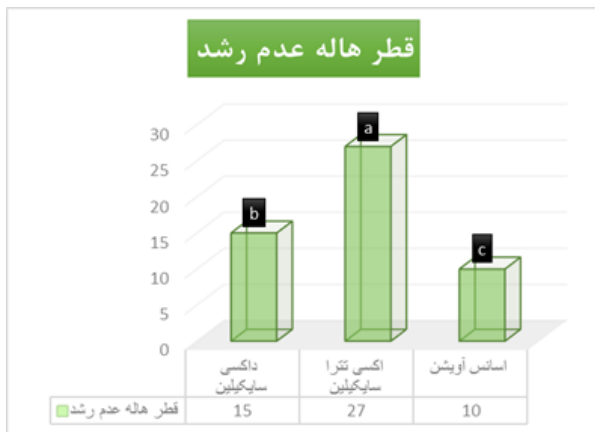
زمان نگهداری	مقدار (برحسب درصد)	ترکیبات اصلی
۱۰/۱۱۹	۱۲/۲۵	alpha.-Phellandrene
۱۰/۱۸۹	۵/۱۵	Bicyclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-methyl-1-(1-methylethyl
۱۰/۴۳	۳/۷۵	o-Cymene
۱۰/۴۹	۵/۴۵	m-Cymene
۱۰/۶۰۲	۳/۴	α-thujene(-)
۱۴/۱۵۸	۲/۹۵	trans-Sabinol
۱۶/۴۶۷	۵/۳	beta-Thujene
۱۷/۷۷۷	۲/۱۰	1,4-dihydroxy-p-menth-2-ene
۱۹/۵۵۲	۲/۲۵	Cyclohexanone, 2-(3-(oxobutyl
۱۵/۸۸۸	۱۷/۸۸	Apiol
۸/۹۵۵	۵/۶۵	Cyclohexene, 2-ethenyl-1,3,3-trimethyl

جدول ۳- نتایج حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس گیاهان شوید، آویشن باغی و مخلوط اسانس دو گیاه در مقایسه با ۳ آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و اریترومایسین بر روی باکتری سالمونلاتایفی موریوم

ترکیب مورد آزمایش	حداقل غلظت ممانعت از رشد (MIC)	حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC)
اسانس آویشن	۰/۲۵	۰/۲۵
اسانس شوید	صفر	صفر
مخلوط اسانس دو گیاه	۰/۵۰	۰/۵۰
آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین	۰/۰۰۷۸	۰/۰۱۵۶
آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین	<۰/۰۰۱۹۵	<۰/۰۰۱۹۵
آنتی‌بیوتیک اریترومایسین	صفر	صفر

جدول ۴- الگوی مقاومتی باکتری استاندارد سالمونلاتایفی موریوم بر مبنای قطر منطقه عدم رشد (mean±SD) برحسب میلی‌متر

ترکیب مورد آزمایش	آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین	آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین	اسانس آویشن
میانگین قطر هاله عدم رشد	۱۵±۰/۲	۲۷±۰/۱	۱۰±۰/۱
الگوی مقاومتی مشاهده شده	نسبتاً حساس	بسیار حساس	بسیار حساس



نمودار ۱- فعالیت ضدباکتریایی اسانس برگ گیاه آویشن در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های داکسی‌سایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بر سالمونلاتایفی موریوم. حروف غیرمشترک نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشد.

باکتریائی نشان داده‌بودند، کاملاً با یکدیگر متفاوت هستند، به طوری‌که اسانس آویشن نسبت به داکسی‌سایکلین و داکسی‌سایکلین هم نسبت به اکسی‌تتراسایکلین، قطر منطقه

۱۷,۸۸٪ بیشترین ترکیب شیمیایی جدا شده از اسانس را به خود اختصاص داد. سایر ترکیبات بدست آمده در جدول ۲ ارائه شده است. مقدار حداقل غلظت مهارکنندگی از رشد و نیز حداقل غلظت باکتری‌کشی اسانس‌های مورد آزمایش به تنهایی و توأم با هم، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۳، قابل مشاهده می‌باشد. مشاهده می‌شود که از بین اسانس آبی دو گیاه مورد آزمایش، اسانس شوید هیچ تاثیری بر سویه مورد آزمایش باکتری سالمونلاتایفی موریوم در تحقیق حاضر نداشت، اما اسانس آویشن باغی باعث مهار رشد و کشته شدن باکتری مذکور شده و جالب اینکه مخلوط کردن اسانس دو گیاه به مقدار مساوی، باعث کاهش تاثیر ضد میکروبی نسبت به توانائی ضدباکتریائی اسانس آویشن باغی به تنهایی، گردید.

