بررسی اثر عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات بر تشکیل بیوفیلم در باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* جدا شده از طیور

مینا احمدپور[1]، محمدحسین موثق[2*]، سمیه حسین‌زاده[3]

۱. دانش آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، گروه دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.
۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.
۳. گروه باکتری شناسی، دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران.

[*]نویسنده مسئول: *drmhmg@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۲۴/ ۱۴۰۰/۱۲

چکیده

سالمونلا تایفی‌موریوم از مهم‌ترین دغدغه‌ها و نگرانی‌های بهداشت عمومی در سرتاسر جهان می‌باشد که قادر به تولید بیوفیلم در سطوح در تماس با موادغذایی می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* (SSHE) و تری‌سدیم فسفات (TSP) بر علیه *سالمونلا تایفی‌موریوم* جدا شده از طیور بود. میزان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با استفاده از روش براث میکرودایلوشن مشخص گردید. برای ارزیابی اثرات ضدبیوفیلمی، جدایه‌ها با غلظت‌های مهاری و تحت‌مهاری هر دو ماده تیمار شده و پس از ۲۴ ساعت میزان تشکیل بیوفیلم بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MIC برای عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و TSP در جدایه‌های *سالمونلا تایفی‌موریوم* به ترتیب در محدوده ۱۰- ۱/۲۵ و ۸۰-۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. میزان MBC عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و TSP در جدایه‌های *سالمونلا تایفی‌موریوم*، به ترتیب در محدوده ۱۶۰< – ۴۰ و ۱۶۰< – ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج آزمون آماری نشان داد که استفاده از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و TSP به طور معنی‌داری باعث کاهش تشکیل بیوفیلم در *سالمونلا* تایفی‌موریوم نسبت به گروه کنترل می‌شود ($p<۰/۰۵$). همچنین نتایج آماری نشان داد که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* بیشتر از TSP میزان تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهد ($p<۰/۰۵$). با توجه به این نتایج، عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* می‌تواند جایگزین مناسبی برای مواد شیمیایی مثل TSP در صنعت موادغذایی در جهت کاهش میزان آلودگی باکتریایی باشد، با این‌حال کاربرد بالینی آن مستلزم انجام مطالعات بیشتر در جهت تعیین میزان ایمنی و سمیت آن می‌باشد.

کلید واژه‌ها: *مرزه سهندیکا*، عصاره هیدروالکلی، تری‌سدیم فسفات، بیوفیلم، *سالمونلا* تایفی‌موریوم.

مقدمه

بر خلاف پیشرفت‌های محسوس در زمینه رعایت بهداشت در فرآیند تولید موادغذایی و اصلاح روش‌های تولید موادغذایی، بحث امنیت غذایی به طرز فزاینده‌ای به یکی از مباحث بسیار مهم در بهداشت عمومی تبدیل شده است. *سالمونلا انتریکا* تحت گونه *انتریکا* سروار تایفی‌موریوم (*سالمونلا تایفی‌موریوم*) یکی از باکتری‌هایی است که می‌تواند با تشکیل بیوفیلم به سطوح زنده و غیرزنده که در تماس با موادغذایی هستند بچسبد و متعاقب آن محصولات غذایی را آلوده نماید و نیز باعث انتقال عفونت به انسان گردد (Paz-Méndez, et al., 2017). از این رو این باکتری

از مهم‌ترین دغدغه‌ها و نگرانی‌های بهداشت عمومی در سرتاسر جهان می‌باشد. از طرفی تشکیل بیوفیلم بوسیله عوامل بیماری‌زای منتقل شونده از غذا یکی از دلایل مقاومت باکتری‌ها در برابر عوامل ضدمیکروبی می‌باشد و به معضل شدید عفونت‌ها تبدیل شده است (Abebe, 2020). در سال‌های اخیر، اهمیت بیوفیلم میکروب‌ها در ایجاد بیماری‌ها، گسترش مقاومت میکروبی و اثرات جانبی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده است برای تهیه محصولات غذایی در کارخانه‌های صنایع غذایی از افزودنی‌ها و مواد نگهدارنده ضدمیکروبی استفاده شود. این ترکیبات افزودنی یا بصورت سنتتیک (شیمیایی) تولید می‌شوند و یا منشاء طبیعی دارند. یکی از افزودنی‌های شیمیایی متداول در صنایع غذایی که می‌توان آن را در هزاران محصول غذایی مشاهده نمود، تری‌سدیم‌فسفات می‌باشد.

تری‌سدیم فسفات (TSP) با فرمول شیمیایی Na_3PO_4 یک ترکیب شیمیایی قلیائی قوی با pH معادل ۱۲ است و در آب به راحتی قابل حل می‌باشد (Jose and Alagar, 2015). در صنایع غذائی به وفور از این ماده استفاده می‌شود. تری‌سدیم‌فسفات بر روی رشد عوامل بیماری‌زای منتقل شونده از غذا اثر داشته و باعث کاهش معنی‌داری در میزان رشد باکتری‌ها شده است. همچنین اثر ضدبیوفیلمی این ماده بر روی انواع مختلفی از باکتری‌ها به اثبات رسیده است. مصرف این محصول در مقادیر کم، خطر جدی برای سلامتی ایجاد نمی‌کند، اما با این حال در موارد نارسایی کلیوی، پوکی استخوان، سابقه بیماری قلبی و مشکلات روده بایستی احتیاط بیشتری داشت (Nishime, et al., 2021; Ritz, et al., 2012).

بطور کلی، استفاده متناوب و زیاد از موادشیمیایی به عنوان افزودنی غذایی منجر به افزایش شمار باکتری‌های مقاوم به مواد ضدمیکروبی می‌شود و سرانجام باعث مشکل شدن در درمان عفونت‌های باکتریایی در انسان می‌گردد. از طرفی، همه روزه اثرات زیان‌آور نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله عوارض سرطان‌زائی و خواص تراتوژنیک و نیز باقی‌مانده‌های سمی بر سلامت انسان به اثبات می‌رسد و تقاضا برای مصرف موادغذایی که عمر ماندگاری آن‌ها بصورت طبیعی افزایش یافته، بیشتر می‌گردد. از این رو نگرانی‌های مربوط به استفاده از موادغذایی ناسالم سبب شده است که عصاره‌های گیاهی به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی یا افزودنی‌های غذایی با خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی قوی برای حفاظت از موادغذایی خام و فرآوری‌شده در صنعت موادغذایی مورد توجه قرار گیرند (Bondi, et al., 2017).

