

## بررسی اثر ضد بیوفیلیمی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی

سعید اکبری<sup>۱</sup>، زهره دیدار<sup>۱\*</sup>، محسن وظیفه دوست<sup>۱</sup>، بهاره حاجی رستم‌لو<sup>۱</sup>، مهناز محتشمی<sup>۲</sup>

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران.

\*نویسنده مسئول: z\_didar57@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۲

## چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی ترکیب شیمیایی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه (*Piper nigrum*) و تمرکز بر فعالیت ضد بیوفیلیمی احتمالی آن علیه دو باکتری *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط شبیه سازی شده مدل غذایی انجام شد. برای شناسایی ترکیب شیمیایی عصاره فلفل سیاه از کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی (GC-MS) استفاده شد. فعالیت ضدبیوفیلیمی عصاره فلفل سیاه با استفاده از روش الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نتایج آنالیز GC-MS نشان داد که عمده ترکیبات موجود در عصاره فلفل سیاه شامل  $\delta$ -3-Carene ۲۰/۶۹ درصد، Limonene ۱۸ درصد، Caryophyllene ۱۷/۹۰ درصد و  $\beta$ -Pinene ۱۰/۵۲ درصد است. براساس نتایج به دست آمده در این تحقیق عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه با غلظت ۵۰ درصد بیشترین اثر را در ممانعت از تشکیل بیوفیلیم در هر دو باکتری مورد آزمون را داشت. علاوه بر این، بین اثر ضدبیوفیلیمی عصاره فلفل سیاه (۵۰ درصد) و پراستیک اسید (۵/۰ درصد) در غلظت مشابه تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین اختلاف معناداری از نظر نوع محیط رشد باکتری (محیط کشت TSB و عصاره ماهی) از نظر تشکیل بیوفیلیم باکتریایی در حضور عصاره فلفل سیاه وجود نداشت.

کلید واژه‌ها: بیوفیلیم، عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه، *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus subtilis*.

## مقدمه

پراکنده می‌شوند (Marchand et al., 2012; Srey et al., 2013). بیوفیلیم‌ها با مسدود کردن لوله‌ها در مبدل‌های حرارتی و برج‌های خنک کننده، میزان انتقال حرارت را به طور محسوس کاهش داده و همچنین سبب تجزیه غشاهای فرآپالایش می‌شوند (Sanjeev et al., 2014). علاوه بر اختلال در فرایندهای تکنولوژیکی و آلودگی خطوط تولید، بیوفیلیم‌ها با تشکیل در سطح مواد غذایی موجب بروز بیماری‌های منتقله غذایی می‌گردند (Bryers, 2000). تحقیقات جدید سعی در یافتن عوامل ضد میکروبی جدید دارد که دارای عوارض جانبی کم و بازدهی بیشتری هستند (Mohsenipour and Hassanshahian 2016). مطالعات برخی محققان به دلیل وجود اجزای مختلف زیست فعال در عصاره‌ها و اساس‌های گیاهی، بر فعالیت‌های بیولوژیکی و خاصیت

امروزه، استفاده گسترده از آنتی بیوتیک‌ها منجر به ظهور گونه‌های مقاوم شده‌است. افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها یک مسئله قابل توجه در بحث ایمنی و سلامت محسوب می‌شود. علاوه بر این، هنگامی که باکتری‌ها بیوفیلیم تشکیل می‌دهند، مقاومت آنها به عوامل ضد میکروبی افزایش می‌یابد (Kotze et al., 2002). بیوفیلیم در اصطلاح به تجمعی از سلول‌های میکروبی که قابلیت رشد بر روی سطوح مختلف را دارا می‌باشند و در داخل نوعی ماتریکس خارج سلولی و بی-شکل محصور شده اند، گفته می‌شود (Rodrigues et al., 2010). تشکیل بیوفیلیم در مراحل مختلف صورت می‌گیرد که شامل: اتصال اولیه، اتصال غیرقابل برگشت، توسعه اولیه ساختار بیوفیلیم و تکمیل ساختار بیوفیلیم می‌باشد که در نهایت متلاشی شده و باکتری‌های داخل آن

گونه آن در گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور انجام شد. قرص بافر فسفات سالین (PBS) شرکت سیگما آلدریج، کریستال ویوله شرکت نوترون، آب مقطر شرکت سیلان، اتانول ۹۶ درصد شرکت تقطیر خراسان، باکتری‌های لیوفیلیزه *Bacillus subtilis* (PTCC 1720) و *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1430) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند.