از طرف دیگر با استفاده از آزمون پساواریانس دانکن هم مشخص گردید که میانگین قطر منطقه عدم رشد در خصوص ۳ ترکیب مورد مطالعه که در آزمون‌های تعیین MIC و MBC مطابق جدول شماره ۱، خاصیت ضد

در بررسی تحقیقات مشابه انجام گرفته، مشاهده می‌شود که رواگمنارت و همکاران در سال ۲۰۱۵، فعالیت ضدباکتریایی اسانس شوید استخراج شده با استفاده از تقطیر بخار آب را بر علیه باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه، سالمونلاتایفی موریوم / استافیلوکوکوس اورئوس، با حداقل غلظت مهاری ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۱۵). در تحقیقی دیگر نیز محمد و همکاران در سال ۱۳۹۲، اثر ضد میکروبی اسانس دانه شوید بر علیه باکتری‌های لیستریا مونوسیترنر، استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، اشرشیا کولای و سالمونلاتایفی موریوم را گزارش داده‌اند (۱۶). اما بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر که در جدول شماره ۱ ثبت شده، مشاهده می‌گردد که هیچ کدام از گزارشات ارائه شده در بالا، با یافته‌های تحقیق حاضر مطابقت ندارد، چرا که اسانس شوید مورد آزمایش در پژوهش ما، فاقد اثر مهاری بر باکتری سالمونلاتایفی موریوم بود. اما هم راستا با مطالعه حاضر، برومند و همکاران در سال ۲۰۰۸، به بررسی خاصیت ضد میکروبی اسانس بذر-های شوید و گشنیز بر روی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولای و سالمونلاتایفی موریوم با استفاده از آزمایش میکرو رقت در مایع پرداختند که نتایج مطالعه آنها هم نشان داده که استافیلوکوکوس اورئوس حساس‌ترین و سالمونلاتایفی موریوم مقاوم‌ترین باکتری‌ها نسبت به هر دو اسانس بوده‌اند. در نتیجه اسانس بذر شوید، در تحقیق مذکور هم اثر مهاری بر باکتری سالمونلاتایفی موریوم نداشته‌است (۱۷). در این ارتباط، گزارش شده که ممکن است اسانس یا عصاره یک گیاه دارویی بر یک میکروارگانیسم اثر قابل توجهی داشته باشد ولی بر میکروارگانیسم دیگری دارای اثر کمتر یا بدون تاثیر باشد. البته باید توجه داشت که عوامل مختلفی مانند غلظت مناسب ممانعت از رشد، روش و حلال به کار برده شده جهت عصاره‌گیری و محیط کشت مورد استفاده جهت

عدم رشد کوچکتری را ایجاد کردند (جدول ۴) و مشخص شد که بین ۳ ترکیب مورد مطالعه، تفاوت آماری بسیار معنی‌داری ($p\text{-value} < 0/001$) از نظر قطر منطقه عدم رشد باکتری مورد آزمایش، وجود دارد (نمودار ۱). لازم به ذکر است که برای بررسی الگوی مقاومتی آنتی‌بیوتیک‌ها از جدول CLSI (۱۳) و برای بررسی الگوی مقاومتی اسانس آویشن، از جدول تفسیر آزمایشات حساسیت عصاره‌های گیاهی (۱۴) استفاده شده‌است.

بحث

در این پژوهش، اثرات نرولیدول بر پلاک‌های آمیلویدی و در تحقیق حاضر، ۱۲ ترکیب مختلف برای اسانس آویشن باغی (جدول ۱) و ۱۱ ترکیب مختلف برای اسانس شوید (جدول ۲) شناسایی شد. همچنین حداقل غلظت مهار از رشد (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس گیاهان آویشن، شوید، همچنین مخلوط اسانس دو گیاه و نیز آنتی‌بیوتیک‌های اریترومايسين، داکسی‌سایکلین و اکسی‌تتراسایکلین، در مورد باکتری سالمونلاتایفی موریوم به روش میکرو دایلوژن برات محاسبه و مشخص گردید که اسانس شوید و نیز آنتی‌بیوتیک اریترومايسين هیچگونه اثر مهاری و کشندگی بر باکتری مذکور نداشتند. اما میزان MIC و MBC اسانس آویشن برابر با ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و میزان MIC و MBC مخلوط اسانس دو گیاه، ۰/۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمد (جدول ۳). همچنین برای آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین، میزان MIC برابر ۰/۰۰۷۸ و مقدار MBC هم ۰/۰۱۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر حاصل شد. مقدار MIC و MBC آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین نیز با هم برابر بوده و معادل $< 0/00195$ میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه گردید (جدول ۳).

