



بررسی اثر مهاری عصاره پولک (*Stachys schtschegleevii*) بر استرپتوکوکوس تولیدکننده بیوفیلیم در شرایط آزمایشگاهی

حامد جعفرزاده^{۱*}، بیوک آقا فرمانی^۲

^۱استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

^۲دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز

چکیده

اطلاعات مقاله

بیوفیلیم‌ها به‌عنوان شکل طبیعی زندگی برای برخی از باکتری‌ها عمل می‌کنند، که در گونه‌های بیماری‌زا، عوامل حیاتی در ایجاد بیماری‌های عفونی می‌باشند. هدف از این تحقیق بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره *Stachys schtschegleevii* بر روی باکتری استرپتوکوکوس تولیدکننده بیوفیلیم جداشده از سیستم آبرسانی مزارع صنعتی پرورش پोलت تخمگذار بود. نتایج تولید بیوفیلیم با روش صفحه کشت بافت (TCP) تعیین شد و نشان داد که هر دو گونه استرپتوکوکوس جداسازی شده توانایی تولید بیوفیلیم را داشتند. به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی، عصاره پولک در غلظت 200 mg mL^{-1} و کمتر (با تهیه رقت سریالی) تهیه شد. ترکیبات زیست‌فعال عصاره که شامل محتوای فنولی کل، محتوای فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بودند، به ترتیب $83 \text{ mg GAE mL}^{-1}$ ، 24 mg QE mL^{-1} و 65% بدست آمدند. فعالیت ضد میکروبی با بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) عصاره اندازه‌گیری شد و با توجه به نتایج بدست آمده حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت باکتری‌کشی عصاره پولک برای استرپتوکوکوس مشتق شده از منبع ذخیره آب (B4) به ترتیب در غلظت $12/5$ و 25 mg mL^{-1} و برای استرپتوکوکوس حاصل از سیستم آبرسانی سالن طیور (S2-6) به ترتیب در غلظت 25 و 50 mg mL^{-1} مشاهده گردید. در این تحقیق تأثیر 3 L^{-1} هیپوکلریت سدیم بر بقاء و رشد باکتری‌های تحت مطالعه به روش انتشار در چاهک آگار بررسی شد که نتایج حاکی از آن بود که استرپتوکوکوس جدا شده از سیستم آبرسانی سالن طیور (S2-6) در مقابل آن مقاوم بود در حالی که جدایه B4 نسبت به آن حساس بود.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۵/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۵

کلمات کلیدی:

بیوفیلیم،
ترکیبات زیست‌فعال،
استرپتوکوکوس،
عصاره پولک.

DOI:10.22034/FSCT.22.163.138.

* مسئول مکاتبات:

jafarzadeh.hamed@tabrizu.ac.ir

۱-مقدمه و بیان مسئله

آب نقش مهمی در سلامتی پرندگان دارد و اطمینان از کیفیت آب آشامیدنی برای حفظ سلامت آنها ضروری است. همچنین بخش قابل توجهی از بدن مرغ (۷۵-۵۵٪) از آب تشکیل شده است بنابراین کیفیت آب مصرفی طیور برای مصرف‌کننده نهایی یعنی انسان حائز اهمیت است [۱]. در اروپا، استانداردهای کیفیت آب آشامیدنی طیور از مقررات وضع شده برای آب آشامیدنی انسان استخراج شده است [۲]. در حال حاضر هیچ الزام قانونی برای ارزیابی آلودگی میکروبی خطوط آب شرب سالن‌های پرورشی طیور صنعتی وجود ندارد [۳]. در نتیجه، مسئولیت حفظ بهداشت خطوط آب در درجه اول بر عهده پرورش‌دهنده طیور است که معمولاً در فواصل بین دوره‌های پرورشی انجام می‌شود [۴].

استرپتوکوکوس‌ها طیف وسیعی از باکتری‌ها را در بر می‌گیرند که توانایی تشکیل بیوفیلم روی غشاهای مخاطی را دارند و بقای خود را افزایش می‌دهند. تشکیل بیوفیلم‌ها یک ویژگی مشترک در بین استرپتوکوکوس‌های همزیست و بیماری‌زا بوده که در استرپتوکوکوس‌های همزیست، بیوفیلم‌ها بخشی از شکل طبیعی زندگی آنها بوده، در حالی که در گونه‌های بیماری‌زا، بیوفیلم‌ها به‌عنوان عوامل حیاتی در ایجاد بیماری‌های عفونی شناخته شده‌اند [۵]. بیوفیلم‌ها جوامع میکروبی روی سطوح هستند که در داخل یک ماتریکس که خود تولید می‌کنند و متشکل از یک یا چند گونه باکتریایی است، محصور شده‌اند. بیوفیلم‌ها نقش برجسته‌ای در عفونت‌های انسانی دارند و بیش از ۸۰ درصد بیماری‌های میکروبی با تشکیل بیوفیلم مرتبط هستند و در بیوفیلم‌ها، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یک مشکل رایج است [۵].

از زمانی که خطوط آبرسانی در صنعت طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند، میکروارگانیسم‌ها در سطوح داخلی آنها کلونیزه شده و با توسعه بیشتر به بیوفیلم تبدیل می‌شوند [۶]. باکتری‌های چسبیده تنها به میزان بسیار محدودی توسط روش‌های تمیز کردن و ضدعفونی تحت تأثیر قرار می‌گیرند

[۴ و ۷]. ناکارآمدی روش‌های مرسوم، ضرورت پیشرفت در مقابله با بیوفیلم‌ها را برجسته می‌کند [۸]. سال‌ها است که ضدعفونی‌کننده‌های بر پایه کلر در غلظت 3 mg L^{-1} به عنوان یک ضدعفونی‌کننده رایج به طور گسترده در خطوط آبرسانی طیور استفاده می‌شوند، این در حالی است که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض کلر می‌تواند منجر به ایجاد مقاومت باکتریایی شود که اغلب با مقاومت متقاطع آنتی‌بیوتیکی نیز همراه است [۹]. بنابراین، رویکردهای نوآورانه برای مقابله با بیوفیلم و نیز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیماری‌زایی گونه‌های باکتریایی ضروری است [۱۰]. از طرف دیگر نگرانی‌ها در مورد ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک منجر به توسعه افزودنی‌های غیرآنتی‌بیوتیکی شده است. روش‌های مختلفی مانند استفاده از بیوسیدها، آنتی‌بیوتیک‌ها و پوشش‌های یونی نیز برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۱]. اخیراً، علاقه فزاینده‌ای به گیاهان معطر و عصاره‌های آنها به عنوان محرک رشد و سلامتی وجود دارد [۱۲].