تهیه عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه

برای تهیه عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه از روش خیساندن استفاده شد. بدین منظور، ۵ گرم فلفل-سیاه با ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه شده در ارلن مایر ریخته، درب آن را با فویل آلومینیوم بسته و همزدن توسط شیکر در دمای اتاق به مدت ۷۲ ساعت انجام شد (Namjoyan et al., 2012). ترکیبات داخل ارلن مایر از طریق کاغذ صافی واتمن فیلتر شده و مایع فیلتر شده توسط اوپراتور دوار در دمای ۴۵ درجه سلسیوس تغلیظ شد. عصاره تا زمان استفاده در یخچال نگهداری و غلظت مورد نظر برای هر آزمایش از این عصاره مرجع تهیه شد.

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره فلفل سیاه

شناسایی ترکیبات شیمیایی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف سنج جرمی GC-MS مدل Agilent ۷۸۹۰ A با مشخصات انژکتور B۷۶۸۳، ستون مویرگی HP با طول ۳۰ متر، ID ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد (Barupal et al., 2019).

فعالسازی سویه‌های باکتریایی

کشت لیوفیلیزه سویه‌های باکتریایی ابتدا در محیط مایع استریل TSB تلقیح و جهت فعالسازی اولیه به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس سویه *Pseudomonas aeruginosa* در محیط کشت EMB آگار و سویه باکتریایی *Bacillus subtilis*

ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی آن‌ها متمرکز شده است. به عنوان مثال فعالیت ضد بیوفیلیمی گیاه زنیان (*Carum copticum*) علیه باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در اشکال پلانکتونیک و بیوفیلیم مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که حداکثر و حداقل اثرات مهاری عصاره متانولی این گیاه علیه *A.baumannii* (۹۸ درصد) و *K.pneumoniae* (۱۹ درصد) می‌باشد (Mohammadi et al., 2019). ارزیابی فعالیت‌های ضدبیوفیلیمی عصاره گیاهان *Sphedammocarpus pruriens* و *S.africana-lutea* نشان داد که مهار بالقوه‌ای را در برابر تشکیل بیوفیلیم باکتری *Mycobacterium smegmatis* در غلظت‌های ۹۵/۸ و ۶۲/۲ میکروگرم در میلی لیتر دارند (Oosthuizen et al., 2019). سال‌هاست که از فلفل-سیاه (*Piper nigrum*) به عنوان ادویه استفاده می‌شود. فلفل سیاه دارای اثرات ضدالتهابی حاصل از اثرات آنتی اکسیدان پی‌پرین آن روی رادیکال‌های آزاد می‌باشد و قادر به محافظت از بافت ملتهب در برابر صدمات پراکسیداتیو است (Greenberg et al., 2003). خواص درمانی و استفاده از فلفل سیاه در ساخت داروهایی با خاصیت درمانی نظیر ضدباکتری، ضدقارچی، ضد-افسردگی، ضدعفونی، ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان، ضدتب، ضداسپاسم، برای بهبود اشتها و قدرت گوارشی، ضد-سرماخوردگی، ضدسرفه به اثبات رسیده است (Ahmad et al., 2012; Islam et al., 2015). هدف از این مطالعه ارزیابی ترکیبات شیمیایی عصاره آبی-الکلی فلفل-سیاه و بررسی فعالیت ضدبیوفیلیمی آن در برابر باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط شبیه سازی شده مدل غذایی (عصاره گوشت ماهی) بود.

#### مواد و روش ها

محیط‌های کشت مورد استفاده در این پژوهش شامل EMB agar، Nutrient agar، TSB از شرکت مرک آلمان خریداری شد. فلفل سیاه (*Piper nigrum*) از بازار محلی شهر نیشابور خریداری شد و شناسایی نوع

ارزیابی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه در حذف بیوفیلم تشکیل شده در شرایط آزمایشگاهی برای بررسی توانایی عصاره فلفل سیاه در از بین بردن بیوفیلم‌های تشکیل شده، یک جمعیت کنترل شده ( $10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) از هر سویه باکتریایی در میکروپلیت-های ۹۶ چاهک کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن، غلظت‌های مختلف عصاره (۵۰-۱۰ درصد) در هر چاهک ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۵۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس، محتویات هر چاهک تخلیه و همانطور که قبلاً توضیح داده شد چند مرحله شستشو انجام شد. پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله، میزان جذب هر چاهک در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد (Todorov et al., 2018).

