بررسی اثرضد میکروبی و هم افزایی آنتی بیوتیک اریترومایسین و داروی گیاهی تجاری با مواد موثره آویشن باغی، شیرین بیان و انیسون بر باکتری سالمونلا تیفی موریوم در جوجه‌های گوشتی

تاجی، م.[۱]، استاجی، ح.[۲*]، غفاری خلیق، س.[۳]، عمادی چاشمی، ح.[۴]

دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۷ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۶

خلاصه

سالمونلاتیفی‌موریوم یکی از عوامل اصلی مسمومیت‌غذایی در انسان با منشا حیوانی است. استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ایجاد سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو شده است. لذا جایگزین کردن مواد کم‌ضرر از جمله گیاهان‌دارویی ضروری به‌نظر می‌رسد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی و هم‌افزایی اریترومایسین و داروی‌گیاهی کالیک® که شامل مواد موثره آویشن‌باغی، شیرین‌بیان و انیسون است به‌منظور کاهش عفونت سالمونلاتیفی‌موریوم در جوجه‌های گوشتی انجام شد.۴۰ جوجه یک روزه راس ۳۰۸ با سویه استاندارد سالمونلاتیفی‌موریوم القا عفونت و در سه گروه درمان و گروه کنترل منفی تقسیم شدند و در روزهای چهار و دوازده پس از انجام مرگ با ترحم از طریق روش شمارش‌کلنی در بافت کبد و طحال مورد بررسی قرار گرفتند.بیشترین میزان باکتری در گروه کنترل مشاهده شد. پس از آن بیشترین میزان باکتری در گروه کالیک و گروه اریترومایسین اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود و کمترین میزان باکتری در گروه درمان هم‌زمان با کالیک و اریترومایسین اختصاص داشت که با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت. کالیک در کاهش عفونت سالمونلاتیفی‌موریوم موثر می‌باشد و کالیک و اریترومایسین بهترین روش مقابله در باکتری سالمونلاتیفی‌موریوم در مطالعه حاضر است.

واژه‌های کلیدی: آویشن باغی، اریترومایسین، جوجه گوشتی، *سالمونلاتیفی‌موریوم*، شیرین بیان

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده بیوفناوری، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲- دانشیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۳-استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۴- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
* نویسنده مسئول hstaji@semnan.ac.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های مرتبط با *سالمونلا* بحث انتقال آن از گوشت و فرآورده‌های حیوانی به انسان است (Humphrey و ۲۰۰۶ ,Jørgensen). باکتری *سالمونلا* تهدید بزرگی برای صنایع غذایی می‌باشد زیرا می‌تواند با شرایط محیطی که به‌طور قابل توجهی با دامنه رشد طبیعی آن‌ها متفاوت است سازگار شود. برخی از سویه‌ها قادر به رشد در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد و برخی دیگر حتی در دمای ۲ تا ۴ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد هستند (Li و همکاران, ۲۰۱۳). *سالمونلا* در طیور و فرآورده‌های آن بیش از هر منبع حیوانی دیگر جدا می‌شود. بنابراین عفونت‌های سالمونلایی طیور از یک سو به دلیل ایجاد بیماری و خسارات اقتصادی در طیور و از سوی دیگر به دلیل ایجاد مسمومیت غذایی در انسان از اهمیت خاصی برخوردار هستند (Huberman و همکاران, ۲۰۲۲). *سالمونلا تیفی موریوم* یکی از عوامل اصلی سالمونلوز ناشی از غذا در انسان است. عفونت ناشی از *سالمونلا تیفی موریوم* پس از رسیدن به معده باید با اسیدیته محیط مقابله کند، بنابراین پاسخ تحمل اسید آن فعال می‌شود که Hp داخل سلولی را بالاتر از pH خارج سلولی نگه می‌دارد و به باکتری اجازه می‌دهد در این محیط زنده بماند (Fàbrega و Vila, ۲۰۱۳). آنتی بیوتیک‌های متعددی برای درمان عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های رایج طیور مانند *سالمونلا* استفاده می‌شوند (Jorgensen و همکاران, ۲۰۰۲). استفاده طولانی مدت و بی‌رویه از این ضد میکروبی‌ها منجر به ایجاد سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو شده است (Woc-Colburn و Bobak, ۲۰۰۹). برای همین استراتژی‌های مداخله دوستدار زیستی جدید به تنهایی و همراه با آنتی بیوتیک در جهت تقویت اثر آنتی بیوتیک در برابر *سالمونلا* مورد نیاز است (Valadez و همکاران, ۲۰۰۹). گیاهان دارویی معمولاً در جیره‌های طیور برای ارتقای عملکرد رشد و سلامت حیوانات به‌ویژه زمانی که شرایط چالش برانگیز سلامتی وجود دارد، دارای اهمیت می‌باشند و دارای خواص آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی، ضد التهابی، ضد کوکسیدیوز و ضد کرمی می‌باشد (Shurson و همکاران, ۲۰۲۰).

