

Assessing antimicrobial effects of hydroethanolic poulk (*Stachys schtschegleevii*) extract on biofilm producing *Corynebacterium* spp.

Hamed Jafarzadeh^{1*}, Boukaga Farmani^{2*}, Samad Bodbodak²

¹ Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: jafarzadeh.hamed@tabrizu.ac.ir

² Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Email: bfarmani@tabrizu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:

Received: 2025-01-09

Revised: 2025-04-15

Accepted: 2025-05-25

Keywords:

Corynebacterium
Biocontrol
Biofilm
poulk extract

ABSTRACT

Background and Objective: Ensuring the hygiene and safety of surfaces and equipment between production cycles is primarily the responsibility of manufacturers. Biofilms are a structural network of microbial cells surrounded by a layer of extracellular polymeric substances containing polysaccharides, proteins, and lipids. Biofilms are formed by microorganisms that may be attached to a surface or freely suspended in a liquid medium. Although chlorine-based disinfectants are commonly used to eliminate biofilm-forming microbes, prolonged exposure to chlorine may lead to the emergence of bacterial resistance, which is often associated with antibiotic cross-resistance. The medicinal plant *Stachys* has a high capacity to synthesize a wide range of natural compounds such as phenolic acids, flavonoids, phenylethanoid and phenylpropanoid glycosides, saponins, iridoids, diterpenoids, and steroids. These compounds have a wide range of biological activities. This study investigated the antimicrobial properties of *Stachys schtschegleevii* leaf and flower extracts on biofilm-producing *Corynebacterium* isolates in water.

Materials and Methods: In this study, biofilm-forming *Corynebacterium* isolated from water sources and water supply lines (out of a total of 24 isolates) were studied, and biofilm production was assessed using the tissue culture plate method. For this purpose, the leaves and flowers of the *Stachys* plant were collected from the Arasbaran region. After drying in the shade and grinding, the extract was extracted by cold maceration with hydroethanolic solvent (70% ethanol and 30% water) for four days with continuous stirring of the powder-solvent mixture using a laboratory stirrer. Poulk extract was prepared at concentrations of 0.78–200 mg mL⁻¹ through serial dilution to evaluate its antimicrobial activity against the isolates obtained. Analysis of the bioactive components of the extract, such as total phenol content, total flavonoids, and antioxidant capacity of the hydroethanolic extract of *Stachys* was also performed.

Results: By calculating the mean optical density (ELISA titer) for the wells, from the highest to the lowest biofilm production capacity, this value was recorded for isolate S2-4, 0.281, which showed the moderate ability of this isolate for biofilm production. It was found that isolate S1-6A with a mean optical density of 0.183 had a moderate power in terms of biofilm production. Also, the mean optical density results for isolates S2-3A and S1-7 were 0.138 and 0.108, respectively, which indicated that these two isolates were weak in terms of biofilm production. The hydroethanolic extract used in this study showed a minimum inhibitory concentration in the range of 12.5–100 mg mL⁻¹ for the four *Corynebacterium* isolates. The minimum

bactericidal concentration was 25 mg mL⁻¹ for isolate S1-6A, 50 mg mL⁻¹ for isolate S1-7, 200 mg mL⁻¹ for isolate S2-3A, and 50 mg mL⁻¹ for isolate S2-4.

Conclusion: Replacing harmful and hazardous chemical compounds with organic and plant-based compounds significantly inhibits biofilm-forming bacteria and is more effective than conventional disinfection methods. poulk extract had a significant effect on *Corynebacterium* isolates in vitro compared to the conventional disinfectant (sodium hypochlorite) at a concentration of 3 mg L⁻¹.

Cite this article: Jafarzadeh, H., Farmani, B., Bodbodak, S. 2025. Assessing antimicrobial effects of hydroethanolic poulk (*Stachys schtschegleevii*) extract on biofilm producing *Corynebacterium* spp. *Food Processing and Preservation Journal*, 17(1), 17-34.



© The Author(s).

DOI: [10.22069/fppj.2025.23171.1854](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23171.1854)

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروآتانولی گیاه پولک (*Stachys schtschegleevii*) بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم تولیدکننده بیوفیلم

حامد جعفرزاده^{۱*}، بیوک آقا فرمانی^{۲*}، صمد بدبدک^۲

^۱ استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران، رایانامه: jafarzadeh.hamed@tabrizu.ac.ir

^۲ دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز، ایران، رایانامه: bfarmani@tabrizu.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: اطمینان از بهداشت و ایمنی سطوح و تجهیزات در فواصل بین چرخه‌های تولید عمدتاً بر عهده تولیدکنندگان است. بیوفیلم‌ها یک شبکه ساختاری متشکل از سلول‌های میکروبی بوده که با یک لایه مواد پلیمری خارج سلولی حاوی پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و لیپیدها احاطه می‌شوند. بیوفیلم توسط میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌شوند که ممکن است به یک سطح چسبیده یا آزادانه در یک محیط مایع معلق باشند. اگرچه ضدعفونی‌کننده‌های بر پایه کلر معمولاً برای حذف میکروب‌های تولیدکننده بیوفیلم استفاده می‌شوند، اما قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض کلر ممکن است منجر به ظهور مقاومت باکتریایی شود که اغلب با مقاومت متقاطع آنتی‌بیوتیکی مرتبط است. گیاه دارویی <i>Stachys</i> قابلیت بالا در سنتز طیف گسترده ترکیبات طبیعی مانند فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید و فنیل پروپانوئید، ساپونین‌ها، ایریدوئیدها، دی‌ترپنوئیدها و استروئیدها دارد. این ترکیبات دارای طیف وسیع فعالیت‌های بیولوژیکی هستند. این مطالعه به منظور بررسی خواص ضد میکروبی عصاره برگ و گل گیاه پولک (<i>Stachys schtschegleevii</i>) بر جدایه‌های کورینه‌باکتریوم تولیدکننده بیوفیلم در آب انجام شد.
واژه‌های کلیدی: کورینه‌باکتریوم کنترل زیستی بیوفیلم عصاره پولک	مواد و روش‌ها: در این تحقیق کورینه‌باکتریوم‌های دارای قابلیت تولید بیوفیلم که از منابع آب و خطوط آب‌رسانی جداسازی شده بودند (از مجموع ۲۴ جدایه)، مورد بررسی قرار گرفتند که ارزیابی تولید بیوفیلم با روش صفحه کشت بافت انجام گردید. برای این منظور برگ و گل گیاه پولک از منطقه ارسباران جمع‌آوری شد و پس از خشک کردن در سایه و آسیاب، عمل استخراج عصاره به روش خیساندن سرد (ماسراسیون)، با حلال هیدروآتانولی (۷۰٪ اتانول و ۳۰٪ آب) به مدت چهار روز با هم زدن مداوم مخلوط پودر-حلال با استفاده از همزن آزمایشگاهی انجام شد. عصاره پولک در غلظت‌های 200 mg mL^{-1} - 0.78 از طریق رقت‌سازی سریالی به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن بر علیه جدایه‌های به دست آمده، تهیه شد. آنالیز ترکیبات زیست فعال عصاره مانند محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروآتانولی پولک نیز انجام شد.