تهیه عصاره آبگوشت ماهی به عنوان مدل غذایی عصاره آبگوشت ماهی با استفاده از شرایط شبیه سازی فرآوری ماهی تهیه شد. بستر مدل آبگوشت استریل ماهی با روش استخراج که توسط Papaioannou و همکاران شرح داده شد، تهیه شد (Papaioannou et al., 2018). ابتدا سه کیلوگرم ماهی قزل آلا تازه از یک فروشگاه ماهی در مشهد خریداری و طی یک ساعت پس از خرید روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد. گوشت ماهی (۲۵۰ گرم) به صورت قطعات کوچک برش داده شد و با ۲۵۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از یک مخلوط کن به مدت ۲ دقیقه همگن شد (فلر ۸۰۰ KM آلمان). این روش به طور مناسب تکرار شد تا حجم لازم از آب مورد نیاز برای تمام آزمایشات شرح داده شده جمع شود. آبگوشت تهیه شده را از جامدات جدا کرده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۸۰-۸۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس، برای مدت ۱۵ دقیقه باقی مانده و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک فیلتر شد (Whatman Inc.; Clifton, NJ, USA) پس از آن به ظروف شیشه-

در محیط کشت نوترینت آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد ۳-۵ کلنی از هر جدایه باکتری را در ۳-۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن با نیم مک فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/ml) تنظیم شد. از این سوسپانسیون‌های باکتریایی در چاهک‌های مورد نظر در میکروپلیت‌ها استفاده شد.

ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلمی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاهی برای ارزیابی توانایی عصاره فلفل سیاه (*Piper Nigrum*) در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، ۱۰۰ میکرولیتر محیط برات TSB حاوی سویه‌های باکتریایی (تقریباً  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) به میکروپلیت‌های ۹۶ چاهک منتقل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف عصاره (۵۰-۱۰ درصد) در هر چاهک ریخته و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن، محیط کشت تخلیه و سه مرتبه چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر نمک بافر فسفات شسته شد (pH=7). مراحل بعدی شامل شستشو با اتانول ۹۶ درصد، رنگ آمیزی با ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله (۱ درصد) به مدت ۵ دقیقه و شستشوی باقیمانده محلول رنگ با آب مقطر بود. سپس، میکروپلیت خشک شده توسط دستگاه الایزا ریدر (مدل AWARENES) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. تشکیل بیوفیلم به شرح زیر طبقه بندی شد  $OD > 1$  معادل تشکیل بیوفیلم بالا و  $0 < OD < 1$  معادل تشکیل بیوفیلم متوسط و  $OD < 0.1$  معادل عدم تشکیل بیوفیلم (Noumi et al., 2017). از چاهک‌های حاوی محیط کشت مایع استریل بدون باکتری به عنوان کنترل منفی استفاده شد. همچنین از چاهک‌های حاوی محیط کشت و باکتری و فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. شاخص ضدبیوفیلم با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Antibiofilm Index} = \left( 1 - \frac{(\text{OD}_{570} \text{ Sample} - \text{OD}_{570} (-)\text{control})}{(\text{OD}_{570} (+)\text{control} - \text{OD}_{570} (-)\text{Control})} \right) \times 100$$

ای درب‌دار منتقل و بعد از اتوکلاو در دمای ۶-۸ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

ارزیابی فعالیت ضدبیوفیلمی و حذف بیوفیلم تشکیل شده عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه در شرایط شبیه سازی مدل غذایی

پس از تهیه عصاره ماهی (به عنوان محیط کشت)، اثرات عصاره فلفل سیاه در شرایط شبیه سازی عصاره ماهی به عنوان مدل غذایی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و حذف بیوفیلم تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله از عصاره ماهی به جای محیط کشت مایع در چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. در مطالعه حاضر، از پراستیک اسید (پرسیدین) که یکی از مواد ضد عفونی کننده سطوح پر کاربرد در صنایع غذایی است با غلظت ۰/۵ درصد نیز در هر دو آزمون استفاده شده و اثر ضدبیوفیلم آن با غلظت‌های مختلف (۱۰-۵۰ درصد) عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه مقایسه شد.