کالیک® نام تجاری دارو انسانی و ساخت ایران (محصول شرکت داروسازی نوتک فار) است که برای درمان سرفه و سرماخوردگی در انسان تجویز می‌گردد. هم‌چنین در بروشور این شربت آمده به دلیل وجود مواد موثره متفاوت گیاهان به‌کار رفته در این دارو و اثرات گوارشی آن‌ها، مصرف این شربت در گاستریت و پیشگیری و درمان زخم‌های گوارشی سودمند می‌باشد. ترکیبات این شربت شامل آویشن باغی، شیرین بیان، انیسون و عسل می‌باشد و همان‌طور که در بروشور آن ذکر شده دارای مواد موثره مهم تیمول، کارواکرول و گلیسیریزین است که بر اساس تحقیقات صورت گرفته این ترکیبات دارای خواص ضد میکروبی است و تاثیرات قابل توجهی بر عملکرد ایمنی دارند.

مطالعات نشان می‌دهند ترکیبات شیمیایی مانند تیمول و کارواکرول در آویشن باغی (Gholami-Ahangaran و همکاران, ۲۰۲۰) و گلیسیریزین در شیرین بیان (Alagawany و همکاران, ۲۰۱۹) و ترانس آنتول در انیسون (Sun و همکاران, ۲۰۱۹) که در شربت کالیک به‌کار رفته است محافظ دستگاه گوارش و دارای خواص ضد میکروبی بسیاری می‌باشد. به همین جهت این تحقیق با هدف بررسی داروی گیاهی کالیک و به‌صورت هم‌افزایی با آنتی بیوتیک اریترومایسین برای درمان و کنترل عفونت *سالمونلا تیفی موریوم* در جوجه‌های گوشتی یک روزه راس ۳۰۸ مورد بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق شمارش‌کلنی در محیط سالمونلا شیگلا آگار (Salmonella Shigella Agar) (ایبرسکو، کرج) و بلاد آگار (ایبرسکو، کرج) قرار گرفت.

مواد و روش کار

۲-۱ جامعه مورد مطالعه

در این مطالعه تعداد ۴۰ قطعه جوجه یک روزه نژاد راس ۳۰۸ (کد اخلاق: IR.SU.REC.۱۴۰۲,۷) با میانگین وزن بین ۹۵ تا ۱۰۰ گرم تهیه شد.

۲-۲ مکان و شرایط مطالعه

محیط نگهداری جوجه‌ها محیطی با درجه حرارت ۳±۳۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵±۶۰ ٪ بود. تغذیه جوجه‌ها نیز در سه روز اول جیره پیش آغازین و از سه روزگی به بعد جیره آغازین بود که طبق دستور العمل شرکت تولید کننده انجام گرفت. آب نیز بدون محدودیت در اختیار جوجه‌ها قرار گرفت. در تمام مدت آزمایش جوجه‌ها در شرایط بهینه دمایی و محیطی نگهداری شدند.

۲-۳ تایید حضور باکتری در جوجه‌ها

۲-۳-۱ ارزیابی میکروبی

جهت تایید حضور باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در بافت کبد و طحال، ابتدا ۵ جوجه یک روزه با سویه استاندارد *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC14028 القا عفونت شدند. پس از گذشت چهار روز از تلقیح خوراکی باکتری، جوجه‌ها مورد مرگ با ترحم قرار گرفتند و سپس بعد از

کالبد گشایی با یک کاردک داغ با سطح مخاطی ارگان تماس داده شد تا بدین وسیله آلودگی‌های سطحی ارگان مورد نظر از بین برود و سپس از درون محیط ارگان نمونه‌ها برداشته شدند و در محیط سالمونلا شیگلا آگار (SS) کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت کلنی‌هایی با مرکز سیاه رنگ در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) رویت شد. برای اطمینان بیشتر از سویه‌های باکتری، رنگ آمیزی گرم انجام شد و باکتری‌های باسیلی شکل گرم منفی مشاهده شدند و در ادامه، با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی TSI (Triple Iron Agar) (ایبرسکو، کرج)، SIM (Sulfide Indol Motility) (مرک، آلمان)، MRVP (Methyl red-Vegesproskaure broth) (مرک، آلمان)، سیمون سیترات(Simmons Citrate Agar) (مرک، آلمان) و اوره آگار (Urea Agar) (مرک، آلمان)، مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج آزمایش‌های لاکتوز، اندول و اوره منفی و نتایج آزمایش‌های H2S، حرکت، متیل رد و سیترات مثبت شدند که نتایج به‌دست آمده با خواص سالمونلا تیفی موریوم هم‌خوانی داشت و نشان دهنده تایید حضور *سالمونلا* در محیط سالمونلا شیگلا آگار (SS) بود.