گیاه مرزه با نام علمی *Satureja* از خانواده Lamiacae یک گیاه معطر و دارویی کاملا شناخته شده می‌باشد. این جنس در ایران دارای ۱۶ گونه مختلف است که ۱۰ گونه آن انحصاری ایران می‌باشد. یکی از این گونه‌ها، *مرزه سهندیکا* نام دارد که از جمله گیاهان بومی آذربایجان بوده و مصرف آن در سطح وسیع و بصورت سنتی متداول می‌باشد. برگ‌ها، گل و ساقه آن به شکل چای یا افزودنی به عنوان ادویه برای غذا استفاده می‌شود. همچنین *مرزه* به عنوان داروی سنتی برای درمان مشکلات مختلف مثل بیماری‌های عفونی، تهوع، اسهال، سوءهاضمه و دردهای عضلانی استفاده می‌شود. مشخص شده است که این گیاه دارای ترکیبات تیمول، کارواکرول، گاماترپینن، آلفا سیمن، آلفا ترپینن است که این ترکیبات دارای خواص ضدباکتریایی هستند (Sefidkon and Akbarnia, 2009). همچنین مطالعات قبلی گزارش کردند که عصاره گیاه *مرزه* دارای خاصیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (Tepe and Cilkiz, 2016; Yousefizad, et al., 2012; Jamzad, 2009). از آن‌جائی‌که استفاده از غذای سالم و عاری از موادافزودنی مهم‌ترین تقاضای مصرف کنندگان است، اما زندگی شهری و افزایش محصولات غذایی صنعتی حذف کامل افزودنی‌ها را ناممکن کرده است، لذا با

استفاده از روش‌های جایگزین، می‌توان افزودنی‌های دیگری را از منابع طبیعی استخراج کرد و در محصولات غذایی بکار برد. بنابراین با توجه به اینکه تری‌سدیم‌فسفات یکی از افزودنی‌هایی است که اثرات ضدمیکروبی دارد ولی در عین حال یک ماده شیمیایی است و نیز با توجه به خصوصیات ضدمیکروبی ذکر شده در مورد گیاه *مرزه سهندیکا*، هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات بر روی میزان تشکیل بیوفیلم در باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* جدا شده از طیور بود.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی

جهت بررسی اثر ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات، سویه استاندارد *سالمونلا تایفی‌موریوم* ATCC14028 و تعداد ۲۰ جدایه *سالمونلا تایفی‌موریوم* بدست آمده از طیور مورد آزمایش قرار گرفت. این جدایه‌ها از میان ۵۰ نمونه *سالمونلا تایفی‌موریوم* جدا شده از مطالعه‌ای در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده و قبلا توسط آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی تایید شده بودند (Fazl, et al., 2013). نمونه‌های طیور از کشتارگاهی واقع در تهران جمع‌آوری شد و نمونه‌ها در کیسه‌های جداگانه و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تعیین وجود سرووارهای *سالمونلا* از روش کشت معمول استفاده شد و از محتوای روده، محتوای سکوم، صفرا و نمونه‌های کبد و طحال به طور مستقیم به محیط کشت مایع راپاپورت تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس از هر نمونه بر روی محیط سالمونلا-شیگلا آگار تلقیح شد و محیط در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ساعت انکوبه شدند. در ادامه کلنی‌های مشکوک که از نظر موفولوژی شبیه *سالمونلا* بودند با آزمایشات بیوشیمیایی (از جمله SIM، IMViC، TSI و اوره‌آز) شناسایی شدند. در ادامه جهت تعیین سروتیپ‌های *سالمونلا* از آنتی‌سرم‌های O و H و بر اساس آزمایش آگلوتیناسیون اسلایدی و لوله استفاده گردید.

تهیه استوک عصاره هیدروالکلی گیاه *مرزه سهندیکا* و تری-سدیم‌فسفات

محلول استوک عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* (تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر(Sharchi, et al., 2020) و تری‌سدیم‌فسفات ۱۲ آ به (TITRACHEM, IRAN) به‌ترتیب با حل نمودن در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO; Sigma-Aldrich) و آب مقطر استریل تهیه گردید. غلظت استوک تری‌سدیم‌فسفات و عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* بر اساس نتایج حاصل از مطالعات قبلی ۳۲۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر در DMSO (با غلظت نهایی ۱۰ درصد (V/V) و آب‌مقطر تهیه گردید.

تایید تست ضدمیکروبی

تست حداقل غلظت مهارکنندگی یاMIC

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) تری‌سدیم‌فسفات و عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* از روش براث میکرودایلوشن استفاده گردید. برای این منظور، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولرهینتون براث به داخل هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه گردید، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مواد مورد آزمایش (تری‌سدیم فسفات / عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* حل شده در DMSO (با غلظت نهایی ۱۰ درصد))، در چاهک اول اضافه شده و به صورت سریالی two-fold رقیق شد و در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک‌فارلند (۶۰۰OD نانومتر معادل ۰/۱) به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. پس از آن پلیت به وسیله پارافیلم برای جلوگیری از دهیدراته‌شدن پوشانده شد و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. بعد از انکوباسیون ۳۰ میکرولیتر از رزازورین ۰/۰۱ درصد به هر

کدام از چاهک‌ها اضافه گردید و دوباره به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. تغییر رنگ محلول رزازورین از رنگ آبی به رنگ صورتی نشان‌دهنده احیاءشدن رزازورین و در نتیجه رشد باکتری است. بعد از انکوباسیون آخرین چاهک با کمترین غلظت از ماده مورد آزمایش که به رنگ آبی است، به عنوان مقدار MIC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه 3 بار تکرار گردید. برای هر میکروپلیت یک سری کنترل نیز در نظر گرفته شد که شامل کنترل مثبت: ردیفی که در آن به جای ماده مورد آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر سیپروفلوکساسین (۱ mg/ml) اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط‌کشت + آنتی‌بیوتیک + باکتری)؛ کنترل منفی: ردیفی که در آن به جای ماده مورد آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از حلال (آب مقطر / DMSO ۱۰ درصد) در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط‌کشت + حلال + باکتری)؛ کنترل استریل‌بودن مواد مورد آزمایش: ردیفی که در آن ۱۰۰ میکرولیتر از مواد مورد آزمایش در چاهک اول اضافه گردید و رقت سازی انجام گرفت (محیط کشت + مواد مورد آزمایش)؛ کنترل رشد باکتری: ردیفی که در آن ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *سالمونلا تایفی‌موریوم* ATCC14028 در چاهک اول اضافه گردید و رقت‌سازی انجام گرفت (محیط‌کشت + باکتری) (Ahn, et al., 2012; Bazargani and Rohloff, 2016; Sarker and Naharkumarasamy, 2007).