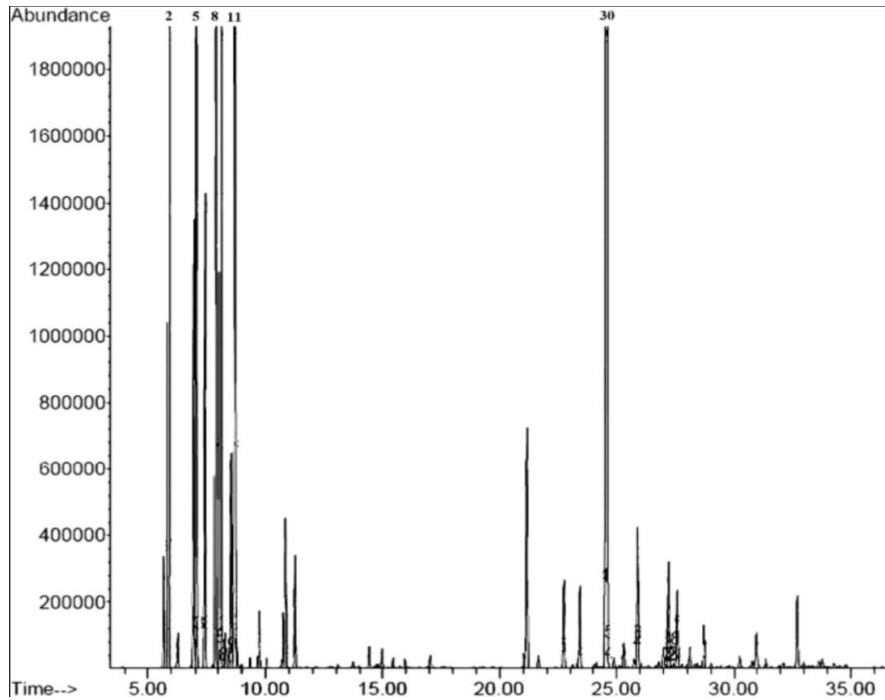
#### تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها در این مطالعه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایشات فاکتوریل  $3 \times 5 \times 2$  با ۲ سطح نوع نمونه باکتریایی، پنج سطح غلظت عصاره و دو نوع محیط کشت و در سه تکرار انجام شد. از نرم افزار SAS برای تجزیه و تحلیل اطلاعات و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد برای مقایسه‌ی میانگین داده‌ها استفاده شد.

#### نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه ترکیبات شیمیایی مشخص شده عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه در

جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده است. عمده ترکیبات اصلی با خواص آنتی‌باکتریالی یافت شده شامل  $\delta$ -3-Carene ۲۰/۶۹ درصد، Limonene ۱۸ درصد، Caryophyllene ۱۷/۹۰ درصد و  $\beta$ -Pinene ۱۰/۵۲ درصد می‌باشد (جدول ۱). نتایج مطالعه تران و همکاران (۲۰۱۹) نشان داد که عصاره آبی فلفل سیاه ترکیبات عمده آن شامل 3-carene ۲۹/۲۱ درصد، D-limonene ۲۰/۹۴ درصد، caryophyllene ۱۵/۰۵ درصد و  $\beta$ -pinene ۹/۷۷ درصد است (T.H Thien Hien Tran et al, 2019). جونگو لی و همکاران (۲۰۲۰) با بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره الکلی فلفل سیاه دریافتند عمده ترکیبات آن شامل  $\delta$ -3 carene (۲/۹ درصد)،  $\alpha$ -pinene (۱۷/۲ درصد)، caryophyllene (۱۸/۸ درصد) و DL-limonene (۱۴/۳ درصد)  $\beta$ -pinene می‌باشد (Joon-Goo Lee et al, 2020). شاهین عزیز و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی دو گونه فلفل سیاه هندی و بنگلادشی نشان دادند که عمده ترکیبات آن شامل Caryophyllene (۱۰/۶۶۱ و ۱۸/۳۹۳ درصد)، Alpha-pinene (۷/۳۵۰ و ۱۶/۶۸۵ درصد)، D-Limonene (۱۵/۲۲۲ و ۱۶/۱۶۸ درصد)، 3-Carene (۹/۲۲۸ و ۳۲/۶۱۱) و  $\beta$ -pinene (-) (۱۳/۲۰۴) می‌باشد (shahin Aziz et al 2012). کاپور و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ترکیبات تشکیل دهنده فلفل سیاه بیان کردند که عمده ترکیبات شامل  $\beta$ -Caryophyllene ۲۹/۹ درصد، Limonene ۱۳/۲ درصد) و  $\beta$ -Pinene (۷/۹) می‌باشد (I.P.S Kapoor et al., 2009).