۲-۳-۲ ارزیابی کالبد گشایی نشانه‌های بالینی

جهت تایید حضور *سالمونلا* و تاثیر آن کالبد گشایی صورت گرفت و فاکتورهایی مانند التهاب و عدم جذب کیسه زرده، تورم طحال و کبد، رگه‌های خونی و کانون‌های نکروتیک مشاهده شد. نشانه‌های بالینی ضعف توان بدن، ضعف در رشد، کاهش تمایل به حرکت، پرهای ژولیده، اسهال، آلودگی پرهای اطراف مقعد با مدفوع دیده شد.

۲-۴ القا باکتری *سالمونلا*

در مرحله خوراندن باکتری به جوجه‌ها، ابتدا یک لوپ از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC۱۴۰۲۸ در ۲ سی‌سی محیط BHI (Brain Heart Infusion) براث (ایبرسکو، کرج) کشت داده شد و بعد از مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس، یک کشت مجدد بعد از ۲۴ ساعت داده شد. جهت رقت نیم مک‌فارلند با افزودن محلول باکتری به کوت درون اسپکتوفتومتر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر، (Optical Density) OD ۰/۱ گرفته شد. پس از تهیه رقت نیم مک‌فارلند، محلول باکتری به 10^6 CFU/ml (Colony Forming Unit) رسانده شد. القا عفونت به‌صورت خوراکی و از طریق گاواژ چینه‌دان به جوجه‌ها (توسط سوند معدی) منتقل گردید و عفونت به‌صورت تجربی در آن‌ها ایجاد شد (Lopes و همکاران, ۲۰۱۶).

۲-۵ گروه‌های آزمایشی

پس از القا عفونت، جوجه‌ها به‌صورت تصادفی در چهار گروه آزمایشی (هرگروه شامل ۱۰جوجه) با رنگ آمیزی متمایز شدند. در گروه یک مداخله‌ای در طول دوره آزمایش صورت نگرفت. در گروه دوم پس از گذشت ۲۴ ساعت از القا سالمونلوز در جوجه‌ها، درمان به‌وسیله آنتی بیوتیک اریترومایسین (رویان دارو، سمنان)، با دوز ۰/۲ میلی‌گرم لحاظ گردید. آنتی بیوتیک اریترومایسین با فاصله ۲۴ ساعت به‌مدت دوازده روز به جوجه‌ها داده شد. در گروه سوم تجویز داروی گیاهی کالیک (نوتک فار، تهران) که حاوی سه عصاره شیرین بیان (شیرین بیان استاندارد شده بر مبنای ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، آویشن باغی و انیسون می‌باشد که با دوز ۵۰ میکرولیتر به هر جوجه با فاصله ۲۴ ساعت یک‌بار در طی مدت دوازده روز از طریق گاواژ به جوجه خورانیده شد. در گروه چهارم تجویز هم‌زمان کالیک و اریترومایسین با دوزهای فوق صورت گرفت (Gerivani و همکاران, ۲۰۲۰).

۲-۶ نمونه گیری

پس از شروع تجویزها در روزهای چهارم و دوازدهم ، ۵ جوجه از هر گروه (۵ جوجه برای روز چهارم و ۵ جوجه برای روز دوازدهم) مورد مرگ با ترحم قرار گرفت. ابتدا پوست ما بین پاها و شکم بریده شد و با کشیدن و چرخاندن ران‌ها، سر ران‌ها از مفصل لگن جدا شد. سپس پوست روی شکم از دو طرف در امتداد شکم بریده شد و پوست از روی شکم و عضلات سینه کنار زده شد. عضلات شکم به موازات لبه‌های استخوان جناغ بریده شد و بعد از برش عضلات شکم، دنده‌ها نیز تا انتهای قفسه سینه جدا شد و سپس قفسه سینه برای نمونه گیری کبد و طحال باز شد. سپس بررسی‌های میکروبیولوژی از طریق کشت، جداسازی و شمارش کلنی‌ها در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) و بلاد آگار صورت گرفت.

۲-۷ شمارش بار میکروبی به روش شمارش کلنی

بافت‌های شانزده گروه (نمونه گیری چهار گروه آزمایشی در روز چهارم و روز دوازدهم بافت کبد و طحال) به گونه‌ای که جمع وزنی هر گروه ۱ گرم (هر گروه شامل ۳ نمونه بافت کبد یا طحال) باشد برش داده شد. ابتدا ۱ گرم از بافت‌های یک گروه درون هاون ریخته شد. سپس ۱ سی‌سی از محلول پپتون واتر (Peptone water) به هاون اضافه شد و ترکیب فوق کاملا مخلوط گردید. ترکیب به‌دست آمده درون یک لوله آزمایش با ۹ سی‌سی پپتون واتر ریخته شد و به این صورت رقت 10^{-1} ایجاد گردید. سپس از لوله اول ۱ سی سی برداشته شد و در یک لوله

مجزا با ۹ سی سی پپتون واتر در جهت ایجاد رقت 10^{-2} ترکیب شد و مجدد ۱ سی سی از لوله دوم به لوله سوم همراه با ۹ سی سی پپتون واتر در جهت رقت 10^{-3} ترکیب شد. برای تمام گروه‌ها این فرآیند انجام شد.