جنس *Stachys* به دلیل توانایی خود در تولید طیف گسترده‌ای از ترکیبات طبیعی از جمله اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید و فنیل پروپانوئید، ساپونین‌ها، ایریدوئیدها، دیترپنوئیدها و استروئیدها مشهور است که این ترکیبات خواص بیولوژیکی مختلفی از خود نشان می‌دهند [۱۳ و ۱۴]. عصاره‌های گیاهی از ترکیبات بیوشیمیایی متعددی تشکیل شده‌اند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد کوکسیدال و ضد کرم هستند [۱۵]. گیاه پولک متعلق به خانواده‌ای از گیاهان است که دارای تنوع بالایی بوده و حدود ۳۰۰ گونه در آن خانواده وجود دارند [۱۶]. در ایران تقریباً ۳۴ گونه مختلف از آن وجود دارد که ۱۳ گونه از آنها بومی هستند [۱۷] و پولک (*Stachys schtschegleevii*) یکی از همان ۳۴ گونه *Stachys* است که در طب سنتی برای درمان بیماری‌های التهابی تنفسی مانند آسم، سینوزیت و سرماخوردگی استفاده می‌شده است و همچنین به دلیل خاصیت ضدباکتریایی و اثربخشی آن در درمان روماتیسم و عفونت‌های دستگاه ادراری نیز شناخته شده است. علاوه بر

۳ روز در سایه خشک و با آسیاب دستی به پودر تبدیل شد. عصاره‌گیری پودر گیاه پولک از طریق روش ماسراسیون (روش سرد) با استفاده از حلال هیدروآتانولی ۷۰٪ (۷۰:۳۰) در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) و همراه با همزدن در طی ۴ روز انجام گردید [۲۱]. جداسازی عصاره از تفاله گیاهی با استفاده از پارچه صافی صورت گرفت که در ادامه به وسیله اواپراتور تحت خلأ چرخان در دمای ۵۵°C اتانول از عصاره جداسازی شد. عصاره گیاهی به دست آمده تا زمان انجام آنالیزهای آزمایشگاهی به شیشه‌های تیره انتقال یافته و در یخچال نگهداری شدند [۲۱].

۲. تعیین ترکیبات زیست فعال

۲-۱- محتوی فنول کل

به منظور تعیین محتوای فنول کل، عصاره با استفاده از روش سینگلتن و همکاران [۲۲] در طول موج ۷۶۵ nm مورد ارزیابی قرار گرفت (JENWAY 6405 UV/Vis) که بر اساس میزان معادل میکروگرم اسید گالیک در میلی لیتر عصاره ($\mu\text{g GAE mL}^{-1} \text{ extract}$) بیان شد.

۲-۲- محتوی فلاونوئید کل

برای تخمین محتوای کل فلاونوئیدها، روش رنگ‌سنجی کلراید آلومینیوم در طول موج ۵۱۰ nm (JENWAY 6405 UV/Vis) بر روی ۵۰ μL عصاره انجام گرفت که محتوای کل فلاونوئیدها بر اساس میزان معادل میکروگرم کوئرستین در میلی لیتر عصاره ($\mu\text{g QE mL}^{-1} \text{ extract}$) گزارش شد [۲۳].

۲-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی

ظرفیت آنتی اکسیدانی توسط آزمون فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH^۴ و ارزیابی مقدار جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm (JENWAY 6405 UV/Vis) اندازه‌گیری شد [۲۴] و قدرت مهاری عصاره (۱۵۰ μL عصاره) به صورت درصد مهار DPPH با معادله زیر بیان شد:

این، عصاره متانولی مشتق شده از اندام هوایی *S.schtschegleevii* دارای خواص ضد درد و ضدالتهابی است [۱۸].

یکی از روش‌های تعیین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات مختلف، روش رقیق‌سازی داخل محیط کشت براث^۱ برای بررسی حداقل غلظت مهاری (MIC^2) و حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC^3) آنها می‌باشد که رقت‌های دو برابری از عامل ضد میکروبی به یک محیط کشت مایع در صفحه میکروتیتراسیون ۹۶ چاهکی افزوده شده و سپس سوسپانسیون میکروبی استاندارد شده با مقیاس نیم مک‌فارلند به هر چاهک تلقیح شده و تحت شرایط کنترل شده انکوبه شده و رشد میکروبی با استفاده از اسپکتروفتومتر یا دستگاه خوانشگر میکروپلیت ارزیابی می‌شود [۱۹].

در مطالعه چیت‌ساز و همکاران (۱۳۸۵)، اسانس، عصاره آبی (جوشانده) و عصاره متانولی گیاه پولک بر روی چهار گونه باکتریایی شامل استرپتوکوکوس پیوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلای و سودوموناس آئروجینوزا به صورت مقایسه‌ای مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از آن بود که عصاره متانولی اثر مهارکننده قابل توجهی بر روی استرپتوکوکوس پیوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس داشت. در این تحقیق MIC و MBC برای استرپتوکوکوس پیوژنز برابر بوده و مقدار آن $12/5 \text{ mg mL}^{-1}$ بود [۲۰].

مطالعه حاضر به منظور بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره گیاه پولک بر روی باکتری/استرپتوکوکوس تولیدکننده بیوفیلم جدا شده از خطوط آبرسانی مزارع صنعتی پرورش پोलت تخمگذار طراحی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۱. تهیه عصاره هیدروآتانولی گیاه پولک (*Stachys*)

(*schtschegleevii*)

به منظور تهیه عصاره گیاه پولک، ابتدا برگ و گل گیاه از منطقه ارسباران جمع‌آوری شد و در دمای ۲۵°C و طی مدت

3 -Minimum Bactericidal Concentration

4- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

1 -Broth dilution method

2- Minimum Inhibitory Concentration

$$\% \text{ مهار} = (A_c - A_s / A_c) \times 100$$

که در آن A_c جذب محلول شاهد (DPPH) و A_s جذب نمونه است.