یافته‌ها: با محاسبه میانگین چگالی نوری (تیترا لایزا) برای چاهک‌ها، به ترتیب از بیشترین قابلیت تولید بیوفیلم تا کمترین آن‌ها این مقدار برای جدایه S2-4، ۰/۲۸۱ ثبت شد که قدرت متوسط این گونه برای تولید بیوفیلم را نشان داد. مشخص شد که جدایه S1-6A با میانگین چگالی نوری ۰/۱۸۳ از نظر تولید بیوفیلم دارای قدرت متوسط می‌باشد. همچنین نتایج میانگین چگالی نوری برای جدایه‌های S2-3A و S1-7 به ترتیب ۰/۱۳۸ و ۰/۱۰۸ به دست آمد که حاکی از آن بود که این دو جدایه از نظر تولید بیوفیلم ضعیف بودند. عصاره هیدروآتانولی مورد استفاده در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی را در محدوده $100 - 12/5 \text{ mg mL}^{-1}$ برای چهار جدایه کورینه‌باکتریوم نشان داد. حداقل غلظت کشندگی 25 mg mL^{-1} برای جدایه S1-6A، 50 mg mL^{-1} برای جدایه S1-7، 200 mg mL^{-1} برای جدایه S2-3A و 50 mg mL^{-1} برای جدایه S2-4 به دست آمد.

نتیجه‌گیری: جایگزینی ترکیبات شیمیایی مضر و خطرناک با ترکیبات آلی و گیاهی به‌طور قابل توجهی باعث مهار باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم شده و موثرتر از روش‌های ضدعفونی رایج است. عصاره پولک تأثیر قابل توجهی بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم در شرایط آزمایشگاهی (In vitro) در مقایسه با ضدعفونی‌کننده مرسوم (هیپوکلریت سدیم) در غلظت 3 mg L^{-1} داشت.

استناد: جعفرزاده، حامد؛ فرمانی، بیوک‌آقا؛ بدبدک، صمد. (۱۴۰۳). بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره هیدروآتانولی گیاه پولک (*Stachys schtschegleevii*) بر گونه‌های کورینه باکتریوم تولیدکننده بیوفیلم. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۷ (۱)، ۳۴-۱۷.



© نویسندگان.

DOI: [10.22069/fppj.2025.23171.1854](https://doi.org/10.22069/fppj.2025.23171.1854)

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

آب با کیفیت بالا برای تولید بهینه و ایمن ضروری است که به نوبه خود بر سلامت عمومی انسان‌ها نیز تأثیر می‌گذارد (۳). بیوفیل‌ها یک شبکه ساختاری متشکل از سلول‌های میکروبی بوده که با یک لایه مواد پلیمری خارج سلولی حاوی پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها و لیپیدها احاطه می‌شوند. بیوفیل‌ها توسط میکروارگانیسم‌هایی ایجاد می‌شوند که ممکن است به یک سطح چسبیده یا آزادانه در یک محیط مایع معلق باشند (۴). تصور می‌شود تشکیل بیوفیل‌ها به عنوان یک استراتژی محافظتی برای سلول‌های باکتریایی در پاسخ به شرایط محیطی چالش‌برانگیز پدید آمده است که هم پایداری و هم دفاع را سبب می‌شود، فرآیندی که احتمالاً با تکامل پروکاریوت‌ها طی میلیاردها سال پیش آغاز شده است (۵). یک نگرانی قابل توجه در بیوفیل‌ها، افزایش مقاومت یا تحمل آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها است (۶). اثر ضدعفونی‌کننده‌ها در مدیریت باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیل‌ها به طور قابل توجهی تحت تأثیر غلظت ضدعفونی‌کننده و مدت زمانی است که در تماس با سطح باقی می‌ماند. اگرچه ضدعفونی‌کننده‌های بر پایه کلر معمولاً در سراسر زنجیره تأمین طیور استفاده می‌شوند اما قرار گرفتن طولانی مدت در معرض کلر ممکن است منجر به ظهور مقاومت باکتریایی شود که اغلب با مقاومت متقاطع آنتی‌بیوتیکی مرتبط است (۷). همانطور که موندال (۲۰۲۲) اشاره کرد، یک ضدعفونی‌کننده زمانی مؤثر نامیده می‌شود که قادر به حذف ۹۹/۹۹ درصد باکتری‌های تولیدکننده بیوفیل باشد. باکتری‌های معمول ایجادکننده بیوفیل در کارخانجات صنایع غذایی، مرغداری‌ها و گاو‌داری‌ها عبارت‌اند از: *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس*، *شریشیاکلا* و *استرپتوکوکوس* (۸). تحقیقات نشان داده‌اند که

میکروارگانیسم‌های مختلفی سطوح داخلی سیستم‌های انتقال آب را آلوده و باعث تولید بیشتر بیوفیل شدند (۹). پس از استقرار در سطوح داخلی سیستم‌های انتقال آب، باکتری‌ها تنها به میزان بسیار محدودی تحت تأثیر روش‌های تمیز کردن و ضدعفونی قرار می‌گیرند (۱۰). جنس *کورینه‌باکتریوم* به عنوان یکی از اولین گروه‌های شناسایی شده با خصوصیت گرم مثبت و کاتالاز مثبت است که گونه‌های آن به صورت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری طبقه‌بندی می‌شوند، معمولاً شکل میله‌ای غیر متحرک دارند. اخیراً، مقالات متعددی بروز عفونت مختلف با منشأ گونه‌های *کورینه‌باکتریوم* را گزارش کرده‌اند (۱۱).

جنس *کورینه‌باکتریوم* شامل گونه‌های دیفتریک و غیردیفتریک است که در مجموع به عنوان دیفتروئید شناخته می‌شوند (۱۲). در شرایط حاضر، مواجهه با *کورینه‌باکتریوم* غیردیفتریایی با انواع عفونت‌ها از جمله مننژیت، آرتریت سپتیک و عفونت‌های دستگاه ادراری مرتبط، شایع‌تر است. علاوه بر این، *کورینه‌باکتریوم* غیردیفتریایی مسئول بیماری‌های مزمن و تحت‌بالینی در حیوانات اهلی است که به طور بالقوه منجر به خسارات اقتصادی قابل توجهی برای کشاورزان می‌شود (۱۳). همانطور که آلم (۲۰۲۴) بیان کرد، علاقه فزاینده‌ای به گیاهان دارویی و ترکیبات آروماتیک و عصاره آن‌ها وجود دارد. عصاره‌های گیاهی دارای ترکیباتی هستند که عملکرد و کیفیت دام را افزایش می‌دهند. بسیاری از این عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات با خواص مفید متنوع از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، ضد کوکسیدیوز و ضد کرم می‌باشند (۱۴). در یک تحقیق عیسی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) مقایسه‌ای بین تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج بر روی شاخص‌های باکتریایی انجام داده و اعلام کردند که

(۱۶). این مطالعه به منظور بررسی خواص ضد میکروبی عصاره هیدروآتانولی *Stachys schtschegleevii* بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم تولیدکننده بیوفیلم در آب انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروآتانولی گیاه پولک (*Stachys schtschegleevii*): برای این منظور برگ و گل گیاه پولک از منطقه ارسباران جمع‌آوری و پس از خشک کردن در سایه و آسیاب، عمل استخراج به روش خیساندن سرد (ماسراسیون)، با حلال هیدروآتانولی (۷۰ درصد اتانول و ۳۰ درصد آب) به مدت چهار روز با همزدن مداوم مخلوط پودر-حلال با استفاده از شیکر آزمایشگاهی انجام شد. پس از استخراج، از پارچه صافی برای جداسازی عصاره از تفاله و برای حذف اتانول از عصاره، از اواپراتور چرخشی تحت خلاء در دمای ۵۵ °C استفاده شد. عصاره به دست آمده در ظروف شیشه‌ای تیره در بسته تا انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شد (۱۷).