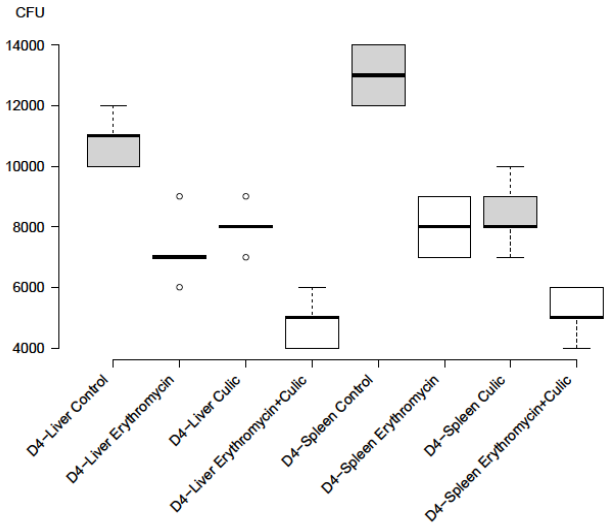
محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) و بلاد آگار آماده گردید و سپس در جهت کشت باکتری ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر با پنج بار تکرار از سه رقت برداشته شد و به محیط کشت اختصاصی سالمونلا شیگلا آگار (SS) و بلاد آگار اضافه گردید و سپس به وسیله اسپریدر استریل شده، کشت سطحی داده شد. همین رویه برای تمام گروه‌ها انجام گردید. تمام پلیت‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت شمارش کلنی محیط کشت بلاد آگار و سالمونلا شیگلا آگار (SS) انجام شد (Zhou و همکاران, ۲۰۱۷).

در نهایت با بررسی نتایج میکروبیولوژی حاصل از شمارش کلنی در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) و بلاد آگار در بافت‌های کبد و طحال بین گروه‌های مختلف تحت آزمایش، آنالیز آماری با نرم افزار One-way ANOVA با مقیاس Pvalue ($P< ۰/۰۵$) صورت گرفت

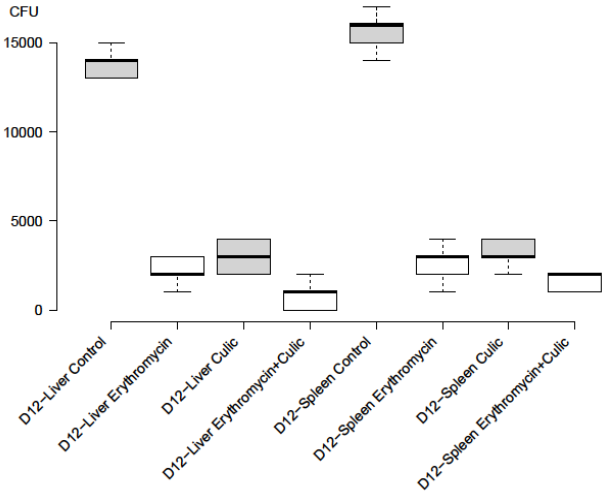
نتایج

۳-۱ نتایج شمارش باکتری در محیط کشت بلاد آگار

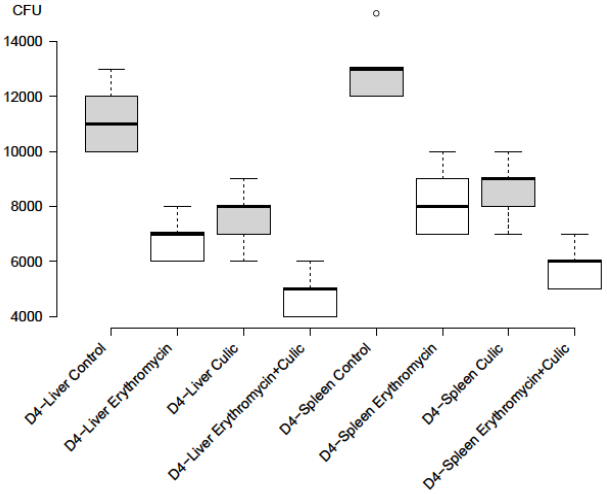
نتایج حاصل از شمارش باکتری سالمونلا تیفی موریوم در بافت‌های کبد و طحال روز چهار (تصویر ۱) و روز دوازده (تصویر ۲) در محیط بلاد آگار و بافت‌های کبد و طحال طحال روز چهار (تصویر ۳) و روز دوازده (تصویر ۴) در محیط سالمونلا شیگلا آگار (SS) به روش شمارش کلنی با استفاده از نرم افزار آماری One-Way ANOVA نشان داد که گروه کنترل (بدون درمان) بیشترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود و اختلاف معنی‌داری با سایر گروه‌ها داشت. پس از آن بیشترین میزان باکتری به گروه داروی گیاهی کالیک و گروه آنتی بیوتیک اریترومایسین اختصاص داشت که میزان اختلاف بین این دو گروه معنی‌دار نبود. در نهایت موفق ترین گروه درمان که کمترین میزان باکتری را به خود اختصاص داده بود مربوط به گروه درمان با داروی گیاهی کالیک و آنتی بیوتیک اریترومایسین بود که با گروه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P< ۰/۰۵$).