۳- جداسازی و شناسایی جنس/ستریوتوکوکوس

سویه‌های باکتریایی به‌دست‌آمده از نمونه‌های آب مزارع صنعتی پرورش پולت تخمگذار جداسازی شدند و سپس توسط آزمایشگاه میکروبیولوژی مورد بررسی و شناسایی قرار گرفتند. سویه‌ها در محیط کشت BHI آگار (Merck 1.13825.0500) رشد و نگهداری شدند [۲۵]. هر ایزوله بر اساس رنگ‌آمیزی گرم، شکل، اندازه و نحوه آرایش آن در کشت خالص از نظر مورفولوژیکی شناسایی گردید. کوکسی‌های گرم مثبت با اندازه متوسط و بدون اسپور، تحت بررسی بیوشیمیایی بیشتری قرار گرفتند. در این مرحله آزمایش‌های اکسیداز (Merck Cat # 13300)، کاتالاز (Merck Cat # 11351) و کشت در محیط کشت اکسیداتیو-فرمانتاتیو (Merck Cat # 10282) انجام شد. در آزمایش اکسیداز، کلنی خالص باکتریایی با استفاده از آنس حلقوی روی ناحیه‌ای که چند قطره کوچک از محلول آماده شده کیت بر روی آن قرار داده شده بود، پخش گردید. بعد از چند دقیقه رنگ محلول مورد بررسی قرار گرفت. در تست کاتالاز یک قطره سرم فیزیولوژی روی لام گذاشته شد و کلنی خالص باکتریایی در سرم فیزیولوژی حل گردید و سپس یک قطره آب اکسیژنه (پراکسید هیدروژن) به سرم فیزیولوژی اضافه شد و نتیجه مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت سویه‌های باکتریایی که توانایی تولید بیوفیلم را داشتند در این مطالعه بررسی شدند [۲۶].

۴- تولید بیوفیلم به روش صفحه کشت بافت (TCP)^۵

در روش صفحه کشت بافت ابتدا کلنی‌ها از محیط کشت آگار در لوله‌ای حاوی محیط کشت تریپتیک سوی برای (TSB^6) (Merck 1.05459.0500) در انکوباتور $(37^\circ C)$ و $24h$ قرار داده شدند، سپس سوسپانسیون میکروبی با طول

موج مشخص تهیه و به میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. به این ترتیب، $20 \mu L$ سوسپانسیون میکروبی و $180 \mu L$ محیط TSB به هر چاهک اضافه و در دمای $37^\circ C$ به مدت $24h$ انکوبه گردید. در این تحقیق برای هر باکتری، تولید بیوفیلم در سه تکرار با $180 \mu L$ محیط کشت TSB بررسی شد، به این ترتیب $180 \mu L$ محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی در تمامی چاهک‌ها اضافه شد. در پایان، ۵ تا ۶ چاهک به عنوان شاهد منفی انتخاب شده و $180 \mu L$ از محیط کشت TSB در هر چاهک ریخته شد [۲۷].

پس از $24h$ انکوباسیون، به منظور اندازه‌گیری میزان تولید بیوفیلم در هر چاهک، محتویات میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به طور کامل تخلیه و با آب مقطر شسته شدند. پس از شستشو، $200 \mu L$ متانول ۹۹٪ به هر چاهک اضافه گردید و تثبیت به مدت 15 min در دمای اتاق انجام شد. سپس محتویات چاهک‌ها دور ریخته شد و میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا خشک شود. چاهک‌ها با $200 \mu L$ کریستال ویوله ۱٪ (Neutron pharmacchemical Co. C.I. 42555) به مدت 15 min در دمای اتاق رنگ‌آمیزی شدند و ۳ بار با آب مقطر شسته شدند [۲۸]. در مرحله آخر، $200 \mu L$ اسید استیک گلاسیال ۳۰٪ (Merck CAS # 100063) به هر چاهک اضافه و میکروپلیت به مدت 30 min در دمای اتاق قرار گرفت. جذب نوری چاهک‌ها در 570 nm با دستگاه خوانشگر الیزا (Hiperion Microplate reader, MPR4+) اندازه‌گیری گردید [۲۹]. میانگین چگالی نوری (AOD^7) سه چاهک، در مقایسه با چاهک شاهد تعیین شد. نتایج به‌عنوان عدم تشکیل بیوفیلم: الف) زمانی که میانگین چگالی نوری کوچکتر یا مساوی چاهک کنترل بود، ب) تشکیل بیوفیلم ضعیف: زمانی که میانگین چگالی نوری کمتر از دو برابر چاهک شاهد بود، ج) ایجاد و توسعه بیوفیلم: زمانی که میانگین چگالی نوری بیش از دو برابر چاهک شاهد و د) تشکیل بیوفیلم قوی: زمانی که

7- Average Optical Density

5 -Tissue Culture Plate

6 -Tryptic soy broth

میانگین چگالی نوری بیش از چهار برابر چاهک شاهد بود، ثبت شد.

۵- تعیین اثرات عصاره پولک بر گونه‌های

استریپتوکوکوس در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

۵-۱- تعیین اثر مهاری عصاره پولک بر گونه‌های

استریپتوکوکوس در شرایط *In vitro* با آزمون‌های MIC^۸ و MBC^۹

به منظور انجام تست MIC، در تمامی چاهک‌های میکروپلیت به غیر از چاهک اول ۱۰۰ μL محیط کشت مولر هیتون براث (Merck 1.10293.0500) و سپس رقت‌های متوالی عامل ضد میکروبی (عصاره پولک) تهیه و ریخته شد. چاهک اول فقط حاوی ۱۰۰ μL عصاره پولک و دومین چاهک حاوی ۱۰۰ μL محیط کشت و ۱۰۰ μL عصاره پولک بود. از چاهک دوم تا چاهک شماره ۹ رقت‌سازی ادامه یافت. بعد از اتمام مرحله رقت‌سازی، از چاهک ۹، ۱۰۰ μL برداشته شد تا در تمامی چاهک‌ها ۱۰۰ μL محلول داشته باشیم که حاوی رقت‌های متوالی عصاره پولک باشند. در چاهک شماره ۱۰ عصاره پولک افزوده نشده و به عنوان کنترل باکتری بود که بدلیل عدم وجود عصاره پولک نتیجه مثبت بود. چاهک شماره ۱۱ فاقد عصاره و همچنین باکتری در نظر گرفته شد که به عنوان کنترل محیط کشت بود. نتیجه آزمایش در چاهک آخر که به عنوان کنترل عصاره پولک و فاقد باکتری بود، منفی بدست آمد (جدول ۳).