اندازه‌گیری ترکیبات زیست فعال

۱- **اندازه‌گیری فنول کل:** فنول کل عصاره با روش سینگلتن و همکاران (۱۹۹۹) و اندازه‌گیری جذب نمونه در طول موج ۷۶۵ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر (JENWAY 6405 UV/Vis, UK) انجام شد. این روش بر اساس کاهش معرف فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu reagent) توسط ترکیبات فنولی و تشکیل کمپلکس آبی‌رنگ در محیط قلیایی است که به صورت طیف‌سنجی در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. محتوای فنول کل به صورت معادل گالیک اسید (mg GAE mL^{-1} extract) گزارش شد (۱۸).

محدوده حداقل غلظت مهارکنندگی^۱ عصاره الکلی اسفناج در مقابل برخی گونه‌های بیماریزای مورد تحقیق ۱۰۳۹۳-۴۱۵۸۰ ppm بوده و در مقایسه با عصاره آبی کمتر می‌باشد که نشان‌دهنده قدرت ضدباکتریایی بیشتر عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی می‌باشد (۱). آن‌ها همچنین اعلام کردند که وجود ترکیبات فلاونوئیدی و ترپن‌ها احتمالاً یکی از مهم‌ترین عوامل بازدارندگی بیشتر اسفناج روی باکتری گرم منفی اشریشیاکلای بوده و این عصاره می‌تواند به عنوان یک نگهدارنده و آنتی‌بیوتیک طبیعی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد (۱). همچنین نتایج آزمون‌های ضد میکروبی در یک تحقیق نشان داده است که باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* حساسیت بیشتری نسبت به عصاره اتانولی داشته و در غلظت برابر از عصاره‌های آبی و اتانولی، باکتری‌های گرم مثبت نسبت به انواع باکتری‌های گرم منفی حساسیت بالاتری نشان دادند (۲).

جنس *Stachys* مجموعه‌ای متنوع از گیاهان دارویی (حدود ۳۰۰ گونه) را شامل می‌شود و حاوی گیاهان یکساله و چندساله به همراه درختچه‌ها است (۱۴). جنس *Stachys* قابلیت بالایی در سنتز طیف گسترده ترکیبات طبیعی مانند فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید و فنیل پروپانوئید، ساپونین‌ها، ایریدوئیدها، دیتروپنوئیدها و استروئیدها دارد. این ترکیبات دارای طیف وسیع فعالیت‌های بیولوژیکی هستند (۱۵). از میان ۳۴ گونه *Stachys* شناسایی شده در ایران، *Stachys schtschegleevii*، به طور سنتی پولک^۲ نیز گفته می‌شود، در طب سنتی ایران برای درمان بیماری‌های التهابی تنفسی از جمله آسم، سینوزیت و سرماخوردگی استفاده می‌شود. علاوه بر این، اثرات ضدباکتریایی و اثربخشی آن در درمان روماتیسم و عفونت‌های مجاری ادراری هم گزارش شده است

² Poulk

¹ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

۲- اندازه‌گیری فلاونوئید کل: محتوای فلاونوئید کل عصاره با روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم در طول موج ۵۱۰ nm با استفاده از اسپکتروفتومتر (JENWAY 6405 UV/Vis, UK) تعیین و به صورت معادل کوئرستین ($\text{mg QE mL}^{-1} \text{ extract}$) بیان شد (۱۹). اساس این روش بر پایه تشکیل کمپلکس رنگی بین فلاونوئیدها و یون آلومینیوم (Al^{3+}) استوار است که در طول موج ۵۱۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است.

۳- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی: برای این منظور از روش مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm به وسیله اسپکتروفتومتر استفاده شد (۲۰)، که رادیکال DPPH (بنفش رنگ) با پذیرش الکترون از آنتی‌اکسیدان‌ها به فرم کاهش‌یافته (زردرنگ) تبدیل می‌شود. درصد مهار DPPH توسط عصاره (μL) ۱۵۰ عصاره) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

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

که: A_c جذب محلول کنترل و A_s جذب نمونه است. **جداسازی جنس کورینه‌باکتریوم:** نمونه‌های آب از منبع و سیستم آبرسانی چند واحد صنایع غذایی جمع‌آوری و در آزمایشگاه میکروبیولوژی آنالیز شده و شناسایی انجام گرفت. ایزوله‌های بدست آمده که دارای قابلیت تولید بیوفیلم بودند ابتدا در محیط کشت BHI Agar (Merck 1.13825.0500, Germany) کشت و نگهداری شدند (۲۱). بعد از استحصال کلونی خالص در محیط کشت BHI Agar (Merck 1.13825.0500, Germany)، اسمیر باکتریایی ایزوله‌ها روی لام تهیه و با روش استاندارد گرم رنگ‌آمیزی شد. بعد از رنگ‌آمیزی، شکل، اندازه و آرایش تجمعی باکتری‌ها از نظر مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت و باکتری‌هایی که گرم‌مثبت، به شکل میله‌های نامنظم (پلئومورفیک) با انتهای دوک‌مانند یا به صورت

سلول‌های منفرد، زوجی یا دارای آرایش ۷ شکل مشاهده شدند، انتخاب گردیدند.

تست‌های بیوشیمیایی مختلف نظیر آزمون‌های اکسیداز (Merck Cat # 13300, Germany) و کاتالاز (Merck Cat # 11351, Germany) و کشت در محیط کشت اکسیداتیو-فرمانتاتیو (Merck Cat # 10282, Germany) به مدت ۲۴ h در 37°C بعنوان تست‌های تأییدی انجام شدند (۲۲).