مشاهده شده در مورد میزان MIC و MBC اسانس آویشن در تحقیقات بالا را می‌توان به اختلاف در ترکیب شیمیایی اسانس‌ها به علت تفاوت در محل رویش گیاه و فصل برداشت آن، روش استخراج اسانس و همچنین نوع و سویه میکروارگانیسم و روش تعیین اثر ضد میکروبی مرتبط دانست (۱۸).

از طرف دیگر در آزمایش سنجش حساسیت یا مقاومت باکتری مورد آزمایش، قطر منطقه عدم رشد باکتری توسط اسانس آویشن، ۱۰ میلی‌متر، توسط آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین، ۱۵ میلی‌متر و توسط آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، ۲۷ میلی‌متر بدست آمد (جدول ۱). شرافتی چالشتی هم در سال ۱۳۹۶، میانگین قطر منطقه ممانعت از رشد توسط آویشن در مقابل سالمونلاهای جدا شده از همبرگر را، ۲۳/۶۷ میلی‌متر گزارش کرده (۲۲) که بسیار بیشتر از نتیجه به‌دست آمده در پژوهش حاضر (۱۰ میلی‌متر) می‌باشد. همچنین در پژوهشی در سال ۱۳۸۶، شهنازی و همکاران، گزارش کردند که اسانس آویشن تالشی در غلظت ۱ میکرولیتر باعث ایجاد منطقه عدم رشدی به میزان ۱۸ میلی‌متر در مورد باکتری سالمونلا تایفی شده- است (۲۳) که ملاحظه می‌شود، باز هم به مراتب بیشتر از نتیجه به‌دست آمده در تحقیق حاضر می‌باشد که معادل ۱۰ میلی‌متر بود (جدول ۳). به نظر می‌رسد که اختلافات مشاهده شده در اندازه قطر منطقه عدم رشد در گزارشات ارائه شده نسبت به تحقیق حاضر را می‌توان به اختلاف در محیط‌های کشت مورد استفاده و اختلاف در غلظت‌های انتخاب شده برای آزمون آنتی‌بیوگرام، نسبت داد (۱۸). از طرف دیگر در خصوص مقاومت آنتی‌بیوتیکی سالمونلاها هم تحقیقات متعددی صورت گرفته‌است. همانطور که بیان شد در تحقیق حاضر، میانگین قطر منطقه عدم رشد در قبال آنتی‌بیوتیک‌های داکسی‌سایکلین و اکسی‌تتراسایکلین به ترتیب برابر ۱۵ و ۲۷ میلی‌متر بوده‌است (جدول ۱). گیبهو

انجام آزمایشات ضد میکروبی نیز، می‌تواند نتیجه حاصله از این گونه آزمایشات را تحت تاثیر قرار دهند (۱۸).

اثرات ضد میکروبی گیاه آویشن باغی هم بر روی عوامل مختلف بیماریزا مورد بررسی محققان قرار گرفته که حاصل کار آن‌ها نیز منجر به نتایج متفاوتی شده‌است. گویلین و همکاران در سال ۲۰۲۱، نشان دادند که اسانس آویشن اثر آنتی‌بیوفیلمی بر باکتری سالمونلا تایفی موریوم با MIC معادل ۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و درصد مهار از رشد بالاتر از ۶۰ درصد را دارد (۱۹). همچنین در تحقیقی، صفاری‌سامانی و همکاران در سال ۱۳۹۹، به بررسی فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن بر تعدادی از باکتری‌های بیماریزای گرم مثبت و گرم منفی پرداختند که در مطالعه مذکور، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) اسانس آویشن شیرازی بر سالمونلا تایفی موریوم، ۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شده که با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت دارد. البته حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) اسانس مذکور نیز برای تمام باکتری‌های بیماریزای مورد آزمایش، ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است که بیشتر از مقدار بدست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد (۲۰). مصطفی و همکاران در سال ۲۰۱۸، فعالیت ضد میکروبی ۵ عصاره گیاهی از جمله عصاره گیاه آویشن را در برابر باسیلوس سرئوس، استفیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکولای، سودوموناس- آئروژینوزا و سالمونلا تایفی با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار، مورد بررسی قرار داده و حداقل غلظت مهاری اسانس آویشن را برای تمام باکتری‌های آزمایش شده را ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، گزارش کردند (۲۱). در مطالعه- ای هم شرافتی چالشتی و همکاران در سال ۱۳۹۶، بیشترین اثر مهاری بر ایزوله‌های سالمونلای جدا شده از همبرگر را توسط آویشن به ترتیب با حداقل غلظت بازدارندگی ۰/۳۹ و حداقل غلظت کشندگی ۰/۷۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گزارش کردند (۲۲). به نظر می‌رسد که اختلاف