تست حداقل غلظت کشندگی یاMBC

MBC کمترین غلظت از ماده مورد آزمایش است که قادر به کشتن ۹۹/۹ ٪ از باکتری‌های تلقیح شده طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس می‌باشد. برای تعیین MBC، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی موجود در چاهک MIC و نیز چاهک‌های حاوی غلظت ماده مورد آزمایش بیشتر از MIC (همه چاهک‌های آبی رنگ)، برداشته شده و سوسپانسیون مربوط به هر یک از رقت‌های مذکور بر روی محیط مولر هینتون آگار متفاوت تلقیح گردیدند. پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، از نظر رشد باکتریایی مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت چاهکی که قادر به کشتن ۹۹/۹٪ از باکتری-های تلقیح شده بر روی محیط مولر هینتون آگار شده، به عنوان میزان MBC ثبت گردید. این آزمون برای هر نمونه ۳ بار تکرار گردید (Sasidharan, et al., 2014).

ارزیابی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها

جهت بررسی قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها از روش میکروتیتر پلیت (Microtiter Plates Assay) و رنگ-سنجی با کریستال ویوله توصیف شده در مطالعات قبلی با مختصر تغییر استفاده شد (Peeters, et al., 2008). این آزمون با ۳ بار تکرار انجام گردید، بدین ترتیب که مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی تهیه شده در محیط TSB (تریپتیکاز سوی براث) (Ibresco,Italy) حاوی یک درصد گلوکز (OD600= 0.1, ~107 CFU/ml) به سه چاهک اضافه شد. جهت جلوگیری از دهیدراتاسیون، میکروپلیت‌ها با پارافیلم پوشانده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند. سپس میکروپلیت‌ها به آرامی با محلول استریل PBS (Baharafshan, Iran) شست‌وشو داده شده و به مدت ۲۰ دقیقه بصورت وارونه بر روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا خشک شوند. در مرحله بعد، به همه چاهک‌ها مقدار ۱۵۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله (Merck, Germany) یک درصد اضافه شده و بعد از ۳۰ دقیقه شست‌وشو و در شرایط محیطی خشک گردیدند. سپس میزان تشکیل بیوفیلم با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد و اندازه‌گیری شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020, Austria) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محیط کشت TSB تلقیح نشده به عنوان

کنترل منفی و از اتانول ۹۵ درصد به عنوان بلانک دستگاه الایزا ریدر استفاده گردید.

بررسی اثر ضدبیوفیلمی تری‌سدیم‌فسفات و عصاره هیدرالکلی *مرزه سهندیکا* بر روی جدایه‌ها

جهت بررسی اثر ضدبیوفیلمی تری‌سدیم‌فسفات و عصاره هیدرالکلی *مرزه سهندیکا* بر روی جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم*، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مهاری و تحت مهاری (به ترتیب MIC، ½ MIC، ¼ MIC، 1/8 MIC) از روش ارزیابی در میکروپلیت گزارش شده بوسیله پیترز و همکاران در سال ۲۰۰۸ با مختصر تغییر مورد بررسی قرار گرفت.

روش آنالیز آماری

جهت بررسی تفاوت در میزان تشکیل بیوفیلم بین گروه‌های تیمار و گروه کنترل از آنالیز آماری Paired t-test و از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۶) استفاده گردید. $p<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

تست حساسیت ضد میکروبی

تست حداقل غلظت مهارکنندگی یاMIC

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده میزان MIC برای عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* در جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم* در محدوده ۱۰- ۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و در مورد تری‌سدیم‌فسفات در محدوده ۸۰-۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین مقدار MIC مواد مذکور در مورد *سالمونلاتایفی‌موریوم* ATCC14028، به ترتیب ۵ و ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

تست حداقل غلظت کشندگی یاMBC

میزان MBC عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری-سدیم‌فسفات در جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم*، به ترتیب در محدوده <۱۶۰ – ۴۰ و <۱۶۰ – ۸۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. این مقدار برای باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* ATCC14028، به ترتیب <۱۶۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بود.

قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها

داده‌های به‌دست‌آمده به وسیله دستگاه الایزا ریدر نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به تولید بیوفیلم با درجات مختلف بودند. همانطور که قبلاً بیان گردید از محیط کشت TSB تلقیح نشده به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. نتایج نشان داد که مقدار OD در جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم* و جدایه استاندارد *سالمونلاتایفی‌موریوم* ATCC 14028 بیشتر از OD کنترل منفی بود، که این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$) (جدول ۱).

جدول ۱- جذب نوری (OD) جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم* به دنبال تشکیل بیوفیلم بعد از ۲۴ ساعت

شماره نمونه	تکرار اول	تکرار دوم	تکرار سوم	انحراف معیار ± میانگین	شاهد
۱	۰/۳۳۷	۰/۳۵۰	۰/۳۵۱	۰/۳۴۶ ± ۰/۰۰۷	۰/۲۰۳
۲	۰/۳۳۷	۰/۳۴۸	۰/۳۴۹	۰/۳۴۴ ± ۰/۰۰۶	۰/۲۰۱
۳	۰/۳۵۳	۰/۳۴۹	۰/۳۵۳	۰/۳۵۱ ± ۰/۰۰۲	۰/۲۰۳
۴	۰/۵۶۷	۰/۵۹۵	۰/۵۸۱	۰/۵۸۱ ± ۰/۰۱۴	۰/۲۰۳
۵	۰/۳۶۹	۰/۳۹۰	۰/۳۸۸	۰/۳۸۲ ± ۰/۰۱۱	۰/۲۰۲
۶	۰/۳۳۷	۰/۳۳۸	۰/۳۵۴	۰/۳۴۳ ± ۰/۰۰۹	۰/۲۰۳
۷	۰/۳۷۱	۰/۳۷۹	۰/۳۶۸	۰/۳۷۲ ± ۰/۰۰۵	۰/۲۰۱
۸	۰/۳۳۳	۰/۳۴۴	۰/۳۵۰	۰/۳۴۲ ± ۰/۰۰۸	۰/۲۰۱