ارزیابی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های کورینه‌باکتریوم با روش صفحه کشت بافت (TCP): روش صفحه کشت بافت برای تشخیص تشکیل بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت (۲۳). کلنی‌ها از محیط کشت BHI Agar به محیط کشت TSB^۱ (Merck 1.05459.0500, Germany) حاوی گلوکز در لوله انتقال و به مدت ۲۴ h در 37°C در گرمخانه قرار گرفتند. سپس سوسپانسیون میکروبی نیم مک‌فارلند ($1 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$) تهیه و به میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی انتقال یافت. به هر چاهک $100 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون میکروبی به همراه $180 \mu\text{L}$ محیط کشت TSB اضافه و میکروپلیت‌ها دوباره در 37°C به مدت ۲۴ h انکوبه شدند. بررسی تولید بیوفیلم در سه تکرار اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، ۲ چاهک به عنوان کنترل منفی و یک چاهک به عنوان کنترل مثبت باکتری کنار گذاشته شد و به هر کدام $180 \mu\text{L}$ از محیط TSB اضافه شد. پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته، محتویات میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی دور ریخته و با آب مقطر شسته شدند. سپس $200 \mu\text{L}$ متانول ۹۹ درصد در دمای اتاق به مدت ۱۵ min برای تثبیت به هر چاهک اضافه شد. پس از برداشتن محتویات چاهک، میکروپلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق خشک شد. برای رنگ‌آمیزی چاهک‌ها، $200 \mu\text{L}$ کریستال ویولت (۱ درصد) (Neutron pharmaceutical Co.)

^۱ Tryptic soy broth

اتاق نگهداری و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شد (۲۴). در مرحله پایانی، ۲۰۰ μL اسید استیک گلاسیال ۳۰ درصد (Merck CAS # 100063, Germany) به هر چاهک اضافه و مخلوط به مدت ۳۰ min در دمای اتاق انکوبه شد. سپس چگالی نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از دستگاه خوانشگر الایزا (Hiperion Microplate reader, MPR4+, Germany) اندازه‌گیری شد (۲۵). سپس میانگین چگالی نوری برای چاهک‌ها محاسبه و با چاهک شاهد مقایسه گردید و نتایج به صورت الف) عدم تشکیل بیوفیلم؛ میانگین چگالی نوری کمتر یا مساوی چاهک کنترل، ب) تشکیل بیوفیلم ضعیف: میانگین چگالی نوری کوچک‌تر از دو برابر چاهک شاهد، ج) توسعه بیوفیلم: چگالی نوری بزرگ‌تر از دو برابر چاهک شاهد و د) تشکیل بیوفیلم قوی: میانگین چگالی نوری بیشتر از چهار برابر چاهک شاهد، به دست آمد (۲۵).

بررسی اثر ضد میکروبی عصاره پولک بر جدایه‌های کورینه باکتریوم

۱- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)^۱ عصاره پولک بر جدایه‌های کورینه باکتریوم: برای بررسی حداقل غلظت مهار، ۱۰۰ μL محیط کشت مولر هیتون براث (Merck 1.10293.0500) به همه چاهک‌های میکروپلیت، به استثنای چاهک آخر، اضافه شد. سپس رقت‌های سریالی از عصاره پولک به عنوان عامل ضد میکروبی، تهیه گردید. چاهک آخر فقط حاوی ۱۰۰ μL از عصاره پولک بود، در حالی که چاهک اول شامل ۱۰۰ μL محیط کشت همراه با ۱۰۰ μL عصاره پولک بود و فرآیند رقت سازی از چاهک اول تا چاهک ۹ ادامه یافت (از غلظت ۲۰۰ mg mL^{-1} تا غلظت

0.78 mg mL^{-1} به صورت سریالی). پس از اتمام رقت سازی، ۱۰۰ μL از چاهک ۹ برداشته شد تا اطمینان حاصل شود که تمام چاهک‌های حاوی رقت‌های متوالی عصاره پولک با حجم یکسان ۱۰۰ μL هستند. چاهک شماره ۱۰ به عنوان کنترل مثبت حاوی محیط کشت و باکتری، چاهک شماره ۱۱ به عنوان کنترل محیط کشت که فقط حاوی محیط کشت بود و فاقد عصاره و باکتری بود و چاهک شماره ۱۲ (چاهک آخر) فقط حاوی عصاره بود و فاقد محیط کشت و باکتری بود برای کنترل عصاره پولک در نظر گرفته شد. در مرحله بعد ۱۰ μL سوسپانسیون میکروبی نیم مک فارلند (CFU mL^{-1} 1.0×10^8) از جدایه‌های کورینه باکتریوم به همه چاهک‌ها به غیر از چاهک‌های ۱۰ و ۱۱ اضافه شد و سپس ۲۰ μL شناساگر رزازورین^۲ (SIGMA-ALDRICH Lot # MKCL9251) به همه چاهک‌ها اضافه شد که منجر به تشکیل رنگ آبی گردید. نهایتاً میکروپلیت به مدت ۲۴ h در 37°C گرمخانه‌گذاری شد و پس از آن تغییرات رنگ در چاهک‌ها بررسی شدند. تکثیر باکتری‌ها و تغییر pH، منجر به تغییر رنگ شناساگر شد که در نهایت رنگ چاهک از آبی به قرمز تغییر یافت.

برای ارزیابی قابلیت مهار پاتوژن‌ها، از روش تلقیح توسط سوزن تلقیح داخل محیط کشت آگار یا روش نقطه‌گذاری در آگار^۳ استفاده شد. چاهک‌های تعیین شده برای آزمون حداقل غلظت بازدارندگی همچنین چاهک‌های قبل و بعد از آن‌ها برای این ارزیابی انتخاب شدند. برای افزایش قابلیت اطمینان نتایج و مشاهده مهار رشد و تخریب باکتری‌ها، تعداد بیشتری از چاهک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و روی یک پلیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد. به این ترتیب ۲ μL

³ Spot Inoculation Method

¹ Minimum Bactericidal Concentration

² Resazurin sodium salt

قرار گرفتند و قطر ناحیه بازدارنده اندازه‌گیری و ثبت شد که این بررسی‌ها برای هر کدام از جدایه‌های انجام گردید (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری

این پژوهش بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام شد که تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره پولک بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم بررسی گردید که با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۳، USA) داده‌ها آنالیز شدند. میانگین‌ها و خطای استاندارد برای تیمارها محاسبه شد و تمامی تیمارها در سه تکرار (n=3) انجام شد که مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون تعقیبی دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات زیست‌فعال عصاره هیدروآتانولی پولک: نتایج مربوط به ترکیبات زیست‌فعال عصاره هیدروآتانولی پولک در جدول ۱ آمده است که مشتمل بر محتوای فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پولک می‌باشد.

جدول ۱- میزان فنول کل، فلاونوئید کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پولک.

Table 1. Total phenolics, total Flavonoids and antioxidant capacity of poulk extract.

نام علمی Scientific name	فنول کل Total phenolics (mg GAE mL ⁻¹)	فلاونوئید کل Flavonoids (mg QE mL ⁻¹)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (درصد) Antioxidant capacity (%)
<i>Stachys schtschegleevii</i>	83 ± 2.6	24 ± 3.5	65 ± 2.5

بر روی کورینه‌باکتریوم که یک باکتری گرم مثبت می‌باشد را مورد بررسی قرار داده بودند و علت این اثرات را ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاه گزارش نمودند (۲۸).