سپاسگزاری

با توجه به اینکه اطلاعات مقاله حاضر، برگرفته از یافته‌های پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه می‌باشد، لذا بدینوسیله از مسئولین و کارشناسان دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تبریز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تقدیر و تشکر می‌گردد.

فهرست منابع

1. Humphrey T. Salmonella, stress responses and food safety. *Nature Reviews Microbiology*. 2004;2(6):504-9.
2. Griesche C, Baeumner AJ. Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2020;128:115906.
3. Awang MS, Bustami Y, Hamzah HH, Zambray NS, Najib MA, Khalid MF, et al. Advancement in Salmonella Detection Methods: From Conventional to Electrochemical-Based Sensing Detection. *Biosensors*. 2021;11(9).
4. Rakitin AL, Yushina YK, Zaiko EV, Bataeva DS, Kuznetsova OA, Semenova AA, et al. Evaluation of Antibiotic Resistance of Salmonella Serotypes and Whole-Genome Sequencing of Multiresistant Strains Isolated from Food Products in Russia. *Antibiotics*. 2021;11(1):1.
5. Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*. 2012;45(2):722-34.
6. Eftekhar F, Zamani S, Yousefzadi M, Hadian J, Nezhadebrahimi S. Antibacterial activity of Zataria multiflora Boiss essential oil against extended spectrum β lactamase produced by urinary isolates of Klebsiella pneumonia. 2011.
7. Tiwari BK, Valdramidis VP, O'Donnell CP, Muthukumarappan K, Bourke P, Cullen P. Application of natural antimicrobials for

هم در سال ۲۰۲۰، میانگین قطر منطقه عدم رشد باکتری سالمونلا را در مقابل آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین، ۹-۱۵ میلی‌متر گزارش کرده‌است (۲۴). لانچنکو و همکاران نیز در سال ۲۰۲۰، میانگین قطر منطقه عدم رشد باکتری سالمونلا تاغی را نسبت به آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین ۲۰/۵ میلی‌متر گزارش داده‌اند (۲۵). همچنین حبیبی و همکاران در سال ۲۰۱۸، میانگین قطر منطقه عدم رشد باکتری سالمونلا در مقابل آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین را، ۲۰ میلی‌متر اعلام کرده‌اند (۲۶). چند هم در سال ۲۰۱۳، میانگین قطر منطقه ممانعت از رشد باکتری سالمونلا را نسبت به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، ۲۸ میلی‌متر گزارش کرده‌است (۲۷). به نظر می‌رسد که علت وجود تفاوت در میزان مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی ثبت شده در تحقیق حاضر و سایر مطالعات مشابه، می‌تواند به دلیل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و پدیده انتقال ژنتیکی مقاومت‌های دارویی بین باکتری‌ها باشد (۲۸).

در مطالعه حاضر خاصیت ضد باکتریایی اسانس گیاهان آویشن و شوید در مقایسه با ۳ آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در پروتکل‌های درمانی سالمونلوزیس مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد که اسانس آویشن به تنهایی دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد، فلذا می‌تواند به عنوان ترکیبی مکمل در درمان سالمونلوزیس پیشنهاد گردد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر و محدودیت‌های روز افزون در استفاده از مواد شیمیایی ضد میکروبی، نظیر عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، نیاز به جایگزینی این مواد با مواد طبیعی و اسانس‌های گیاهی احساس می‌شود که این مسئله می‌تواند زمینه‌ساز مطالعات وسیع‌تر برای جایگزینی مواد فوق در جهت حفظ سلامت مواد غذایی و کنترل بیماری‌های انسانی و حیوانات اهلی باشد.