در مرحله بعد باکتری‌های *استریپتوکوکوس* با قابلیت تولید بیوفیلم به مدت ۲۴ h کشت و کدورت استاندارد نیم مک‌فارلند (۱/۵ × ۱۰^۸ CFU mL^{-۱}) تهیه و به چاهک‌ها اضافه شد. ۲۰ μL هم معرف رزازورین^{۱۱} (SIGMA-) (ALDRICH Lot # MKCL9251) به چاهک‌ها افزوده شد تا به رنگ آبی مشاهده گردد [۳۰]. مقادیر نیم مک‌فارلند باکتری و معرف رزازورین به صورت یکجا در محیط کشت

براث آماده شد. در چاهک اول که فاقد محیط کشت بود رقت یکصدم از نیم مک‌فارلند و در دو چاهک آخر هم رزازورین خالص ریخته شد. سپس در انکوباتور به مدت ۲۴h در دمای ۳۷°C گذاشته و پس از آن تغییرات رنگ چاهک‌ها بررسی گردید. باکتری‌ها با رشد خود و تغییر pH باعث تغییر رنگ معرف از آبی به قرمز گردیدند (تصویر ۱). بررسی قابلیت مهار پاتوژن‌ها توسط روش پانچ با آنس نوک‌تیز^{۱۲} روی پلیت حاوی محیط کشت آگار انجام گردید [۳۰]. چاهک مشخص‌شده در آزمون MBC به همراه یک چاهک قبل و یک چاهک بعد از آن برای انجام این تست انتخاب شدند که برای حصول اطمینان بیشتر و مشاهده مهار رشد و از بین رفتن باکتری‌ها از تعداد بیشتری چاهک برداشته و روی یک میکروپلیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد (تصویر ۲).

به این صورت که ۲ μL از محیط کشت حاوی باکتری و عصاره پولک برای کشت نقطه‌ای به پلیت دارای محیط کشت MRS agar^{۱۳} (Merck 1.10660.0500) منتقل گردید، پلیت‌ها پس از خنک شدن در دمای اتاق، گرمخانه‌گذاری (۳۷°C و ۲۴h) شدند. بعد از مدت زمان مذکور رشد و عدم رشد باکتریایی برای تعیین اثر ضد میکروبی بررسی گردید [۳۰].

۵-۲- تعیین اثرات هیپوکلریت سدیم بر روی گونه‌های

استریپتوکوکوس در شرایط آزمایشگاهی

در این تحقیق تأثیر غلظت ۳ mg L^{-۱} هیپوکلریت سدیم (نوترون شیمی) بر بقاء و رشد باکتری‌های تحت مطالعه به روش انتشار در چاهک آگار بررسی شد [۳۱]. غلظت نیم مک‌فارلند از کشت باکتریایی گونه‌های *استریپتوکوکوس* تهیه و توسط یک سواب پنبه‌ای استریل در یک پلیت روی محیط کشت مولر هیتون آگار (Merck 1.05437.0500) به ضخامت ۵ mm که قبلاً چاهکی به قطر ۶ mm در مرکز آن

11 -Resazurin sodium salt

12 -Inoculating by needle

13 -De Man-Rogosa-Sharpe agar

8 -Minimum Inhibitory Concentration

9- Minimum Bactericidal Concentration

10 -Colony Forming Unit

SPSS (نسخه ۲۳، ایالات متحده آمریکا) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد ($p < 0.05$). کلیه تیمارها در سه تکرار ($n=3$) انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۱- تعیین ترکیبات زیست‌فعال عصاره

محتوای فنول کل، محتوای فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پولک مورد مطالعه در جدول ۱ خلاصه شده است.

ایجاد شده بود، به طور یکنواخت پخش شد. $30 \mu\text{L}$ از محلول هیپوکلریت سدیم (3 mg L^{-1}) داخل چاهک ریخته شد و ۲۴ h در انکوباتور در دمای 37°C قرار داده شد. سپس مهار رشد میکروبی در اطراف چاهک بررسی و قطر ناحیه بازدارنده اندازه‌گیری و ثبت شد که در جدول ۴ همراه با نتایج برخی آزمایش‌های تشخیصی آمده است [۳۱].

تحلیل آماری

داده‌های این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره پولک بر /استرپتوکوکوس تولیدکننده بیوفیلم با استفاده از نرم افزار

Table 1- Total phenolic content, Total Flavonoid and Antioxidant capacity of poulk extract

Scientific name	Total phenolics (mg GAE mL^{-1})	Flavonoids (mg QE mL^{-1})	Antioxidant capacity (%)
<i>Stachys schtschegleevii</i>	83 ± 2.6	24 ± 3.5	65 ± 2.5

با چاهک شاهد، از نظر تولید بیوفیلم ضعیف بود. همچنین میانگین چگالی نوری سه چاهک مورد استفاده برای بررسی قابلیت تولید بیوفیلم گونه /استرپتوکوکوس جدا شده از منبع سیستم آبرسانی سالن (S2-6) 0.458 بدست آمد و با توجه به تفاضل آن با چاهک کنترل، این جدایه دارای قدرت تولید بیوفیلم بالایی بود (جدول ۲).

۲- تولید بیوفیلم به روش صفحه کشت بافت (TCP)

به منظور بررسی تولید بیوفیلم با روش صفحه کشت بافت (TCP)، چگالی نوری چاهک‌ها در 570 nm توسط یک خوانشگر الیزا ارزیابی شدند [۲۹]. میانگین چگالی نوری سه چاهک مورد مطالعه در گونه /استرپتوکوکوس بدست آمده از منبع ذخیره آب (B4) 0.217 بود که با توجه به تفاوت آن

Table 2- Biofilm production by Tissue Culture Plate (TCP) method.