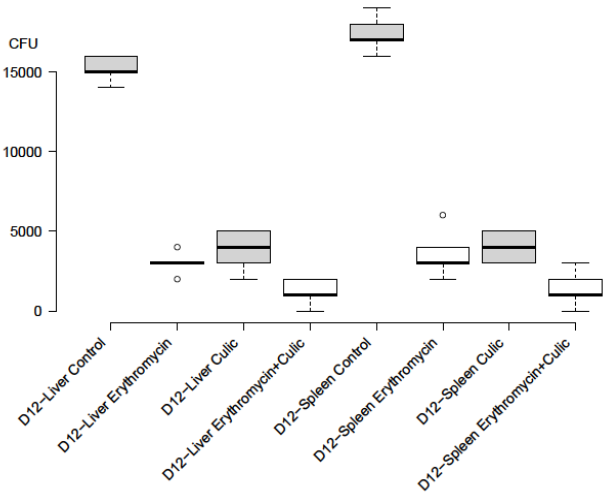
تصویر ۱. نمودار نتایج حاصل از شمارش باکتری بافت‌های کبد و طحال روز چهار در محیط کشت بلاد آگار که محور افقی گروه‌های آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری است.



تصویر ۲. نمودار نتایج حاصل از شمارش باکتری بافت‌های کبد و طحال روز دوازده در محیط کشت بلاد آگار که محور افقی بیانگر گروه‌های آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری است.



تصویر۳. نمودار نتایج حاصل از شمارش باکتری بافت‌های کبد و طحال روز چهار در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) که محور افقی بیانگر گروه آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری است.



تصویر ۴. نمودار نتایج حاصل از شمارش باکتری بافت‌های کبد و طحال روز دوازده در محیط کشت سالمونلا شیگلا آگار (SS) که محور افقی گروه‌های آزمایشی و محور عمودی بیانگر تعداد کلنی باکتری است.

بحث

در مطالعه حاضر بررسی و ارزیابی تاثیر داروی گیاهی کالیک که شامل آویشن باغی، شیرین بیان و انیسون می‌باشد برای درمان و کنترل عفونت *سالمونلا تیفی موریوم* در مقایسه با آنتی بیوتیک اریترومایسین و اثر هم‌افزایی که همراه با این آنتی بیوتیک می‌تواند بگذارد در جوجه‌های گوشتی مورد ارزیابی قرار گرفت که بر اساس یافته‌های این تحقیق نشان داده شد شربت کالیک به میزان قابل توجهی توانست مانند آنتی بیوتیک اریترومایسین باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* را کاهش دهد و خوراندن شربت کالیک همراه با آنتی بیوتیک توانست بهترین و موفق ترین درمان در مطالعه حاضر باشد ($P< ۰/۰۵$). در ارتباط با اثرات ضد باکتریایی آویشن باغی، شیرین بیان و انیسون تحقیقات مختلف درون تنی و برون تنی انجام شده که تایید کننده مطالعه حاضر می‌باشد که به چند مورد از این تحقیقات در ادامه پرداخته می‌شود.