۹	۰/۳۸۱	۰/۳۹۳	۰/۳۹۸	۰/۳۹۰ ± ۰/۰۰۸	۰/۲۰۳
۱۰	۰/۳۵۷	۰/۳۵۳	۰/۳۶۱	۰/۳۵۷ ± ۰/۰۰۴	۰/۲۰۱
۱۱	۰/۳۸۰	۰/۴۰۰	۰/۴۰۰	۰/۳۹۳ ± ۰/۰۱۱	۰/۲۰۱
۱۲	۰/۳۲۶	۰/۳۲۷	۰/۳۲۶	۰/۳۲۶ ± ۰/۰۰۰۵	۰/۲۰۳
۱۳	۰/۳۹۰	۰/۳۱۰	۰/۳۸۴	۰/۳۶۱ ± ۰/۰۴۴	۰/۲۰۲
۱۴	۰/۳۶۹	۰/۴۰۰	۰/۴۰۷	۰/۳۹۲ ± ۰/۰۲۰	۰/۲۰۳
۱۵	۰/۳۶۸	۰/۳۷۱	۰/۳۸۷	۰/۳۷۵ ± ۰/۰۱۰	۰/۲۰۳
۱۶	۰/۳۶۷	۰/۳۸۰	۰/۳۸۹	۰/۳۷۸ ± ۰/۰۱۱	۰/۲۰۳
۱۷	۰/۳۶۸	۰/۳۶۹	۰/۳۸۵	۰/۳۷۴ ± ۰/۰۰۹	۰/۲۰۱
۱۸	۰/۳۶۶	۰/۳۷۴	۰/۳۳۹	۰/۳۵۹ ± ۰/۰۱۸	۰/۲۰۲
۱۹	۰/۳۷۸	۰/۳۹۵	۰/۴۰۶	۰/۳۹۳ ± ۰/۰۱۴	۰/۲۰۳
۲۰	۰/۴۱۲	۰/۴۳۹	۰/۴۵۳	۰/۴۳۴ ± ۰/۰۲۰	۰/۲۰۳
Sal. ATCC14028	۰/۳۵۱	۰/۳۳۴	۰/۳۴۱	۰/۳۴۲ ± ۰/۰۰۸	۰/۲۰۱

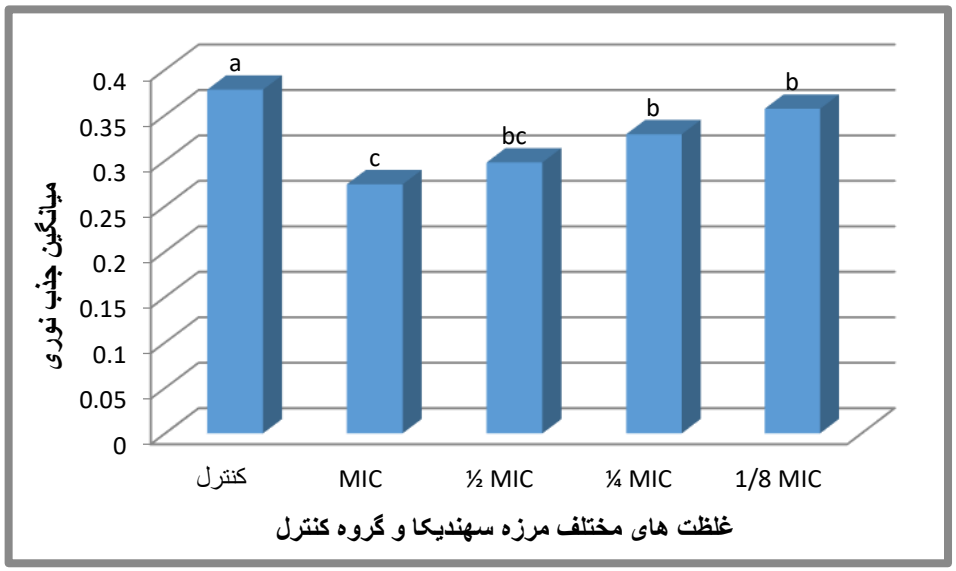
بررسی اثر ضدبیوفیلمی عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا*

نتایج آمار توصیفی و آزمون تی در مقایسه میانگین تشکیل بیوفیلم بین دادههای گروه کنترل و گروهی که از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* نشان داد که استفاده از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* به طور معنی‌داری باعث کاهش تشکیل بیوفیلم در *سالمونلا*تایفی‌موریوم نسبت به گروه کنترل می‌شود ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف *مرزه سهندیکا* در نمودار ۱ نشان داده شده است.

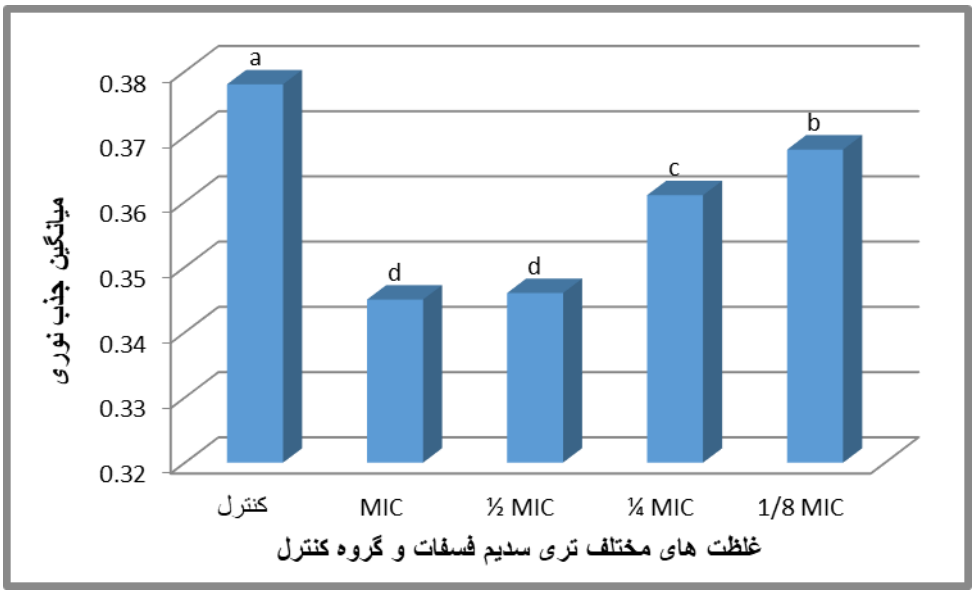
بررسی اثر ضدبیوفیلمی تری‌سدیم‌فسفات

نتایج آمار توصیفی و آزمون تی زوجی در مقایسه میانگین تشکیل بیوفیلم بین داده‌های گروه کنترل و گروهی که از تری‌سدیم‌فسفات استفاده‌شده‌است نشان داد که استفاده از تری‌سدیم‌فسفات به طور معنی‌داری باعث کاهش تشکیل بیوفیلم در *سالمونلا*تایفی‌موریوم نسبت به گروه کنترل می‌شود ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف تری‌سدیم‌فسفات در نمودار ۲ نشان داده شده است. مقایسه اثر ضدبیوفیلمی عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات

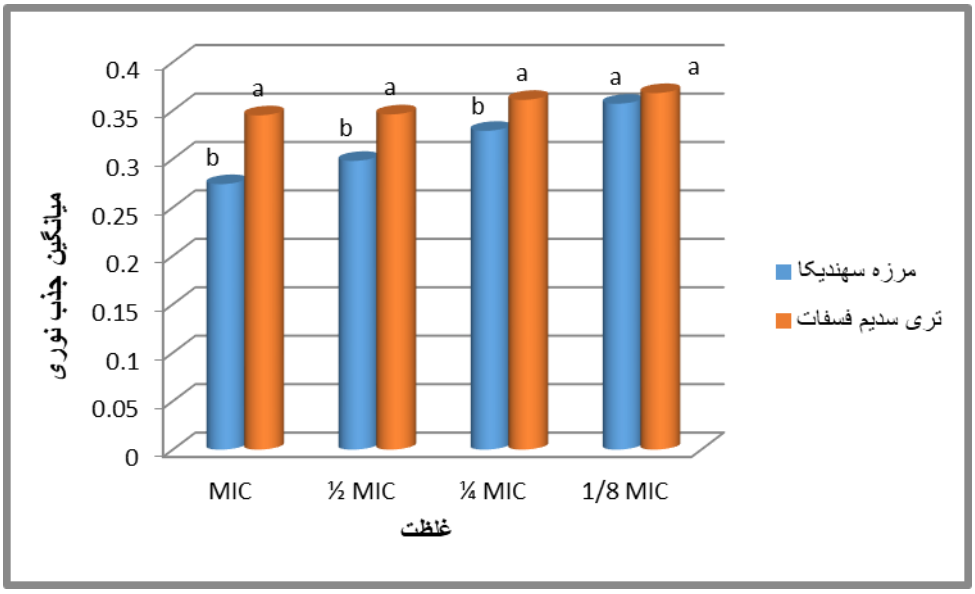
نتایج آزمون تی زوجی در مقایسه میانگین تشکیل بیوفیلم بین داده‌های گروهی که از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* استفاده‌شده و گروهی که از تری‌سدیم‌فسفات استفاده‌شده‌است نشان داد زمانی که از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* استفاده می‌شود میانگین تشکیل بیوفیلم کمتر از تری‌سدیم‌فسفات است. این اختلاف در غلظت MIC ۱/۸ معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) ولی در بقیه غلظت‌ها معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). همچنین مقایسه میانگین جذب نوری در غلظت‌های مختلف تری‌سدیم‌فسفات و *مرزه سهندیکا* در نمودار ۳ نشان داده شده است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف *مرزه سهندیکا* . حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.



نمودار ۲- مقایسه میانگین جذب نوری بین گروه کنترل و غلظت‌های مختلف تری‌سدیم‌فسفات. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.



نمودار۳- مقایسه میانگین جذب نوری در غلظت‌های مختلف تری‌سدیم‌فسفات و *مرزه سهندیکا*. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار هستند.

بحث

مشخص‌شده‌است که بیشتر عصاره‌های گیاهی دارای فعالیت ضدمیکروبی متعددی بوده و از آن‌ها در درمان بسیاری از عفونت‌ها استفاده شده است (Bor, et al., 2007). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* اثر مهاری خوبی بر روی رشد *سالمونلاتایفی‌موریوم* با حداقل غلظت مهارکنندگی در محدوده ۱۰-۱/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی <۱۶۰ – ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارد، چنانچه نتایج مطالعه حاضر در توافق با نتایج مطالعات قبلی است. مطالعات قبلی گزارش کردند که عصاره و اسانس گیاه *مرزه سهندیکا* دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشند (Sefidkon and Akbarinia, 2009; Tepe and Cilkiz, 2016; Yousefizadi, et al., 2012). شرچی و همکاران نشان دادند که عصاره هیدرالکلی *مرزه سهندیکا* اثر ضدمیکروبی در برابر باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* داشته با حداقل غلظت مهارکنندگی در محدوده ۴/۶۸-۰/۲۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۱۵۰-۷۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Sharchi, et al., 2020). سرانو و همکارانش نشان دادند که اسانس و عصاره اتانولی مرزه، حاوی ترکیبات متعدد با خاصیت ضدمیکروبی هستند (Serrano, et al., 2011). در مطالعات قبلی ترکیبات اصلی *مرزه سهندیکا* مشخص شده و نشان دادند که می‌توان فعالیت ضدمیکروبی *مرزه سهندیکا* را به بالا بودن درصد تیمول در این گیاه مربوط دانست (Marchese, et al., 2016; Kargar, et al., 2014).