شکل ۱- دیاگرام GC-MS ترکیبات عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه توسط GC-MS.

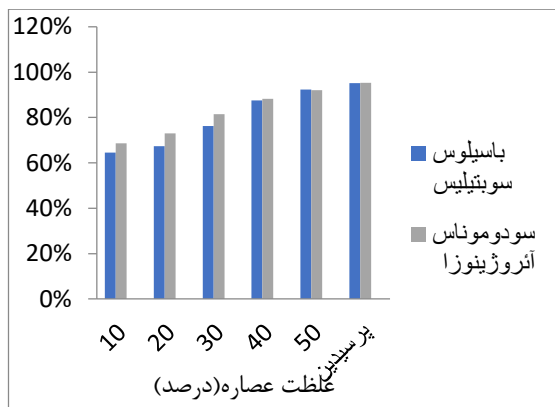
No	Name	RT (min)	Area%
1	$\alpha$ -Pinene	5.8	8.31
2	Camphene	6.3	0.49
3	Sabinene	6.9	3.36
4	$\beta$ -Pinene	7.2	10.52
5	<i>Para</i> _Cymene	7.4	2.77
6	$\alpha$ -Phellandrene	7.9	5.37
7	$\delta$ -3-Carene	8.1	20.69
8	$\alpha$ -Terpinene	8.4	0.34
9	Myrcene	8.6	1.56
10	Limonene	8.7	18.00
11	<i>Para</i> -Mentha-2,4(8)-diene	8.8	0.12
12	$\gamma$ -TerPinene	9.0	0.06
13	1,8-Cineole	9.2	0.09
14	(Z)- $\beta$ -Ocimene	9.6	0.19
15	(E)- $\beta$ -Ocimene	10.2	0.05

16	<i>Cis</i> -Sabinene hydrate	10.5	0.31
17	Terpinolene	10.9	1.01
18	Terpinene-4-ol	11.5	0.44
19	1,3,8- <i>Para</i> -Menthatriene	11.8	0.01
20	Camphor	13.4	0.05
21	Ethyl 6,9,12-hexadecatrienoate	14.4	0.23
22	Cumin aldehyde	15.6	0.16
23	$\alpha$ -Terpineol	16.9	0.11
24	$\delta$ -Elemene	21.1	2.03
25	$\alpha$ -Copaene	21.7	0.11
26	$\beta$ -Elemene	22.3	0.53
27	$\alpha$ -Cubebene	23.3	0.66
28	$\alpha$ -Gurjunene	24.5	0.05
29	Caryophyllene	24.8	17.90
30	Germacrene D	25.3	0.21
31	$\alpha$ -Guaiene	25.6	1.29
32	$\alpha$ -Selinene	26.7	0.18
33	$\alpha$ -Humulene	27.2	0.92
34	$\beta$ -Selinene	27.6	0.70
35	$\alpha$ -Muurolene	27.9	0.04
36	Piperidine, 1-(1-oxo-3-phenyl-2-propenyl)-	28.0	0.18
37	$\gamma$ -Cadinene	28.3	0.03
38	$\delta$ -Cadinene	28.5	0.04
39	Caryophyllene oxide	28.7	0.40
40	Spathulenol	30.1	0.13
41	$\beta$ -Bisabolene	30.9	0.07
42	$\delta$ -Amorphene	31.0	0.29
43	Total		100

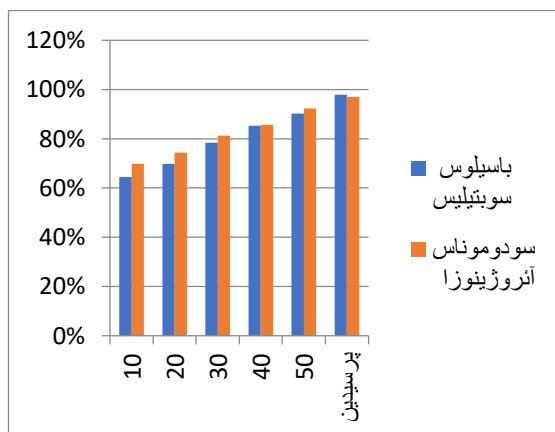
آزمایشگاهی (تلقیح بیوفیلیم باکتریایی در محیط کشت مایع (TSB) و مدل غذایی ماهی (تلقیح بیوفیلیم باکتریایی در عصاره گوشت ماهی) بر مهار تشکیل بیوفیلیم و بر بیوفیلیم تشکیل شده ارزیابی شد. تشکیل بیوفیلیم‌ها،