- food preservation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(14):5987-6000.
8. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. *Food microbiology*. 2001;18(4):463-70.
 9. Ishikawa T, Kudo M, Kitajima J. Water-soluble constituents of dill. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 2002;50(4):501-7.
 10. Junaidh K, Kumar M. A review on *Anethum graveolens*: Its role in human life. 2022.
 11. Khan AA, Amjad MS. GC-MS analysis and biological activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha arvensis* essential oil. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2019;44(3):388-96.
 12. Manandhar S, Luitel S, Dahal RK. In vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Journal of tropical medicine*. 2019;2019.
 13. Baron S. *Medical microbiology*. 1996.
 14. Ganfon H, Houvohessou J-P, Assanhou AG, Bankole HS, Gbenou J. Activité antibactérienne de l'extrait éthanolique et des fractions de *Anogeissus leiocarpa* (DC) Guill. Et Perr.(Combretaceae). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2019;13(2):643-51.
 15. Ruangamnant A, Buranaphalin S, Temsiririrkkul R, Chuakul W, Pratuangdejkul J. Chemical compositions and antibacterial activity of essential oil from dill fruits (*Anethum graveolens* L.) cultivated in Thailand. *Mahidol Univ J Pharm Sci*. 2015;42(3):135-43.
 16. Mohamed SH, Zaky WM, Kassem JM, Abbas HM, Salem M, Said-Al Ahl H. Impact of antimicrobial properties of some essential oils on cheese yoghurt quality. *World Applied Sciences Journal*. 2013;27(4):497-507.
 17. Borumand A, Hamedi M, Emam Jomea Z, Razavi H, Gholmakani M. Investigation on the antimicrobial effects of essential oils from dill and coriander seeds on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella typhimurium*. *J Iran Food Sci Technol Res J*. 2008;4(1):1-10.
 18. Ranjbarian P, Sadeghian S, Shirazi MH, Sarafnezhad A, Fazeli M, Amin G, et al. Survey of anti-bacterial effect of plant extracts (fennel-dill-caraway-cinnamon) by flow cytometry and disk diffusion. 2004.
 19. Guillín Y, Cáceres M, Torres R, Stashenko E, Ortiz C. Effect of Essential Oils on the Inhibition of Biofilm and Quorum Sensing in *Salmonella enteritidis* 13076 and *Salmonella typhimurium* 14028. *Antibiotics*. 2021;10(10):1191.
 20. Saffari Samani E, Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B. Evaluation of reciprocal pharmaceutical effect and antimicrobial activity of Shirazi thyme essential oil against some Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Science and Technology*. 2020;17(104):1-11.
 21. Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi journal of biological sciences*. 2018;25(2):361-6.
 22. Sharafati Chaleshtori R, Mazroii Arani N, Taghizadeh M, Sharafati Chaleshtori F. Antibiotic resistance pattern of salmonella isolated from hamburgers and detection of their sensitivity to some essential oils. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2017;27(148):136-42.
 23. Shahnazi S, Khalighi-Sigaroodi F, Ajani Y, Yazdani D, Ahvazi M, Taghizad-Farid R. Study on Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Thymus trautvetteri* Klokov & Desj.–Shost. *Journal of Medicinal Plants*. 2007;6(23):80-8.
 24. Gebeyehu DT. The foodborne diseases antimicrobial resistance development in food animals: A case of *Salmonella* isolates from diarrheic sheep in and around Gondar city, Ethiopia: A cross-sectional study. 2020.

25. Lenchenko E, Blumenkrants D, Vatnikov Y, Kulikov E, Khai V, Sachivkina N, et al. Poultry Salmonella sensitivity to antibiotics. *Systematic Reviews in Pharmacy*. 2020;11(2):170-5.
26. Habibi H, Ghahtan N, Morammazi S. The effects of some herbal essential oils against Salmonella and Escherichia coli isolated from infected broiler flocks. *J World Poultr Res*. 2018;8(3):74-80.
27. Chand B. Antibacterial effect of garlic (allium sativum) and ginger (zingiber officinale) against staphylococcus aureus, salmonella typhi, escherichia coli and bacillus cereus. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. 2013;2(4):2481-91.
28. DiMarzio M, Shariat N, Kariyawasam S, Barrangou R, Dudley EG. Antibiotic resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium associates with CRISPR sequence type. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(9):4282-9