Sample	Obtained biofilm production	
	B4 (Storage)	S2-6 (Hall)
ELISA Titer*	0.217	0.458
Difference with Titer	0.131	0.462
Interpretation	weak	Strong

*ELISA titers (reported as mean) are obtained at 570 nm wavelength ($n=3$).

۳-۱- حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی

باکتریایی عصاره

۳- اثر عصاره پولک بر گونه‌های /استرپتوکوکوس در شرایط آزمایشگاهی:

Table 3- The results of MIC and MBC tests of Poulk extract on *Streptococci spp.*

Poulk extract concentration (mg mL^{-1})											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Sample location	Test type	200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	Bacterial control	Culture medium control	Extract control 2
Storage (B4)	MIC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Hall (S2-6)	MIC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-

تصویر ۲ نیز نتایج بررسی قابلیت مهار پاتوژن‌ها توسط روش پانچ با آنس نوک‌تیز روی پلیت حاوی محیط کشت آگار مشاهده می‌شود که چاهک مشخص‌شده در آزمون MBC به همراه چندین چاهک قبل و بعد از آن برای انجام برای حصول اطمینان بیشتر و مشاهده مهار رشد و از بین رفتن باکتری‌ها روی یک میکروپلیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد که در این آزمایش نیز نتایج آزمون MBC مشاهده شده در جدول ۳ مورد تأیید قرار گرفت.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----

A) MIC test, after incubation (Storage: B4)



B) MIC test, after incubation (Hall: S2-6)



Figure 1- MIC tests by Resazurin reagent: A) After incubation (Storage) and B) After incubation (Hall).

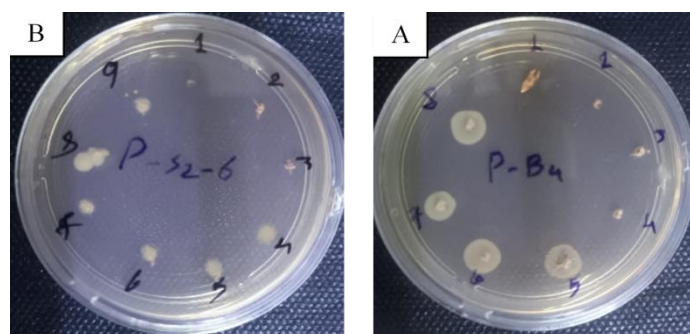


Figure 2- To ensure more certainty the inhibition of growth and destruction of bacteria, they were taken from wells and cultured on a microplate as a spot. A) Microplate (Storage: B4) – MBC – B) Microplate (Hall: S2-6) – MBC.

۴- تعیین اثرات هیپوکلریت سدیم (3 mg L^{-1}) (جدول ۴ و تصویر شماره ۳) بر جدایه‌های بدست آمده، دو جدایه بدست آمده از فارم پرورش پولت تخمگذار، دو گونه /ستریپتوکوکوس بوده که تفاوت آنها در اندازه هاله عدم رشد در برابر هیپوکلریت سدیم بیانگر تفاوت آنها از

۴- تعیین اثرات هیپوکلریت سدیم (3 mg L^{-1}) بر گونه‌های /ستریپتوکوکوس در شرایط آزمایشگاهی با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، و نیز بررسی تأثیر هیپوکلریت سدیم (mg)

نظر میزان مقاومت باکتریایی در مقابل یکی از ضد عفونی کننده های مرسوم در صنعت طیور می باشد.

Table 4- Morphological characteristics, enzymatic activity of isolated bacteria and the effect of 3 mg L⁻¹ NaClO on *Streptococci* spp.

Sample location	NaClO (3 mg L ⁻¹)						Biofilm**
	Catalase	Oxidase	OF*	Morphology	Genus	CI Inhibitory zone (mm)	
Storage (B4)	-	-	F	Cocci	<i>Streptococcus</i>	8	+
Hall (S2-6)	-	-	F	Cocci	<i>Streptococcus</i>	0	+

*Oxidative-Fermentative Test, ** Both had the ability to form biofilm.

سیتوکروم اکسیداز بوده و نتیجه تست اکسیداز منفی شد. در آزمایش کاتالاز در صورت مثبت شدن تست، حباب های زیادی بایستی مشاهده می شد که با توجه اینکه هیچ گونه حبابی مشاهده نگردید، نتیجه آزمایش کاتالاز نیز منفی بود.

در جدول ۴ در آزمون اکسیداز با توجه به اینکه هیچ گونه تغییری در رنگ محلول به وجود نیامد، باکتری های مورد آزمایش فاقد آنزیم

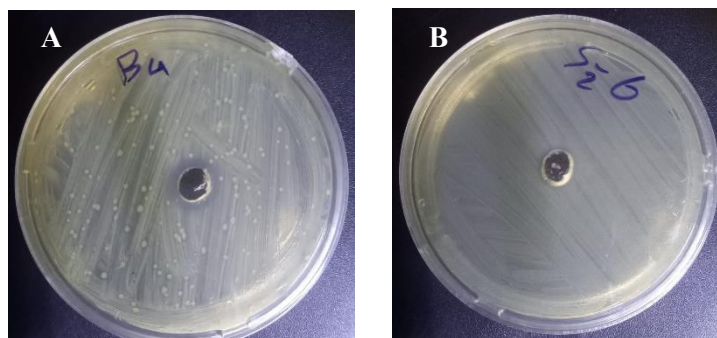


Figure 3- Agar well diffusion tests using NaClO solution: A) *Streptococci* spp. derived from storage (B4), B) *Streptococci* spp. derived from Hall (S2-6) water supply system.