عصاره گیاه پولک (*Stachys schtschegleevii*) به‌عنوان منبعی غنی از ترکیبات زیست‌فعال با خواص

از محیط کشت باکتریایی مخلوط با عصاره پولک روی پلیت حاوی محیط کشت^۱ MRS agar (Merck 1.10660.0500, Germany) تلقیح شد. پلیت‌ها پس از خنک شدن در دمای اتاق، در شرایط هوازی به مدت ۲۴ h در ۳۷ °C نگهداری شدند. سپس وجود یا عدم وجود رشد باکتری برای ارزیابی اثر ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۶).

۲- ارزیابی تأثیر هیپوکلریت سدیم بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم در شرایط *In vitro*: غلظت نیم مک فارلند از کشت باکتریایی ۲۴ ساعته جدایه‌های کورینه‌باکتریوم تهیه شد. سپس این رقت به‌طور یکنواخت در سطح یک محیط کشت توسط سواب پنبه‌ای استریل روی پلیت حاوی ضخامت ۵ mm مولر هیتون آگار، جایی که قبلاً یک چاهک با قطر ۶ mm در مرکز آن ایجاد شده بود، پخش گردید. پس‌از آن، ۳۰ µL از محلول هیپوکلریت سدیم با غلظت mg L⁻¹ ۳ به چاهک اضافه و پلیت به مدت ۲۴ h در ۳۷°C انکوبه شد. پس از انکوباسیون، پلیت‌ها برای هرگونه مهار رشد میکروبی در اطراف چاهک مورد بررسی

تحقیقات بر روی گونه‌های مختلف جنس *Stachys* نشان‌دهنده وجود خصوصیات آنتی‌باکتریال قوی در این جنس بوده که بر انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی تأثیرگذار می‌باشد که نتایج تحقیق حاضر مشابه یافته‌های به دست آمده توسط سایر پژوهشگران بود که اثرات آنتی‌باکتریال عصاره این گیاه

^۱ De Man–Rogosa–Sharpe agar

ضدمیکروبی شناخته می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که این عصاره می‌تواند اثرات قابل توجهی بر باکتری‌های بیماری‌زا از جمله کورینه‌باکتریوم داشته باشد. حضور ترکیبات فیتوشیمیایی متنوعی مانند فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه در این عصاره، مسئول فعالیت ضدباکتریایی آن است. این ترکیبات از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تخریب ساختار غشای سلولی، اختلال در متابولیسم باکتری، مهار آنزیم‌های کلیدی و القای استرس اکسیداتیو، مانع رشد و تکثیر باکتری‌ها می‌شوند (۲۹). یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های اثر این عصاره، تأثیر آن بر یکپارچگی غشای سلولی کورینه‌باکتریوم است. ترکیبات موجود در عصاره با افزایش نفوذپذیری غشای باکتری، باعث نشت مواد درون‌سلولی و در نهایت مرگ باکتری می‌شوند (۳۰). این مکانیسم به‌ویژه در باکتری‌های گرم‌مثبت مانند کورینه‌باکتریوم مؤثر است. علاوه بر این، فلاونوئیدهای موجود در عصاره با اختلال در مسیرهای متابولیکی ضروری، تولید انرژی و سایر فرآیندهای حیاتی باکتری را مختل می‌کنند (۳۱). همچنین عصاره *Stachys schtschegleevii* با مهار آنزیم‌های کلیدی مانند کاتالاز و پراکسیداز، منجر به کاهش تولید انرژی و اختلال در متابولیسم باکتری می‌شود (۳۲). از سوی دیگر، ترکیبات این عصاره با القای استرس اکسیداتیو و تولید رادیکال‌های آزاد، باعث آسیب‌های ساختاری و عملکردی در باکتری شده و در نهایت مرگ آن را تسریع می‌کنند (۲۹).

جداسازی جنس کورینه‌باکتریوم: جدایه‌های باکتریایی خالص که به‌صورت باسیل یا کوکوباسیل‌های هوازی یا بی‌هوازی اختیاری در محیط کشت اکسیداتیو-فرمانتاتیو و آزمون اکسیداز، گرم مثبت در رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز مثبت در تست کاتالاز

شناسایی شدند، به‌عنوان کورینه‌باکتریوم در نظر گرفته شدند (۳۳، ۳۴). درکل تعداد ۲۴ جدایه از جنس‌های مختلف نظیر کورینه‌باکتریوم، استافیلوکوکوس، استرپتوکوکوس، نوکاردیا و... به دست آمد که در این مقاله به بررسی جدایه کورینه‌باکتریوم پرداخته شده است.

در مطالعات مختلف، گونه‌های کورینه‌باکتریوم از منابع متفاوت غذایی و طیور جداسازی شده‌اند. بر اساس تحقیقات علیبی و همکاران (۲۰۱۶) گونه‌های مختلف کورینه‌باکتریوم نظیر *C. pseudotuberculosis*، *C. kutscheri* و *C. canis* در حیوانات معرفی شده‌اند که می‌توانند در انسان هم مشکل ساز باشند. همچنین اعلام شده است که گونه *C. glutamicum* نیز در پروسه‌های بیولوژیک و کارهای ژنتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین مشخص شده است که گونه‌های کورینه‌باکتریوم در شیر، پنیر، سبزیجات، غذاهای دریایی و محصولات گوشتی حضور دارند (۳۵). در مطالعه دیگری *C. diphtheriae* از طیور گوشتی در نیجریه جداسازی شده است (۳۴).

تأیید تولید بیوفیلم توسط گونه‌های کورینه‌باکتریوم با روش صفحه کشت بافت: با محاسبه میانگین چگالی نوری برای چاهک‌ها، در جدایه S1-6A میانگین تیترا لایزا ۰/۱۸۳ به دست آمد که مقایسه آن با چاهک شاهد نشان داد که از نظر تولید بیوفیلم دارای قدرت متوسط می‌باشد. میانگین چگالی نور در آزمون لایزا برای جدایه S2-4، ۰/۲۸۱ ثبت شد که قدرت متوسط این گونه را نیز برای تولید بیوفیلم نشان می‌دهد. همچنین نتایج میانگین چگالی نوری برای جدایه‌های S1-7 و S2-3A که به ترتیب ۰/۱۰۸ و ۰/۱۳۸ به‌دست آمدند حاکی از آن بودند که این دو جدایه از نظر تولید بیوفیلم ضعیف هستند که نتایج این بررسی‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- قدرت تولید بیوفیلم توسط جدایه‌های کورینه‌باکتریوم با استفاده از روش صفحه کشت بافت.

Table 2. Investigation of biofilm production with Tissue Culture Plate technique for *Corynebacterium* spp.