یکی از ترکیبات شربت کالیک آویشن باغی است که در موافقت به تاثیر آن به مطالعه‌های قبلی پرداخته می‌شود. در پژوهشی که توسط دخیلی و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت نشان داده شد اسانس آویشن شیرازی باعث کاهش عفونت *سالمونلا تیفی موریوم* شد و در مقایسه با سه آنتی بیوتیک فلومکوئین، اکسی تتراسایکلین و اریترومایسین تاثیر بیشتری داشت (Dakhili و همکاران, ۲۰۰۶). در پژوهشی که توسط جبلی جوان در سال ۲۰۱۵، صورت گرفت مشاهده شد اسانس آویشن شیرازی و زنیان علیه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* در محیط آزمایشگاهی به روش میکرودایلوشن به تنهایی حداقل غلظت بازدارنده هر گیاه ppm ۵۰۰ و حداقل غلظت بازدارنده بدست آمده از ترکیب این دو اسانس ppm ۲۵۰ است (Jebelli Javan, ۲۰۱۵). Du و همکاران نشان دادند که کارواکرول و تیمول در مقابل پاتوژن‌های مهم طیور مانند *سالمونلا*، *اشریشیاکلی* و *کلستریدیوم پرفرنژنس* می‌توانند موثر باشند (Du و همکاران, ۲۰۱۵). در پژوهشی دیگر که توسط Eslami و همکاران در سال ۲۰۲۲، فعالیت ضد میکروبی اسانس آویشن در مقایسه با دو آنتی بیوتیک داکسی‌سایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بر روی جوجه‌های گوشتی نژاد راس آلوده به *سالمونلا تیفی موریوم* ATCC۱۴۰۲۸ را در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. پس از استخراج اسانس از آویشن و آنالیز با دستگاه Gas chromatography mass) GC-MS (spectrometry حداقل غلظت بازدارنده رشد و آنتی بیوتیک آن به روش میکرورقیق سازی براث تعیین شد و تجزیه و تحلیل GC-MS اسانس آویشن، وجود دوازده ترکیب شیمیایی را نشان داد که تیمول، (p-Cymene) و کارواکرول از عمده‌ترین آن‌ها بودند. نتایج بعد از هفت روز درمان از طریق گاواژ نشان داد مصرف ۱ میلی‌لیتر اسانس آویشن با دوز ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر دو بار در روز با فاصله ۱۲ ساعت از رشد *سالمونلا تیفی موریوم* جلوگیری کرد. هم اسانس آویشن و هم آنتی بیوتیک‌های داکسی‌سایکلین و اکسی تتراسایکلین باعث کاهش و مهار کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی موریوم* با فاصله زمانی کم شدند (Eslami و همکاران, ۲۰۲۲) که نتایج این پژوهش مانند پژوهش حاضر نشان داد گیاه آویشن که یکی از ترکیبات شربت کالیک است می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک باشد.

ترکیب دیگر شربت کالیک، شیرین بیان است که در تایید از خواص آن به پژوهش‌های دیگری پرداخته می‌شود. پژوهشی که توسط Kalantar و همکاران در سال ۲۰۱۷، برای ارزیابی اثری که آویشن، شیرین بیان و آویشن+ شیرین بیان در جوجه‌های گوشتی می‌گذارند انجام شد که نتایج نشان داد آویشن و شیرین بیان به تنهایی یا در ترکیب به‌عنوان داروی گیاهی ارگانیک می‌توانند بر عملکرد، لاشه و ویژگی‌های ایمنی تأثیر بگذارند و همچنین باعث بهبود اندام ایمنی مانند بورس فابریسیوس شود که نشان می‌دهد این گیاهان دارویی می‌توانند وضعیت ایمنی و اثربخشی سلامت و قدرت زنده ماندن را ارتقا دهند (Kalantar و همکاران, ۲۰۱۷). در تحقیق دیگری که توسط Reda و همکاران در سال ۲۰۲۱ بر روی بلدرچین ژاپنی صورت گرفت، مشخص شد مکمل شیرین بیان منجر به کاهش قابل توجهی *کلیفرم‌ها*، *اشریشیاکلی* و *سالمونلا* در تعداد کل باکتری‌ها در مقایسه با گروه شاهد شد و گنجاندن شیرین بیان در سطوح ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در رژیم غذایی بلدرچین ژاپنی باعث افزایش عملکرد، ایمنی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حیوان و حفظ میکروبیوتای روده سالم شد که در پژوهش حاضر هم مشاهده شد شیرین بیان همراه با دو عصاره دیگر شربت کالیک توانست باعث کاهش عفونت *سالمونلا تیفی موریوم* شود (Reda و همکاران, ۲۰۲۱). در آزمایش Park و همکاران، نشان داده شد که آمپی‌سیلین و جنتامایسین که به‌عنوان یک درمان ترکیبی برای درمان لیستریوز استفاده می‌شوند، اثر هم‌افزایی علیه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* نداشت اما حضور ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره شیرین بیان باعث کاهش ۳۲ برابری حداقل غلظت مهاری جنتامایسین شد. علاوه بر این، هم‌افزایی ضدمیکروبی با

عصاره شیرین بیان، جدایه‌های بالینی *لیستریا مونوسیتوژنز* مقاوم به جنتامایسین را نسبت به جنتامایسین حساس کرد که در این پژوهش هم مشاهده شد، زمانی که داروی گیاهی کالیک و آنتی بیوتیک اریترومایسین هم‌زمان به جوجه‌های گوشتی خورانده شد باعث اثر هم‌افزایی در کاهش میزان باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* شد (Park و همکاران, ۲۰۲۲).