در این مطالعه، باکتری های تشکیل دهنده بیوفیلم در مزارع صنعتی پرورش پोलت بررسی و دو گونه /ستریپتوکوکوس از منابع متفاوت جدا شد. مشخص شد که این گونه ها توانایی متفاوتی برای تولید بیوفیلم دارند و حتی این گونه ها حساسیت متفاوتی نسبت به تیمار و همچنین ضد عفونی کننده های معمول نشان دادند. بیوفیلم میکروارگانیسم ها شبکه ای را تشکیل می دهند که توسط یک ماتریکس خارجی از مواد پلیمری سلولی^{۱۴} احاطه شده است. این میکروارگانیسم ها می توانند به یک سطح بچسبند یا آزادانه در یک محیط مایع حرکت کنند. ساختار مواد پلیمری

نتایج آزمایش ها نشان داد عصاره هیدروآتانولی گیاه پولک دارای اثر بازدارندگی قوی در شرایط آزمایشگاهی بر گونه های /ستریپتوکوکوس جدا شده از آب مزارع صنعتی پرورش پोलت تخمگذار که توانایی تولید بیوفیلم را داشتند، می باشد. گزارش های مختلفی در سراسر جهان در مورد اثرات ضد باکتریایی گیاه دارویی پولک (*Stachys schtschegleevii*) به ویژه در طب سنتی در جامعه ایران برای درمان برخی عفونت ها وجود دارد [۳۲ و ۳۳]، بنابراین در این تحقیق اثرات ضد باکتریایی عصاره پولک در شرایط آزمایشگاهی مطالعه گردید.

خارج سلولی بسیار پیچیده بوده و شامل پلی ساکاریدها، پروتئین‌ها، DNA خارج سلولی و محصولات جانبی متابولیک است [۳۴].

اثر بخشی ضد عفونی کننده‌ها در کنترل باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلم به شدت به غلظت و مدت تماس بستگی دارد. طبق یافته فریز (۲۰۰۸)، یک ضد عفونی کننده موفق، ضد عفونی کننده‌ای است که بتواند بیش از ۹۹٪ بیوفیلم را به محض قرار گرفتن در معرض باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلم از بین ببرد [۳۵]. باکتری‌های رایج ایجادکننده بیوفیلم در مرغداری و صنایع غذایی عبارتند از: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus agalactiae* [۱۱].

گزارش شده که عصاره‌های فعال به جای باکتری‌کشی [۳۶] باکتریواستاتیک بودند. این یافته مشابه فعالیت باکتریواستاتیک *S. glutinosa* در برابر ویبریولا بود که اخیراً گزارش شده است [۳۷]. فعالیت ضد باکتریایی *S. schtschegleevii* عمدتاً به دلیل قطبیت متوسط یا ترکیبات قطبی برای مثال، فنولیک‌ها در عصاره قطبی MeOH موجود هستند. همچنین فعالیت ضد میکروبی با سایر گونه‌های از جنس *Stachys* نیز گزارش شده است [۳۸، ۳۹ و ۴۰]. یافته‌های حاضر حداقل تا حدی از کاربردهای سنتی این گیاه به‌ویژه برای درمان عفونت‌های باکتریایی و التهاب حمایت می‌کند. تعدادی از تحقیقات در مورد فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی گونه *Stachys* وجود دارد که نتایج مطالعه حاضر را تأیید می‌کند.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌ها با روش میکروتیتر رزاورین تعیین شد [۴۱]. عصاره متانولی قوی‌ترین عصاره (محدوده حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی $1.56-6.25 \text{ mg mL}^{-1}$) در بین عصاره‌ها بود. برخی از پلی‌فنول‌ها مانند الازیک و تانیک اسید، مکانیسم‌های مهار بیوفیلم قابل مقایسه‌ای را نشان می‌دهند. با این وجود، آنها به غلظت‌های بالاتر در مقایسه با فورانون‌ها برای ایجاد اثرات

معادل نیاز دارند [۴۲]. با توجه به اثرات سمی عصاره متانولی در تحقیقات قبلی، عصاره هیدروآتانولی به عنوان یک گزینه ایمن انتخاب شد تا محصول در صنایع مختلف مانند مرغداری‌ها و صنایع غذایی قابل استفاده گردد. عصاره هیدروآتانولی مورد استفاده در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی در محدوده $25 \text{ mg mL}^{-1} - 12/5$ برای گونه‌های /ستریپتوکوکوس نشان داد که مشابه گزارش سارکر و همکاران (۲۰۰۷) بود و این دامنه به دلیل گونه‌های مختلف /ستریپتوکوکوس جداسازی و مورد استفاده در این مطالعه بود [۴۱]. علاوه بر این، عصاره اتانولی سالم‌تر از عصاره متانولی است و می‌توان از آن برای محصولات انسانی، دامی و طیور نیز استفاده کرد.

نتایج ارائه شده در تصویرهای ۱ و ۲، همراه با داده‌های جدول ۳، نشان داد عصاره پولک حداقل غلظت کشندگی باکتریایی را در غلظت 25 mg mL^{-1} در برابر گونه /ستریپتوکوکوس جدا شده از منبع و همچنین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی را در غلظت 50 mg mL^{-1} علیه گونه /ستریپتوکوکوس جدا شده از سیستم آبرسانی سالن شماره ۲ نشان داد.

مقایسه خواص ضد باکتریایی عصاره پولک با هیپوکلیت سدیم (3 mg L^{-1}) بدین منظور بود که آیا امکان استفاده از چنین عصاره‌هایی به عنوان جایگزین ضد عفونی کننده‌های مرسوم در صنعت طیور وجود دارد یا خیر. با توجه به اینکه مقادیر مواد مؤثره که شرط لازم برای مقایسه قدرت بازدارندگی عصاره با هیپوکلیت سدیم می‌باشد، یکسان نبود، قطر ناحیه بازدارنده برای عصاره اندازه‌گیری نشد و قطر ناحیه بازدارنده فقط برای بررسی مقاومت گونه‌های /ستریپتوکوکوس در برابر هیپوکلیت سدیم و همچنین تفاوت بین گونه‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. بررسی اثر هیپوکلیت سدیم نشان داد که گونه جدا شده از سالن نسبت به گونه جدا شده از منبع قوی‌تر است که در مقابل هیپوکلیت هاله عدم رشد را نشان نمی‌دهد و در مواجهه با عصاره، گونه به‌دست آمده از سالن مقاومت بیشتری از خود نشان داد که بر این اساس می‌توان گفت عصاره پولک علاوه

استرپتوکوکوس با قابلیت تولید بیوفیلم جداسازی شده از سیستم آبرسانی مزارع صنعتی پرورش پोलت تخمگذار بود و عملکرد آن در برابر گونه‌های استرپتوکوکوس به صورت باکتری‌کشی بود. امیدواریم تحقیقات آتی بتواند جزئیات مواد مؤثره در عصاره گیاه پولک و همچنین نقش و سهم هر یک از این مواد مؤثره در اثرات ضدباکتریایی را روشن کند.