فعالیت ضد بیوفیلیمی عصاره فلفل سیاه در شرایط آزمایشگاهی و مدل غذایی در این مطالعه اثرات غلظت‌های مختلف عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه (۱۰ درصد الی ۵۰ درصد) در شرایط

(۲۰۱۷) با مطالعه اثر عصاره فلفل سیاه بر چند سویه *Pseudomonas aeruginosa* دریافتند که غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر عصاره *Piper nigrum* توانایی مهار ۵۰ درصدی بیوفیلیم در همه سویه‌های مورد آزمایش را دارد و همچنین بالاترین بیوفیلیم تشکیل دهنده *P.aeruginosa* سویه YUPA21 نیز کاهش قابل توجهی بر تشکیل بیوفیلیم در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از خود نشان داد (Ashwini Prabhu et al., 2017).



شکل ۲- تاثیر پرسیدین و غلظت عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه بر حذف بیوفیلیم تشکیل شده در عصاره ماهی



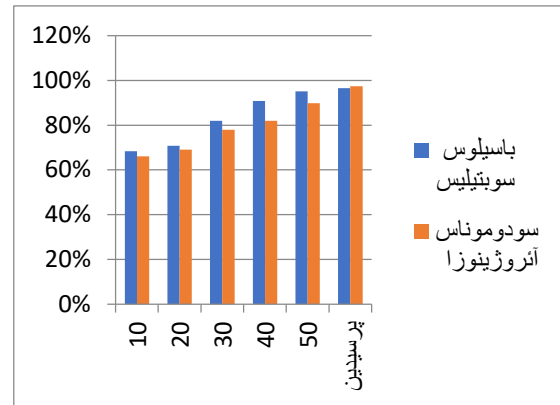
شکل ۳- تاثیر پرسیدین و غلظت عصاره آبی-الکلی فلفل سیاه بر ممانعت از تشکیل بیوفیلیم در عصاره ماهی

به ویژه بیوفیلیم باکتری‌های بیماری‌زا، باعث ایجاد مشکلات آلودگی قابل توجه در صنایع غذایی می‌شود، از این رو همیشه تلاش برای به دست آمدن روشی کارآمد برای حذف بیوفیلیم‌ها ادامه داشته است. نتایج نشان داد که غلظت ۵۰ درصد عصاره فلفل سیاه علاوه بر ممانعت از تشکیل بیوفیلیم (شکل ۳ و شکل ۵) در حذف بیوفیلیم تشکیل شده (شکل ۲ و شکل ۴) نیز نسبت به غلظت‌های کمتر تاثیر بیشتری داشته است. با افزایش غلظت عصاره، غلظت ترکیبات زیست فعال نیز افزایش می‌یابد که منجر به تشکیل بیوفیلیم کمتری می‌شود. Piperine موجود در فلفل سیاه دارای خواص ضد میکروبی بسیار بالایی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*) و باکتری‌های گرم منفی (*Bacillus subtilis* Hikal D.M., *Salmonella sp*, *E.coli*) می‌باشد (2018). همچنین این فعالیت‌ها در  $\alpha$ - $\delta$ -3-Carene، Pinene و p-Cymene نیز توسط Uzel و همکارانش (۲۰۰۶) به اثبات رسیده است (Uzel, et al 2006). هیوان و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثرات فعالیت‌های ضد بیوفیلیمی Caryophyllene دریافتند که این ترکیب بر مهار تشکیل بیوفیلیم و جلوگیری از رشد بیوفیلیم باکتری *Streptococcus mutans* موثر است (Hyun- Jun yoo et al., 2018). کایون لی و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی ۸۳ عصاره و اسانس نشان دادند که عصاره فلفل سیاه به طور قابل توجهی از تشکیل بیوفیلیم باکتری *Staphylococcus aureus* جلوگیری می‌کند و بیان ژن آلفا توکسین، ژن‌های نوکلئاز و تنظیم کننده را کاهش می‌دهد (Kayeon Lee., 2014). آشوینی و همکاران