نمونه‌ها Samples	S1-6A			S1-7			S2-3A			S2-4		
تیترا لایزا ELISA Titer*	0.107	0.334	0.109	0.152	0.08	0.094	0.163	0.125	0.128	0.143	0.578	0.123
میانگین تیترا Average titer	0.183			0.108			0.138			0.281		
شاهد Control	0.086			0.086			0.086			0.086		
اختلاف با شاهد Difference with control	0.097			0.022			0.052			0.195		
تفسیر Interpretation	متوسط Moderate			ضعیف Weak			ضعیف Weak			متوسط Moderate		

*ELISA titers are obtained at 570 nm wavelength

(تیتراهای لایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر به دست آمده‌اند)

متانولی در محدوده $1/56 - 6/25 \text{ mg mL}^{-1}$ گزارش شده است (۳۶). برخی از پلی‌فنول‌ها، مانند الازیک و تانیک اسید، مکانیسم‌های مهار بیوفیلم قابل مقایسه‌ای را نشان می‌دهند. با این وجود، در مقایسه با فورانون‌ها برای ایجاد اثرات مشابه نیاز به غلظت‌های بالای آن‌ها وجود دارد (۳۷).

نتایج مطالعه دیگری که تأثیر عصاره متانولی گونه‌های متنوع جنس *Stachys* را مورد بررسی قرار داده و MIC را در محدوده $1/25 - 10 \text{ mg mL}^{-1}$ گزارش کرده است (۳۸) که مشابه مطالعه سارکر و همکاران (۲۰۰۷) بوده و تفاوت موجود بین آن‌ها و تحقیق حاضر علاوه بر تفاوت در گونه گیاهی مورد مطالعه، می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع عصاره مورد مطالعه نیز باشد. البته خاطرنشان می‌شود که در تحقیق جسبی و همکاران (۲۰۱۳) برخی از عصاره‌ها در مقابله با برخی گونه‌های باکتریایی فعال نبوده و عملاً ممانعتی از رشد باکتری‌ها نشان ندادند (۳۸).

تأثیر MIC و MBC عصاره پولک بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم در شرایط *In vitro*: با توجه به اثرات سمی عصاره متانولی در تحقیقات قبلی، عصاره هیدروآتانولی ایمن انتخاب شد و این محصول در صنایع مختلف مانند مرغداری‌ها و صنایع غذایی قابل استفاده است. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، عصاره هیدروآتانولی مورد استفاده در این تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی را در محدوده $1/100 - 12/5 \text{ mg mL}^{-1}$ برای چهارگونه کورینه‌باکتریوم نشان داد که مشابه نتایج سارکر و همکاران (۲۰۰۷) می‌باشد و دامنه عددی به دست آمده احتمالاً به دلیل گونه‌های مختلف جداسازی شده و مورد استفاده در این مطالعه بود. علاوه بر این، عصاره هیدروآتانولی سالم‌تر از عصاره متانولی بوده و می‌توان از آن برای محصولات انسانی، حیوانی و طیور نیز استفاده کرد. در یک تحقیق حداقل غلظت مهارکنندگی عصاره پولک با روش میکروتیترا رزازورین با استفاده از عصاره

جدول ۳- نتایج ارزیابی‌های MIC و MBC عصاره پولک بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم.

Table 3. The outcomes of MIC and MBC assessments of Poulk extract on *Corynebacterium* spp.

		Poulk extract concentration (mg mL ⁻¹)										غلظت عصاره پولک (میلی گرم بر میلی لیتر)	
محل نمونه Sample location	Test type	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		200	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.56	0.78	کنترل باکتریایی Bacterial control	کنترل محیط کشت Culture medium control	کنترل عصاره Extract control
S1-6A	MIC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	-	-	-	+	+	+	+	+			
S1-7	MIC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	-	-	+	+	+	+	+	+			
S2-3A	MIC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	+	+	+	+	+	+	+	+			
S2-4	MIC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-
	MBC	-	-	-	-	+	+	+	+	+			

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

الف) ارزیابی MIC: قبل از اینکوباسیون

A) MIC assessment: before incubation



ب) ارزیابی MIC: بعد از اینکوباسیون (S1-6A)

B) MIC assessment: after incubation (S1-6A)



ج) ارزیابی MIC: بعد از اینکوباسیون (S1-7)

C) MIC assessment: after incubation (S1-7)



د) ارزیابی MIC: بعد از اینکوباسیون (S2-3A)

D) MIC assessment: after incubation (S2-3A)



ی) ارزیابی MIC: بعد از اینکوباسیون (S2-4)

E) MIC assessment: after incubation (S2-4)

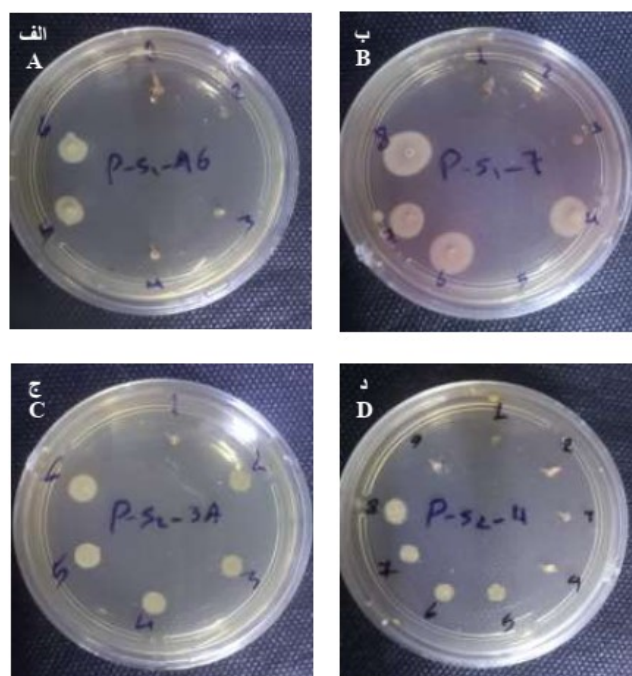


شکل ۱- ارزیابی MIC با شناساگر رزازورین: الف) قبل از اینکوباسیون، ب) بعد از اینکوباسیون (S1-6A)، ج) بعد از اینکوباسیون (S1-7)، د) بعد از اینکوباسیون (S2-3A)، ی) بعد از اینکوباسیون (S2-4).

Figure 1. MIC assessments by Resazurin indicator: A) before inoculation, B) after incubation (S1-6A), C) after incubation (S1-7), D) after incubation (S2-3A), E) after incubation (S2-4).

^۱ ۱۰ - ۱/۲۵ گزارش کرده است (۳۸) که مشابه مطالعه سارکر و همکاران (۲۰۰۷) بوده و تفاوت موجود بین آن‌ها و تحقیق حاضر علاوه بر تفاوت در گونه گیاهی مورد مطالعه، می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع عصاره مورد مطالعه نیز باشد. البته خاطرنشان می‌شود که در تحقیق جسیبی و همکاران (۲۰۱۳) برخی از عصاره‌ها در مقابله با برخی گونه‌های باکتریایی فعال نبوده و عملاً ممانعتی از رشد باکتری‌ها نشان ندادند (۳۸).