۵-قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تبریز (شماره ۳/ص، ۱۴۰۳/۰۲/۱۹) انجام شد.

۶-تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تعارض منافی وجود ندارد.

بر خواص مختلف اثبات شده، نسبت به این روش متداول ضدعفونی، عملکرد بهتری در برابر گونه‌های باکتریایی نظیر استرپتوکوکوس دارد و از طرف دیگر، برای مصرف کننده مضر نبوده و به صورت خوراکی نیز قابل استفاده است.

۴-نتیجه‌گیری

جایگزینی ترکیبات شیمیایی و به نوعی مضر با محصولات ارگانیک و گیاهی باعث ارتقاء مدیریت رشد و توسعه باکتری‌های ایجادکننده بیوفیلم می‌شود و حتی مؤثرتر از سیستم‌های ضدعفونی مرسوم در مزارع صنعتی عمل می‌نماید، بدون اینکه مخاطرات آسیب رساندن ضدعفونی کننده‌های شیمیایی به مصرف کننده وجود داشته باشد. یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که عصاره اتانولی گیاه پولک دارای اثر ضدباکتریایی قوی بر گونه‌های

۷-منابع

- [1] Mohammed, A.N., Mohamed, D.A., Mohamed, M.B.E. and El Bably, M.A. (2020). Assessment of Drinking Water Quality and New Disinfectants for Water Treatment in a Small Commercial Poultry Farm. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 10(4), 206-212.
- [2] Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. (2002). *Official Journal*, L 31, 1-24.
- [3] Di Martino, G., Piccirillo, A., Giacomelli, M., Comin, D., Gallina, A., Capello, K., Buniolo, F., Montesissa, C. and Bonfanti, L. (2018). Microbiological, chemical and physical quality of drinking water for commercial turkeys: a cross-sectional study. *Poultry science*, 97(8), 2880-2886.
- [4] Maes, S., Vackier, T., Nguyen Huu, S., Heyndrickx, M., Steenackers, H., Samper, I., Raes, K., Verplaetse, A., and De Reu, K. (2019). Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water systems of broiler houses. *BMC microbiology*, 19(1), 77.
- [5] Yadav, P., Verma, S., Bauer, R., Kumari, M., Dua, M., Johri, A. K., Yadav, V. and Spellerberg, B. (2020). Deciphering Streptococcal Biofilms. *Microorganisms*, 8(11), 1835.
- [6] Mateus-Vargas, R.H., Kemper, N., Volkmann, N., Kietzmann, M., Meissner, J. and Schulz, J. (2019). Low-frequency electromagnetic fields as an alternative to sanitize water of drinking systems in poultry production? *PLOS ONE*, 14(7), e0220302.
- [7] Böger, R., Rohn, K., Kemper, N. and Schulz, J. (2020). Sodium Hypochlorite Treatment: The Impact on Bacteria and Endotoxin Concentrations in Drinking Water Pipes of A Pig Nursery. *Agriculture*, 10(3):86.
- [8] Zhang, L., Liang, E., Cheng, Y., Mahmood, T., Ge, F., Zhou, K., Bao, M., Lv, L., Li, L., Yi, J., Lu, C. and Tan, Y. (2020). Is combined medication with natural medicine a promising therapy for bacterial biofilm infection?. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 128, 110184.
- [9] Xiao, X., Bai, L., Wang, S., Liu, L., Qu, X., Zhang, J., Xiao, Y., Tang, B., Li, Y., Yang, H. and Wang, W. (2022). Chlorine Tolerance and Cross-Resistance to Antibiotics in Poultry-Associated *Salmonella* Isolates in China. *Frontiers in microbiology*, 12, 833743.
- [10] Stewart P.S. (2015). Prospects for Anti-Biofilm Pharmaceuticals. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(3), 504-511.
- [11] Mondal, D. (2022). Effect of Biofilm on Production of Poultry. IntechOpen.
- [12] Brenes, A. and Eugeni, R. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology*