عصاره‌های اتانولی و متانولی سایر گونه‌های *مرزه* در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی ارزیابی شده‌اند و نشان داده شده است که با وجود اینکه اسانس گیاهان حاوی مواد ضدمیکروبی بیشتری نسبت به عصاره‌های آن از جمله عصاره‌های متانولی، اتانولی و آبی هستند (Amanlou, et al., 2004; Zareii, et al., 2014; Adiguzel, et al., 2007)، اما نتایج مطالعه ما حاکی از آن است که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* می‌تواند از

اسانس و سایر انواع عصاره‌ها قوی‌تر باشد. این تفاوت می‌تواند ناشی از عوامل اکولوژیکی یا تنوع گونه‌ای باشد. در مطالعه حاضر نتایج حاصل از ارزیابی حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی تری‌سدیم‌فسفات نشان داده شد که این ماده بر روی باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* اثر ضدمیکروبی مناسبی دارد. در مطالعات دیگر نیز اثر ضدباکتریایی تری‌سدیم‌فسفات مستند شده و نشان داده شده است که در برابر باکتری‌های گرم منفی (از جمله سروارهای *سالمونلا انتریکا*، *اشرشیا کولای*، گونه‌های *کمپیلوباکتر*) موثرتر از باکتری‌های گرم مثبت (مثل *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*) است (Capita, et al., 2002). گزارش شده است که تری‌سدیم‌فسفات می‌تواند رشد عوامل بیماری‌زای منتقل‌شونده از غذا از جمله گونه‌های *سالمونلا*، *کمپیلوباکتر*، *اشرشیا کولای* و *لیستریا مونوسایتوژنز* را کنترل نماید (Sarjit and Dykes, 2015; Sarjit and Dykes, 2017; Eldaly, et al., 2017; Oladunjoye, et al., 2017). لیائو و کوک (۲۰۰۱) اثر تری‌سدیم‌فسفات را بر روی باکتری *سالمونلا* بررسی کردند و مشاهده کردند که در غلظت بین ۱۲۰-۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش رشد باکتری می‌گردد (Liao and Cooke, 2001). ژوانگ و بوچت (۱۹۹۶) اثر تری‌سدیم‌فسفات را در غیرفعال‌شدن *سالمونلا* مونته‌ویدئو بر روی گوجه‌فرنگی بررسی کردن و دریافتند که با غوطه‌ور کردن گوجه‌فرنگی‌ها در غلظت ۸۰ و ۱۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان رشد باکتری کاهش می‌یابد (Zhuang and Beuchat, 1996). کامبر و همکارانش (۲۰۱۰) نیز نشان دادند که تری سدیم‌فسفات در غلظت ۱۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر باعث کاهش رشد *سالمونلاتایفی‌موریوم* و *سالمونلا*انترایتیدیس می‌شود (Kamber, et al., 2010). در مطالعه سو و سوزا (۲۰۱۲) نیز بیان شد که تری‌سدیم‌فسفات در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث کاهش رشد *سالمونلا تایفی‌موریوم* شده است (Su and Souza, 2012).

در کل، این داده‌ها نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات می‌توانند به عنوان یک عامل ضدباکتریایی در برابر باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* باشند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* در غلظت‌های کمتر از تری‌سدیم‌فسفات می‌تواند باعث کاهش رشد باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* باشد. اما با این‌حال، انجام مطالعات بیشتر با تاکید بیشتر بر روی مکانیسم اثر ضدمیکروبی این مواد لازم و ضروری است. تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها مستقیما با بسیاری از عفونت‌ها ارتباط دارد. مطالعات متعددی برای مقایسه توانایی سروارهای مختلف *سالمونلا* در ارتباط با تولید بیوفیلم انجام شده است (Majtan, et al., 2008; Kalai Chelvam, et al., 2014). در مطالعه حاضر، همه جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم* قادر به تولید بیوفیلم در میکروپلیت پلی‌استایرن در مقایسه با گروه کنترل بودند. این نتیجه در توافق با نتایج مطالعات دیگر است که بر روی توانایی تولید بیوفیلم توسط باکتری *سالمونلاتایفی‌موریوم* انجام شده است (Hosseinzadeh, et al., 2018). در مطالعه حاضر اثر ضدبیوفیلمی غلظت‌های مختلف مهاری و تحت مهاری عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* و تری‌سدیم‌فسفات بر روی جدایه‌های *سالمونلاتایفی‌موریوم* ارزیابی شد. نتایج به خوبی نشان داد که هر دو این مواد می‌توانند باعث کاهش معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در تولید بیوفیلم گردند. تا آن‌جائی‌که که ما می‌دانیم این اولین گزارش در مورد فعالیت ضدبیوفیلمی عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* است. در مطالعات

متعددی نشان داده شده است که عصاره مربوط به گیاهان مختلف باعث مهار تولید بیوفیلم در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌گردد. بهادر و همکاران (۱۳۹۴) گزارش کردند که گیاه *مرزه* با کاهش بیان ژن *bap* اثر مهاری بر روی تشکیل بیوفیلم باکتری *اسینتوباکتری بومانی* و حدت این باکتری داشته است (بهادر و همکاران، ۱۳۹۴). تقیان و همکاران (۱۳۹۷) با بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس *مرزه* بر تولید همولیزین و بیوفیلم در *استافیلوکوکوس اورئوس* بیان نمودند که اسانس هر ۴ گونه مرزه مورد آزمایش اثر ضدمیکروبی بر علیه هر دو سویه استاندارد *استافیلوکوکوس* داشته و همچنین میزان تشکیل بیوفیلم و تولید همولیزین باکتری‌ها در حضور غلظت‌های تحت مهاری از اسانس‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (تقیان و همکاران، ۱۳۹۷). در مطالعه سامرز و همکاران (۱۹۹۴)، اثر تری-سدیم‌فسفات بر روی بیوفیلم و سلول‌های پلانکتونی برخی باکتری‌ها از جمله *سالمونلاتایفی‌موریوم* بررسی شد و نشان دادند که تری‌سدیم‌فسفات یک ماده موثر برای کاهش جمعیت باکتریایی و کاهش تشکیل بیوفیلم بر روی موادغذایی و سطوح در تماس با موادغذایی است (Somers, et al., 1994). همچنین سرجیت و دایکز (۲۰۱۶)، فعالیت ضدبیوفیلمی تری‌سدیم‌فسفات را در باکتری *سالمونلا* بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که تری‌سدیم‌فسفات پتانسیل بالقوه‌ای جهت کاهش شکل‌گیری بیوفیلم در گونه‌های *سالمونلا* بر روی سطوح غیرزنده در پروسه فرآوری طیور دارد (Sarjit and Dykes, 2017). کادنا و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ بیان نمودند که تری‌سدیم‌فسفات با خاصیت ضدمیکروبی خود سبب کاهش معنی‌دار *سالمونلا* می-شود که با نتایج بدست آمده در مطالعه ما همخوانی دارد (Cadena, et al., 2019). کریمی و حنیفیان در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۷ با بررسی اثر تری‌سدیم‌فسفات بر کیفیت میکروبی انواع گوشت بیان نمودند که تیمار با تری‌سدیم‌فسفات، سبب کاهش قابل توجه بیوفیلم‌ها و نیز جمعیت باکتریایی در لاشه حیوانات می‌شود (کریمی و حنیفیان، ۱۳۹۷).