بررسی تصویرهای ۱ و ۲ و همچنین جدول ۳، نشان می‌دهند عصاره پولک (*Stachys schtschegleevii*) حداقل غلظت کشندگی $mg\ mL^{-1}$ ۲۵ در برابر گونه کورینه باکتریوم با کد S1-6A، $mg\ mL^{-1}$ ۵۰ در برابر گونه کورینه باکتریوم با کد S1-7، $mg\ mL^{-1}$ ۲۰۰ در برابر گونه کورینه باکتریوم با کد S2-3A و $mg\ mL^{-1}$ ۲۵ در برابر گونه کورینه باکتریوم با کد S2-4 به دست آمد. نتایج مطالعه دیگری که تأثیر عصاره متانولی گونه‌های متنوع جنس *Stachys* را مورد بررسی قرار داده و MIC را در محدوده $mg\ mL^{-1}$



شکل ۲- برای افزایش قابلیت اطمینان از مهار رشد و تخریب باکتری، نمونه‌ها از چاهک‌ها استخراج و بر روی پلیت با سوزن کشت تلقیح شدند که به صورت: الف) S1-6A، ب) S1-7، ج) S2-3A، د) S2-4.

Figure 2. To enhance the reliability of bacterial growth inhibition and destruction, samples were extracted from wells and inoculated on a microplate by needle and MBC are as following: A) S1-6A, B) S1-7, C) S2-3A, D) S2-4.

زیاد شامل گونه‌هایی است که در مطالعات پیشین به آن‌ها اشاره گردیده است. بررسی تأثیر هیپوکلریت سدیم ($3\ mg\ L^{-1}$) بر گونه‌های کورینه باکتریوم در شرایط *In vitro*: ایزوله‌های مشخص شده با کدهای S1-6A و S2-4

در مطالعه حاضر با توجه به آزمایش‌ها مختلف و نتایج به دست آمده، به احتمال خیلی زیاد چهارگونه شناسایی شده متفاوت از یکدیگر می‌باشند که بر اساس آزمایش‌ها MIC و MBC و نیز قابلیت تولید بیوفilm و ناحیه مهار رشد در مقابل ($3\ mg\ L^{-1}$) NaClO، این تفاوت‌ها کاملاً مشهود بودند و به احتمال

بیشترین حساسیت را در برابر NaClO (3 mg L^{-1}) از خود نشان دادند و دارای هاله عدم رشد به اندازه ۸ mm در مقابل هیپوکلریت سدیم بودند. این در حالیست که دو ایزوله دیگر یعنی S1-7 و S2-3A در مقابل هیپوکلریت سدیم مقاوم بوده و هیچ ناحیه مهار رشدی را نشان ندادند (جدول ۴).

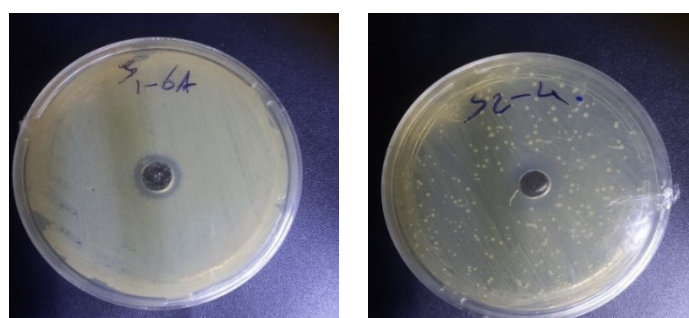
جدول ۴- ویژگی‌های مورفولوژیکی، عملکردهای آنزیمی باکتری‌های جداسده و تأثیر 3 mg L^{-1} هیپوکلریت سدیم بر گونه‌های کورینه‌باکتریوم.

Table 4. The morphological features, enzymatic functions of isolated bacteria, and the impact of 3 mg L^{-1} NaClO on *Corynebacterium* spp.

محل نمونه Sample location	هیپوکلریت سدیم NaClO (3 mg L^{-1})				جنس Genus	ناحیه مهار کلر Cl Inhibitory zone (mm)	بیوفیلم Biofilm**
	کاتالاز Catalase	اکسیداز Oxidase	OF*	مورفولوژی Morphology			
S1-6A	+	-	F	Coccobacilli	Corynebacterium	8	+
S1-7	+	-	F	Coccobacilli	Corynebacterium	0	+
S2-3A	+	-	F	Coccobacilli	Corynebacterium	0	+
S2-4	+	-	F	Coccobacilli	Corynebacterium	8	+

*Oxidative-Fermentative Test, ** The ability to form biofilm

*آزمون اکسیداتیو-فرمنتاتیو، **قابلیت تشکیل بیوفیلم.



شکل ۳- آزمون انتشار چاهک با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم: کورینه‌باکتریوم (S1-6A و S2-4) از سیستم تأمین آب.

Figure 3. Well diffusion tests utilizing NaClO solution: *Corynebacterium* (S1-6A and S2-4).

بررسی تأثیر NaClO (3 mg L^{-1}) بر روی جدایه‌های به دست آمده نشان داد که جدایه‌های S1-6A و S2-4 مقاومت کمتری در مقایسه با سایر گونه‌ها داشتند که در حضور NaClO ، ناحیه مهار بیشتری (۸ mm) را نشان دادند. به‌طور مشابه، در آزمون‌های MIC و MBC نیز این جدایه‌ها با مقادیر کمتری از عصاره غیرفعال شده و از بین رفتند. در مقابل، جدایه‌های S2-3A و S1-7 مقاومت بیشتری را

هدف از مقایسه خواص ضدباکتریایی عصاره پولک با NaClO تعیین امکان استفاده از عصاره به‌عنوان جایگزینی برای ضدعفونی‌کننده‌های رایج بود. با توجه به معادل نبودن غلظت مواد فعال که برای مقایسه معتبر اثر بازدارندگی بین عصاره و NaClO ضروری است، قطر ناحیه مهار برای عصاره ارزیابی نشد و قطر ناحیه بازدارنده صرفاً برای ارزیابی مقاومت گونه‌های کورینه‌باکتریوم در مقابل NaClO اندازه‌گیری شد.

ترکیبات آلی و گیاهی به‌طور قابل‌توجهی مهار باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفilm را افزایش داده است. و ثابت شد موثرتر از روش‌های ضدعفونی رایج است. این رویکرد نه‌تنها از سلامت مصرف‌کننده در برابر اثرات نامطلوب ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی محافظت می‌کند بلکه خطر آلودگی باقی‌مانده را نیز از بین می‌برد. تحقیق حاضر نشان داد عصاره هیدروآتانولی گیاه دارویی پولک دارای اثر ضدباکتریایی قوی در مقابل گونه‌های کورینه‌باکتریوم تشکیل‌دهنده بیوفilm است که ویژگی‌های کشندگی با قدرت بالا در برابر باکتری‌ها را نشان داد. پیش‌بینی می‌شود در مطالعات آینده، نقش و مشارکت خاص هریک از اجزاء در اثرات ضد باکتریایی مشخص و همچنین مواد فعال موجود در عصاره گیاه پولک دقیق‌تر شناسایی گردد.