- *Animal Feed Science and Technology*, 158. 1-14.
- [13] Bahadori, M.B., Zengin, G., Dinparast, L. and Eskandani, M. (2020). The health benefits of three Hedgenettle herbal teas (*Stachys byzantina*, *Stachys inflata*, and *Stachys lavandulifolia*)—profiling phenolic and antioxidant activities. *European Journal of Integrative Medicine*, 36:101134.
- [14] Sadeghi, H., Mansourian, M., Panahi Kokhdan, E., Salehpour, Z., Sadati, I., Abbaszadeh-Goudarzi, K., Asfaram, A. and Doustimotlagh, A.H. (2020). Antioxidant and protective effect of *Stachys pilifera* Benth against nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. *Journal of food biochemistry*, 44(5), e13190.
- [15] Alem, W.T. (2024). Effect of herbal extracts in animal nutrition as feed additives. *Heliyon*, 10(3), e24973.
- [16] Shakeri, A., D'Urso, G., Taghizadeh, S.F., Piacente, S., Norouzi, S., Soheili, V., Asili, J. and Salarbashi, D. (2019). LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC-MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 168(25), 209–216.
- [17] Mansourian, M., Mirzaei, A., Azarmehr, N., Vakilpour, H., Kokhdan, E.P., and Doustimotlagh, A.H. (2019). Hepatoprotective and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Stachys pilifera* Benth on acetaminophen-induced liver toxicity in male rats. *Heliyon*, 5(12), e03029.
- [18] Rezazadeh, S., Kebryaezadeh, A., Piralihamedani, M., Shafiee, A. and Isfahani, S.G. (2005). Anti-inflammatory and analgesic activity of methanolic extracts of aerial parts of *Stachys schtschegleevii* Sosn. and *Stachys balansae* Boiss. and Kotschy ex Boiss in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 165-169.
- [19] Balouiri, M., Sadiki, M., Koraichi Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79.
- [20] Chitsaz, M., Mohammadi, H., Naseri, M., Kamalinezhad, M. (2007). Investigating the antibacterial effects of poulk plant (*Stachys schtschegleevii*) in vitro. *Medical Daneshvar*, 67: 1-8.
- [21] Tourabi, M., Metouekel, A., Ghouizi, A.E.L., Jeddi, M., Nouioura, G., Laaroussi, H., Hosen, M.E., Benbrahim, K.F., Bourhia, M., Salamatullah, A.M., Nafidi, H.A., Wondmie, G.F., Lyoussi, B. and Derwich, E. (2023). Efficacy of various extracting solvents on phytochemical composition, and biological properties of *Mentha longifolia* L. leaf extracts. *Scientific reports*, 13(1), 18028.
- [22] Singleton, V.L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [23] Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), Article 3.
- [24] Chen, M., Zhao, Y. and Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food chemistry*, 172, 543–550.
- [25] Patel, J., Patel, B.J., Joshi, D.V., Patel, S.S., Shreyasi, R., Parmar, R.S., Chauhan, H. and Chandel, B.S. (2017). Culture Based Isolation of Pathogenic Bacteria Associated with Respiratory Disease Complex in Broiler with Special Reference to *Ornithobacterium rhinotracheale* from India. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 11.
- [26] Abed, A., Sedik, A. and Shany, S. (2021). molecular characterization of streptococcus and enterococcus species isolated from broiler chickens. *Assiut Veterinary Medical Journal*. 67. 21-32. 10.21608/avmj.2021.205163.
- [27] Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J.J., Baddour, L.M., Barrett, F.F., Melton, D.M. and Beachey, E.H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996–1006.
- [28] Saify, H, Patidar, R.K., Khare, M., Sahare, K.N. and Singh V. (2013). Difference in biofilm development capability of vancomycin and ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Research Journal of Infectious Diseases*. 1. 1-4.
- [29] Harika, K., Shenoy, V.P., Narasimhaswamy, N. and Chawla, K. (2020). Detection of Biofilm Production and Its Impact on Antibiotic Resistance Profile of Bacterial Isolates from Chronic Wound Infections. *Journal of global infectious diseases*, 12(3), 129–134.

- [30] Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. and Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, 95(5), 1058–1069.
- [31] Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 6(2), 71–79.
- [32] Mosaddegh, M. and Naghibi, F. (2002). *Irans Traditional Medicine: Past & Present. Traditional Medicine & Materia medica*, Vol. 1, Published TMRC, Tehran, Iran, 2-20.
- [33] WHO Traditional Medicine Strategy, 2002-2005, Geneva (2002):1-3;43-47.
- [34] Flemming, H.C. and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623–633.
- [35] Fraiese, A.P. (2008). European norms for disinfection testing. *The Journal of hospital infection*, 70 (1), 8-10.
- [36] Abichandani, M., Nahar, Singh, P., Chitnis, R., Nazemiyeh, H., Delazar, A. and Sarker, S. (2010). Antibacterial and free-radical-scavenging properties of *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). *Archives of Biological Sciences*, 62 (4), 941-945.
- [37] Giorgio, P., Mario, C., Paola, M., Stefania, Z., Antonella, D. and Bruno, T. (2006). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Stachys glutinosa* L. from Sardinia. *Natural product communications 1*.
- [38] Skaltsa, H.D., Demetzos, C., Lazari, D. and Sokovic, M. (2003). Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. *Phytochemistry*, 64(3), 743–752.
- [39] Benli, M., Guney, K., Bingol, U., Geven, F. and Yigit, N. (2007). Antimicrobial activity of some endemic plant species from Turkey. *African Journal of Biotechnology*. 6(15), 1774-8.
- [40] Salehi, P., Sonboli, A. and Asghari, B. (2007). Chemical composition of the essential oil of *Stachys acerosa* and its antibacterial and antioxidant activities. *Chemistry of Natural Compounds* 43(3):339-341.
- [41] Sarker, S.D., Nahar, L. and Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods (San Diego, Calif.)*, 42(4), 321–324.
- [42] Huber, B., Eberl, L., Feucht, W. and Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Journal of biosciences*, 58(11-12), 879-884.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the inhibitory effect of poulk extract (*Stachys schtschegleevii*) on biofilm forming *Streptococcus* in vitro

Hamed Jafarzadeh^{1*}, Boukaga Farmani²

1-Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received: 2024/8/18 Accepted: 2025/2/23 Keywords: Biofilm, Bioactive compounds, <i>Streptococci</i>, Poulk extract. DOI: 10.22034/FSCT.22.163.138. *Corresponding Author E- jafarzadeh.hamed@tabrizu.ac.ir	Biofilms act as a natural form of life for some bacteria, which in pathogenic species are critical factors in causing infectious diseases. The aim of this research was to investigate the antimicrobial effects of <i>Stachys schtschegleevii</i> extract on biofilm forming <i>Streptococcus</i> isolated from the water supply system of industrial layer pullet farms. The results of biofilm production were determined by the tissue culture plate method and showed that both isolated <i>Streptococcus</i> species had the ability to produce biofilm. In order to investigate the antimicrobial activity of poulk extract, it was prepared at a concentration of 200 mg mL⁻¹ and less (by preparing serial dilution). The bioactive compounds of the extract, which included total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant capacity, were obtained as 83 mg GAE mL⁻¹, 24 mg QE mL⁻¹, and 65%, respectively. Antimicrobial activity was measured by the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) of the extract for <i>Streptococcus</i> spp. that was obtained 12.5 and 25 mg mL⁻¹ for the one derived from water storage source (B4) and 25 and 50 mg mL⁻¹, respectively for <i>Streptococcus</i> obtained from water supply system of the poultry house (S2-6). In this research, the effect of 3 mg L⁻¹ sodium hypochlorite on survival and growth of these bacteria was investigated by agar well diffusion method, and the results indicated that the <i>Streptococcus</i> isolated from water supply system of the poultry house (S2-6) was resistant to it while B4 isolate was sensitive.