با توجه به نگرانی‌های استفاده از تری‌سدیم‌فسفات از جمله باقی ماندن آن بر روی لاشه، امکان غیرفعال شدن آن توسط مواد آلی (کلر) و افزایش مقاومت باکتری‌هایی مانند *سالمونلا* به حرارت و دیگر تیمارها، و با توجه به اهمیت بیوفیلم در بیماری‌زایی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی، در این مطالعه ما اثر ضدبیوفیلمی دو ماده طبیعی (عصاره *مرزه سهندیکا*) و شیمیایی (تری‌سدیم‌فسفات) را با یکدیگر مقایسه کردیم. نتایج آزمون نشان داد زمانی که از عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* استفاده می‌شود میانگین تشکیل بیوفیلم کمتر از تری‌سدیم‌فسفات است. این اختلاف در غلظت MIC ۱/۸ معنی‌دار نیست ($p>۰/۰۵$) ولی در بقیه غلظت‌ها معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$). این اختلاف می‌تواند ناشی از اختلاف در نوع ترکیبات موجود در هر دو ماده باشد. اما به هر حال با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* نسبت به تری‌سدیم‌فسفات هم از نظر اثر مهارکنندگی و هم از نظر اثر ضدبیوفیلمی موثرتر بوده و می‌تواند به عنوان ترکیبی مناسب جهت جلوگیری از فساد و یا بیماری‌زا بودن ماده‌غذایی به عنوان نگهدارنده و همچنین به عنوان طعم‌دهنده در صنایع غذایی مورد استفاده قرار بگیرد. با این وجود مطالعات بیشتری در مورد ایمنی و سمیت این عصاره برای ارزیابی و کاربرد بالینی آن در درمان بیماری‌های عفونی مورد نیاز است.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در صنعت غذا کاربردهای مختلفی دارد. از کاربردهای مهم آن‌ها می‌توان به استفاده از این ترکیبات به عنوان ماده نگهدارنده یا طعم‌دهنده و یا حتی ضدعفونی‌کنندگی اشاره کرد. با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عصاره هیدروالکلی *مرزه سهندیکا* به عنوان ماده طبیعی دارای اثر ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی موثرتری نسبت به تری‌سدیم‌فسفات به عنوان ماده شیمیایی بوده و می‌توان از آن به عنوان یک ترکیب موثر علیه *سالمونلاتایفی‌موریوم* جهت کاهش میزان آلودگی در موادغذایی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه مقطع دکترای حرفه‌ای دامپزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر می باشد.

منابع

1. Abebe G.M. 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. Int J Microbiol. 2020:1-10.

2. Adiguzel A., Ozer H., Kili C.H. and Cetin B. 2007. Screening of Antimicrobial Activity of Essential Oil and Methanol Extract of *Satureja hortensis* on Foodborne Bacteria and Fungi. J Food Sci. 25:81-89.

3. Ahn S.J., Cho E.J., Kim H.J., Park S.N., Lim Y.K. and Kook J.K. 2012. The antimicrobial effects of deglycyrrhizinated licorice root extract on *Streptococcus mutans* UA159 in both planktonic and biofilm cultures. Anaerobe. 18:590-596.

4. Amanlou M., Fazeli M.R., Arvin A., Amin H.G. and Farsam H. 2004. Antimicrobial activity of crude methanolic extract of *Satureja khuzistanica*. Fitoterapia. 75:768-770.

5. Bazargani M.M. and Rohloff J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. Food Control. 61:156-164.

6. Bondi M., Lauková A., de Niederhausern S., Messi P. and Papadopoulou C. 2017. Natural Preservatives to Improve Food Quality and Safety. J Food Qual. 2017:1-3.

7. Bor T., Aljaloud S.O., Gyawali R. and Ibrahim S.A. 2016. Chapter 26 - Antimicrobials from herbs, spices, and plants A2 - Watson, Ronald Ross, in: Preedy, V.R. (Ed.), Fruits, Vegetables, and Herbs. Academic Press. 551-578.

8. Cadena M., Kelman T. and Marco M.L. 2019. Understanding Antimicrobial Resistance (AMR) Profiles of *Salmonella* Biofilm and Planktonic Bacteria Challenged with Disinfectants Commonly Used During Poultry Processing. Foods. 8:275.

9. Capita R., Alonso-Calleja C., Fernandez C. and Moreno B. 2002. Review: Trisodium Phosphate (TSP) Treatment for Decontamination of Poultry. Food Sci Technol Int. 8:11-24.

10. Eldaly E., Elshater M., Hussein M. and Eldin A. 2017. Efficacy of warm water, Sodium hypochlorite and Trisodium phosphate on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium artificially

inoculated in Telapia nilotica fillets. J Food Nutr Res. 2:15-19.

11. Fazl A.A., Salehi T.Z., Jamshidian M., Amini K. and Jangjou A.H. 2013. Molecular detection of *invA*, *ssaP*, *sseC* and *pipB* genes in *Salmonella* Typhimurium isolated from human and poultry in Iran. Afr J Microbiol Res. 7:1104-8.

12. Gizaw Z. 2019. Public health risks related to food safety issues in the food market: a systematic literature review. Environ Health Prev Med. 24: 68.

13. Hosseinzadeh S., Dastmalchi Saei H., Ahmadi M. and Zahraei Salehi T. 2018. Antimicrobial effect of Licochalcone A and Epigallocatechin-3-gallate against *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry flocks. Iran J Microbiol.10:51-58.

14. Jamzad Z. 2009. Thymus and *Satureja* species of Iran. Research Institute of Forest and Rangelands.

15. Jose A.J. and Alagar M. 2015. Preparation and characterization of polysulfone-based nanocomposites. P 31-59. In: Mittal, V. (ed.), Manufacturing of Nanocomposites with Engineering Plastics. Woodhead Publishing.

16. Kalai Chelvam K., Chai L.C. and Thong K.L. 2014. Variations in motility and biofilm formation of *Salmonella enterica* serovar Typhi. Gut Pathog. 6:2.

17. Kargar V., Alizadeh A. and Namayandeh A. 2014. Essential oil constituents of *Satureja sahendica* Bornm. and *Satureja hortensis* L. cultivated in Iran. Int J Farm & Alli Sci. 3:91-94.