در مقابل 3 mg L^{-1} هیپوکلریت سدیم نشان دادند و ناحیه مهاری برای آن‌ها در مقابل هیپوکلریت سدیم مشاهده نگردید (0 mm) که در آزمون‌های MIC و MBC نیز مقاومت بیشتری را نسبت به دو جدایه قبلی در مقابل عصاره نشان دادند. با توجه به نتایج به دست آمده و مقایسه اثرات ضد باکتریایی عصاره هیدروآتانولی پولک با روش متداول ضدعفونی با استفاده از هیپوکلریت سدیم، می‌توان عملکرد ضدعفونی در برابر گونه‌های باکتریایی را توسط عصاره پولک انجام داد که از یک طرف برای مصرف‌کننده مضر نیست و به‌صورت خوراکی قابل استفاده است و از طرف دیگر خواص مفید دیگری نیز علاوه بر خصوصیات آنتی‌باکتریال مورد مطالعه در این تحقیق دارد.

نتیجه‌گیری

جایگزینی ترکیبات شیمیایی مضر و خطرناک با

منابع

۱. عیسی‌زاده، ع.، یاورمنش، م. و محمدی ثانی، ع. (۱۳۹۵). خواص ضدباکتریایی عصاره‌های آبی و الکلی اسفناج (واريته مشهد) روی شاخص‌های باکتریایی. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۸(۲)، ۹۱-۱۰۶.
۲. نوشاد، م.، عزیززاده بهبهانی، ب.، دهقانی، س. (۱۳۹۹). بررسی تأثیر روش استخراج با آب و اتانول بر بازده استخراج، ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره گیاه پولک. مجله علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۷(۱۰۰)، ۱۱۷-۱۲۵.
3. Abbas, T.E.E., Elzubeir, E.A., & Arabbi, O.H. (2008). Drinking water quality and its effects on broiler performance during winter season. *International Journal of Poultry Science*, 7(5), 433-39.
4. Flemming, H.C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623-633.
5. Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 95-108.
6. Cox, G., & Wright, G.D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *International journal of medical microbiology*, 303(6-7), 287-292.
7. Xiao, X., Bai, L., Wang, S., Liu, L., Qu, X., Zhang, J., Xiao, Y., Tang, B., Li, Y., Yang, H., & Wang, W. (2022). Chlorine Tolerance and Cross-Resistance to Antibiotics in Poultry-Associated Salmonella Isolates in China. *Frontiers in microbiology*, 12, 833743.
8. Mondal, D. (2022). Effect of Biofilm on Production of Poultry. *IntechOpen*. Mosaddegh, M., & Naghibi, F. (2002). *Irans Traditional Medicine: Past and Present*. Traditional Medicine and Materia medica, Vol. 1, Published TMRC, Tehran, Iran, 2-20. (In Persian).
9. Mateus-Vargas, R.H., Kemper, N., Volkmann, N., Kietzmann, M., Meissner, J., & Schulz, J. (2019). Low-frequency electromagnetic fields as an alternative to sanitize water of drinking systems in poultry production? *PLOS ONE*, 14(7), e0220302.

10. Maes, S., Vackier, T., Nguyen Huu, S., Heyndrickx, M., Steenackers, H., Sampers, I., Raes, K., Verplaetse, A., & De Reu, K. (2019). Occurrence and characterisation of biofilms in drinking water systems of broiler houses. *BMC microbiology*, 19(1), 77.
11. Vandenbos, F., & Nicolai, C. (2016). Acute exacerbation of bronchiectasis: imputability of a *Corynebacterium striatum* infection? *Revue des maladies respiratoires*, 33(5), 409-410. WHO Traditional Medicine Strategy, 2002-2005, Geneva 2002:1-3, 43-47.
12. Burkovski, A. (2013). Diphtheria and its etiological agents, In *Corynebacterium diphtheria and related toxigenic species*. A. Burkovski (ed) Springer, Dordrecht, 1-14.
13. Bonmarin, I., Guiso, N., Le Fleche-Mateos, A., Petery, O., Patrick, A.D., & Levy-Bruhl, D. (2009). Diphtheria: a zoonotic disease in France? *Vaccine*, 27 (31), 4196-4200.
14. Alem, W.T. (2024). Effect of herbal extracts in animal nutrition as feed additives. *Heliyon*, 10(3), e24973.
15. Bahadori, M.B., Zengin, G., Dinparast, L., & 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.
16. Rezazadeh, S., Kebryaezadeh, A., Morteza, Pirali-Hamedani, Shafiee, A., & 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.
17. Shakeri, A., D'Urso, G., Taghizadeh, S.F., Piacente, S., Norouzi, S., Soheili, V., Asili, J., & 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.
18. Singleton, V.L., Orthofer, R. & 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.
19. Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., & 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.
20. Chen, M., Zhao, Y., & Yu, S. (2015). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. *Food chemistry*, 172, 543-550.
21. Patel, J., Patel, B.J., Joshi, D.V., Patel, S.S., Raval, S., Parmar, R.S., Harshad, C., & 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, 1919-1924.
22. Abed, A. & Sedik, A., & Shany, S. (2021). molecular characterization of streptococcus and enterococcus species isolated from broiler chickens. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 67, 21-32.
23. Christensen, G.D., Simpson, W.A., Younger, J., Baddour, L., M., Barrett, F., Melton, D.M., & 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.
24. Saify, H., Patidar R.K., Khare, M, Sahare, K.N., & 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.
25. Harika, K., Shenoy, V.P., Narasimhaswamy, N., & 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.
26. Touré, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O., & 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.

27. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
28. Stegăruș, D.I., Lengyel, E., Apostolescu, G.F., Botoran, O.R., & Tanase, C. (2021). Phytochemical analysis and biological activity of three *Stachys* species (Lamiaceae) from Romania. *Plants*, 10(12), 2710.
29. Amini, M., Hosseini, S. M., & Naghdi Badi, H. (2020). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Stachys schtschegleevii* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 245, 112-120.
30. Zhang, L., Wang, Y., & Chen, X. (2019). Antibacterial mechanisms of plant-derived flavonoids against Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1583.
31. Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2018). Metabolic disruption in bacteria induced by polyphenols: A review. *Phytochemistry Reviews*, 17(5), 1025-1042.
32. Saleem, H., Zengin, G., & Locatelli, M. (2021). Oxidative stress-mediated bacterial inhibition by medicinal plant extracts: Mechanisms and implications. *Antioxidants*, 10(3), 423.
33. Bernard, K. (2012). The Genus *Corynebacterium* and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria. *Journal of clinical microbiology*, 50, 3152-8.
34. Enurah, L., Olubade, T., Nwamo, A., & Sadiku, R. (2016). An outbreak of *Corynebacterium diphtheriae* infection in broiler chickens in Lagos, Nigeria. *Global Journal of Medical Research*, 16(G1), 7-9.
35. Alibi, S., Ferjani, A., & Boukadida, J. (2016). Implication of *Corynebacterium* species in food's contamination. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(5), 416-419.
36. Sarker, S.D., Nahar, L., & 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.
37. Huber, B., Eberl, L., Feucht, W., & Polster, J. (2003). Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 58(11-12), 879-884.
38. Jassbi, A.R., Miri, R., Asadollahi, M., Javanmardi, N., & Firuzi, O. (2013). Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (*Stachys*) plants. *Pharmaceutical Biology*, 52(1), 62-67.