سومین ترکیب شربت کالیک انیسون است که در تایید از خواص آن به پژوهش‌های دیگری پرداخته می‌شود. در نتایج Mahady و همکاران، نشان داده شد عصاره متانولی دانه‌های انیسون در شرایط آزمایشگاهی از رشد *هلیکوباکتر پیلوری* جلوگیری کرد. این آزمایش مشخص کرد انیسون می‌تواند یک ترکیب بالقوه مفید در درمان بیماری‌های گوارشی باشد (Mahady و همکاران ۲۰۰۵). نتایج آزمون Al-kassie و همکاران در سال ۲۰۰۸، نشان داد دو ماده افزودنی ۰/۵٪ انیسون و ۱٪ رزماری در رژیم غذایی استاندارد در دستگاه گوارش جوجه گوشتی یک روزه نژاد Arbor-Acre می‌تواند در کاهش تعداد باکتری‌ها و تعداد باکتری‌های *کلیفرم*، باکتری‌های *لاکتوباسیل* و تعداد قارچ‌ها تاثیر داشته باشد (Al-kassie و همکاران, ۲۰۰۸). که نتیجه این پژوهش‌ها مانند پژوهش حاضر نشان می‌دهد انیسون دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد.

نتیجه گیری نهایی

بر اساس یافته‌های این مطالعه مشخص شد داروی‌گیاهی‌کالیک عملکرد مشابهی با آنتی بیوتیک اریترومایسین دارد و به‌صورت هم‌افزایی با اریترومایسین در کاهش جمعیت باکتری *سالمونلاتیفی‌موریوم* موثر می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه سمنان، دانشکده دامپزشکی اعلام میدارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

Journal of Veterinary Laboratory Research 13 (2021-22) 217-227

Survey the Antimicrobial and Synergistic Effect of the Antibiotic Erythromycin and Commercial Herbal Medicine with Active Ingredients of Thymus vulgaris, Glycyrrhiza glabra and Anise pimpinella on Salmonella Typhimurium Bacteria in Broilers

Taji, M.[1], Staji, H.[2*], Ghaffari Khaligh, S.[3], Emadi Chashmi, H.[4]

Received: 27.04.2021 Accepted: 15.02.2022

Abstract

Salmonella typhimurium is one of the main causes of food poisoning in humans of animal origin. Long-term and indiscriminate use of antibiotics has led to the development of drug-resistant pathogen strains. Therefore, it seems necessary to replace less harmful substances including medicinal plants.

The present study was conducted with the aim of investigating the antimicrobial and synergistic effect of the erythromycin and Culic®, which includes active ingredients of thyme, licorice, and anise, in order to reduce infection of S. typhimurium in broilers.

40 one-day-old Ross 308 chickens were infected with the standard strain of S. typhimurium and were divided into three treatment groups and a negative control group, and on the fourth and twelfth days after euthanasia, they were examined by colony counting method.

The highest bacterial load was observed in the control group. After that, the highest bacterial load was assigned to the culic group and erythromycin group. Finally, the lowest bacterial load was assigned to the treatment group with culic and erythromycin, which was significantly different from other groups.

Culic is effective in reducing S. typhimurium infection, and culic and erythromycin are the best methods of dealing with S. typhimurium in this study.

Keywords: Thymus vulgaris, Erythromycin, Broiler, Salmonella typhimurium, Glycyrrhiza glabra

1- Master's student, Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Semnan University, Semnan, Iran

2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

4-Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

*Corresponding author: hstaji@semnan.ac.ir

Al-kassie, G. A. M., Mohammed, M. F., Hamood, M. F., & Jameel, Y. J. (2008). The Effect of Anise and Rosemary on the Microbial Balance in Gastro Intestinal Tract for Broiler Chicks. **7(6)**, 610–612.

Alagawany, M., Elnesr, S. S., Farag, M. R., El-Hack, M. E. A., Khafaga, A. F., Taha, A. E., Tiwari, R., Yatoo, M. I., Bhatt, P., Marappan, G., & Dhama, K. (2019). Use of licorice (Glycyrrhiza glabra) herb as a feed additive in poultry: Current knowledge and prospects. Animals, **9(8)**. https://doi.org/10.3390/ani9080536

Du, E., Gan, L., Li, Z., Wang, W., Liu, D., & Guo, Y. (2015). In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with Clostridium perfringens. Journal of animal science and biotechnology, **6(1)**, 1–12.

Eslami, N., Anzabi, Y., & Nourazar, M. A. (2022). The Role of Thymus Vulgaris Essential Oil on the Rate of Fecal Excretion of Salmonella Typhimurium in Broilers Infected with Bacteria. 6(4), 157–167. https://doi.org/10.22034/jzd.2022.15683

Fàbrega, A., & Vila, J. (2013). Salmonella enterica serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. Clinical Microbiology Reviews, **26(2)**, 308–341. https://doi.org/10.1128/CMR.00066-12

Gerivani, B., Staji, H., Rassouli, M., Ghazaleh, N., & Vayeghan, A. J. (2020). Co-administration of erythromycin and leech salivary extract alleviates osteomyelitis in rats induced by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology, **33(04)**, 243–251.