18. Liao C.H. and Cooke P.H. 2001. Response to trisodium phosphate treatment of *Salmonella* Chester attached to fresh-cut green pepper slices. Can J Microbiol. 47:25-32.

19. Majtan J., Majtanova L., Xu M. and Majtan V. 2008. In vitro effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on biofilm formation by clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Slovakia. J Appl Microbiol. 104:1294-1301.

20. Marchese A., Orhan I.E., Daglia M., Barbieri R., Di Lorenzo A., Nabavi S.F., Gortzi O., Izadi M. and Nabavi S.M. 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem. 210:402-414.

21. Nishime K., Sugiyama N., Okada K. 2021. A New Disease Concept in the Age of Processed Foods-Phosphorus-Burden Disease; including CKD-MBD Concrete Analysis and the Way to Solution. Nutrients. 13:2874.

22. Oladunjoye A.O., Singh S. and Ijabadeniyi O.A. 2017. Trisodium phosphate enhanced phage lysis of *Listeria monocytogenes* growth on fresh-cut produce. LWT. 86:312-317.

23. Paz-Méndez A.M., Lamas A., Vázquez B., Miranda J.M., Cepeda A. and Franco C.M. 2017. Effect of Food Residues in Biofilm Formation on Stainless Steel and Polystyrene Surfaces by *Salmonella* enterica Strains Isolated from Poultry Houses. Foods. 6:106.

24. Peeters E., Nelis H.J. and Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms

grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 72:157-165.

25. Ritz E., Hahn K., Ketteler M., Kuhlmann M. and Mann J. 2012. Phosphate additives in food--a health risk. Dtsch Arztebl int. 109:49-55.

26. Sarjit A. and Dykes G.A. 2015. Trisodium phosphate and sodium hypochlorite are more effective as antimicrobials against *Campylobacter* and *Salmonella* on duck as compared to chicken meat. Int J Food Microbiol. 203:63-69.

27. Sarjit A. and Dykes, G.A. 2017. Antimicrobial activity of trisodium phosphate and sodium hypochlorite against *Salmonella* biofilms on abiotic surfaces with and without soiling with chicken juice. Food Control. 73:1016-1022.

28. Sarker S.D. and Nahar Kumarasamy L.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. 42:321-324.

29. Sasidharan N.K., Sreekala S.R., Jacob J. and Nambisan B. 2014. In Vitro Synergistic Effect of Curcumin in Combination with Third Generation Cephalosporins against Bacteria Associated with Infectious Diarrhea. Biomed Res Int. 2014:561456.

30. Sefidkon F. and Akbari-nia A. 2009. Essential Oil Content and Composition of *Satureja sahendica* Bornm. at Different Stages of Plant Growth. J Essent Oil Res. 21:112-114.

31. Serrano C., Matos O., Teixeira B., Ramos C., Neng N., Nogueira J., Nunes M.L. and Marques A. 2011. Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. J Sci Food Agric. 91:1554-1560.

32. Sharchi R., Shayegh J. and Hosseinzadeh S. 2020. Anti-quorum sensing and antibacterial activities of *Satureja sahendica* hydroalcoholic extract against avian isolate of *Salmonella* Typhimurium. Iran J Vet Sci Technol. 12:71-79.

33. Somers E.B., Schoeni J.L. and Wong A.C.L. 1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. Int J Food Microbiol. 22:269-276.

34. Su X. and Souza D.H. 2012. Reduction of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* on produce by trisodium phosphate. LWT - Food Sci Technol. 45:221-225.

35. Tepe B. and Cilkiz M. 2016. A pharmacological and phytochemical overview on *Satureja*. Pharm Biol. 54:375- 412.

36. Yousefzadi M., Riahi-Madvar A., Hadian J., Rezaee F. and Rafiee R. 2012. In vitro cytotoxic and antimicrobial activity of essential oil from *Satureja sahendica*. Toxicol Environ Chem. 94:1735-45.

37. Zareii B., Seyfi T., Movahedi R., Cheraghi J. and Ebrahimi S. 2014. Antibacterial Effects of Plant Extracts of Alcea Digitata L., *Satureja* Bachtiarica L. and Ferulago Angulata L. J Babol Univ Medical Sci. 16:31-37.

38. Zhuang R.Y. and Beuchat L.R. 1996. Effectiveness of trisodium phosphate for killing *Salmonella* Montevideo on tomatoes. Lett Appl Microbiol. 22:97-100.

Extract and Evaluation of the effect of *Satureja sahendica* hydroalcoholic Trisodium Phosphate on biofilm formation of *Salmonella Typhimurium* isolated from poultry

Ahmadpour M[1], Movassagh M.H[2*], Hosseinzadeh S[3]

1. D.V.M Graduate of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine, Shabestar branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

3. Faculty of Veterinary Medicine, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran.

[*]**Corresponding author:** *drmhmg@gmail.com*

Received: 20 December 2021 Accepted: 15 March 2022

Abstract

Salmonella Typhimurium (S. Typhimurium) is one of the most important worldwide public health concerns capable of forming biofilms on food contact surfaces. The aim of this study was to evaluate the antibacterial and anti-biofilm activity of Satureja sahendica hydroalcoholic extract (SSHE) and Trisodium Phosphate (TSP) against *S. Typhimurium* (n=20) isolated from poultry. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined using the microdilution broth method. To evaluate the anti-biofilm effects, the isolates were treated with inhibitory and sub-inhibitory concentrations of both substances and after 24 hours, the biofilm formation was evaluated. According to the results, the MICs of SSHE and TSP against *S. Typhimurium* isolates were ranged from 1.25-10 and 5-80 mg ml^{-1}, respectively. Also, MBCs value of SSHE and TSP were varied against isolates and were ranging from 40-160> and 80-160> mg ml-1, respectively. The results of statistical analysis showed that both of SSHE and TSP significantly reduced biofilm formation in *S. Typhimurium* compared to the control group (p<0.05). Also, the statistical results showed that SSEH reduces the rate of biofilm formation more than TSP (p<0.05). According to these results, SSHE can be a suitable alternative to chemicals such as TSP in the food industry to reduce bacterial contamination. However, its application requires further studies to determine its safety and toxicity.

Keywords: *Satureja sahendica*, Hydroalcoholic extract, Trisodium Phosphate, biofilm, *Salmonella Typhimurium*.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.