Gholami-Ahangaran, M., Ahmadi-Dastgerdi, A., & Karimi-Dehkordi, M. (2020). Thymol and carvacrol; as antibiotic alternative in green healthy poultry production. Plant Biotechnology Persa, **2(1)**, 22–25. https://doi.org/10.29252/pbp.2.1.22

Huberman, Y. D., Caballero-García, M., Rojas, R., Ascanio, S., Olmos, L. H., Malena, R., Lomónaco, J., Nievas, P., Chero, P., Lévano-Gracía, J., & Mendoza-Espinoza, A. (2022). The Efficacy of a Trivalent Inactivated Salmonella Vaccine Combined with the Live S. Gallinarum 9R Vaccine in Young Layers after Experimental Infections with S. Enteritidis, S. Typhimurium, and S. Infantis. Vaccines, **10(7)**, 1–13. https://doi.org/10.3390/vaccines10071113

Humphrey, T., & Jørgensen, F. (2006). Pathogens on meat and infection in animals–Establishing a relationship using Campylobacter and Salmonella as examples. Meat Science, **74(1)**, 89–97.

(http://knowtechphar.com)

Jebelli Javan, A. (1394). Combinational effects of Trachyspermum ammi and Zataria multiflora Boiss essential oils on some pathogenic food-borne bacteria. Koomesh, **17(2)**, 374–383. http://koomeshjournal.semums.ac.ir/article-1-2779-en.html

Jorgensen, F., Bailey, R., Williams, S., Henderson, P., Wareing, D. R. A., Bolton, F. J., Frost, J. A., Ward, L., & Humphrey, T. J. (2002). Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. International Journal of Food Microbiology, **76(1–2)**, 151–164. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00027-2

Kalantar, M., Hosseini, S. M., Yang, L., Haider, S., & Raza, A. (2017). Performance , Immune , and Carcass Characteristics of Broiler Chickens as Affected by Thyme and Licorice or Enzyme Supplemented Diets. **105–109**. https://doi.org/10.4236/ojas.2017.72009

Li, H. P., Wang, H., D'Aoust, J. Y., & Maurer, J. (2013). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, ; Salmonella species; Doyle, MP, Buchanan, R., Eds. ASM Press: Washington, DC, USA.

Lopes, P. D., Freitas Neto, O. C., Batista, D. F. A., Denadai, J., Alarcon, M. F. F., Almeida, A. M., Vasconcelos, R. O., Setta, A., Barrow, P. A., & Berchieri, A. (2016). Experimental infection of chickens by a flagellated motile strain of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Gallinarum. Veterinary Journal, 214, 40–46. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.05.006

M., D., T., Z. S., M., T. G., & Khavari, A. (2006). Evaluation of Antimicrobial Effects of 4 Medicinal Plants Against Salmonella typhymurium and Comparision them with Common Antibiotics in Veterinary Medicine. Journal of Medicinal Plants, **5(20)**, 21. https://www.magiran.com/paper/413014 LK - https://www.magiran.com/paper/413014

Mahady, G. B., Pendland, S. L., Stoia, A., Hamill, F. A., Fabricant, D., Dietz, B. M., & Chadwick, L. R. (2005). In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, **19(11)**, 988–991.

Park, M., Horn, L., Lappi, V., Boxrud, D., Hedberg, C., & Jeon, B. (2022). Antimicrobial Synergy between Aminoglycosides and Licorice Extract in Listeria monocytogenes. Pathogens, **11(4)**, 440.

Reda, F. M., Farahat, M., Attia, G., & Alagawany, M. (2021). Dietary effect of licorice (Glycyrrhiza glabra) on quail performance, carcass, blood metabolites and intestinal microbiota. Poultry Science, 101266. https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101266

Shurson, G. C., Øverland, M., Mydland, L. T., Skrede, A., Pearlin, B. V., Muthuvel, S., Govidasamy, P., Villavan, M., Alagawany, M., Ragab Farag, M., Dhama, K., Gopi, M., Oluwafemi, R. A., Olawale, A. I., Alagbe, J. O., Kore, K. B., Pathak, A. K., & Gadekar,

Y. P. (2020). Recent Trends in the Utilization of Medicinal Plants As. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, **104(1)**, 5–11. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010

Sun, W., Shahrajabian, M. H., & Cheng, Q. (2019). Anise (Pimpinella anisum L .), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes . Cogent Biology, **5(1)**, 1673688. https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1673688

Valadez, A. M., Lana, C. A., Tu, S.-I., Morgan, M. T., & Bhunia, A. K. (2009). Evanescent wave fiber optic biosensor for Salmonella detection in food. Sensors, **9(7)**, 5810–5824.

Woc-Colburn, L., & Bobak, D. A. (2009). The expanding spectrum of disease due to Salmonella: An international perspective. Current Infectious Disease Reports, **11(2)**, 120–124. https://doi.org/10.1007/s11908-009-0018-2

Zhou, Z., Pan, C., Lu, Y., Gao, Y., Liu, W., Yin, P., & Yu, X. (2017). Combination of erythromycin and curcumin alleviates Staphylococcus aureus induced osteomyelitis in rats. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7(AUG), 1–6. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00379