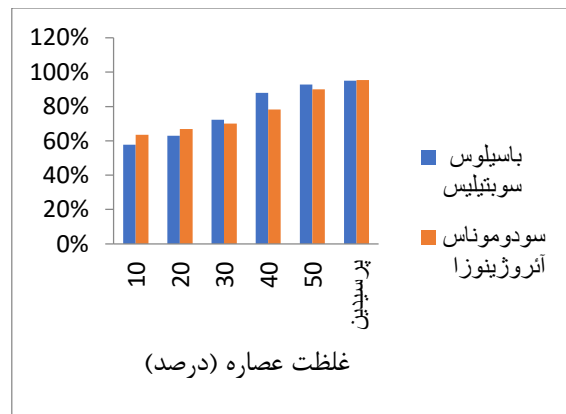
عصاره گوشت توانایی اتصال باکتری‌های سالمونلا به سطح را بالا برده و شرایط تشکیل بیوفیلم را فراهم می‌کنند. (Li, j et al, 2017). مطالعات نشان دادند که سویه باکتریایی *Staphylococcus aureus* در محیط‌ها و سطوح حاوی آبگوشت از ظرفیت بالای تشکیل بیوفیلم برخوردار است و این بیوفیلم چسبندگی بالایی به سطوح پلی پروپیلن و فولاد ضدزنگ دارد و همچنین مواد ضدعفونی کننده پراستیک‌اسید و هیپوکلریت سدیم قادر به حذف کامل این بیوفیلم‌ها نیستند (De Souza E.L et al 2014). وجود باقیمانده ذرات غذا بر روی سطوح مقاومت باکتری‌های تشکیل شده بر روی این سطوح را در برابر عوامل ضدعفونی کننده افزایش می‌دهد و باعث بی‌اثر شدن عملکرد فرایندهای ضدعفونی و در نتیجه ایجاد آلودگی ثانویه بر روی سطوح می‌شود (Gram et al, 2007). فعالیت ضد بیوفیلیمی پراستیک اسید نیز در مطالعه حاضر ارزیابی شد و نتایج نشان داد که نمونه‌های حاوی اسید پراستیک کمترین جذب را در ۵۷۰ نانومتر را داشتند که نشانگر بالاترین فعالیت ضدبیوفیلیمی است. T.chino و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کرد که اسید پراستیک اثرات ضدبیوفیلیمی قابل توجهی در برابر *S. aureus* و *P.aeruginosa* دارد (Chino et al, 2017). لی (۲۰۱۵) گزارش داد که اسید پراستیک ۰/۵ درصد قادر به غیرفعال کردن بیوفیلم‌های *S.aureus* و *L.monocytogenesmono* بر روی فولاد ضدزنگ است، اما فقط قادر به حذف سلول‌های چسبیده *S.aureus* بر روی میکروپلیت پلی‌استایرن است (Lee et al, 2015).

#### نتیجه گیری کلی

طبق نتایج این مطالعه، عصاره آبی-الکی فلفل سیاه در غلظت ۵۰ درصد بهترین اثر ضدبیوفیلیمی را بر دو باکتری *B.Subtilis* و *P.aeruginosa* از خود نشان داد که با اثر ضدبیوفیلیمی پراستیک اسید اختلاف معناداری نداشت. بنابراین می‌توان عصاره آبی-الکی فلفل سیاه را به عنوان



شکل ۴- تاثیر پرسیدین و غلظت عصاره آبی-الکی فلفل سیاه بر حذف بیوفیلم تشکیل شده در محیط کشت TSB



شکل ۵- تاثیر پرسیدین و غلظت عصاره آبی-الکی فلفل سیاه بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم در محیط کشت TSB

با توجه به شکل‌های دو، سه، چهار و پنج عصاره آبی-الکی فلفل سیاه با غلظت ۵۰ درصد در محیط کشت براث بیشترین اثر را در حذف بیوفیلم‌های تشکیل شده (۹۳ درصد) و هم در ممانعت از تشکیل بیوفیلم (۹۵ درصد) باکتری *B.subtilis* را داشت. با توجه به بالاترین میزان جذب در نمونه‌های حاوی عصاره ماهی به عنوان محیط کشت می‌توان نتیجه گرفت که ریز مغذی‌های موجود در عصاره ماهی تاثیر مستقیم بر رشد و اتصال باکتری‌ها و در نتیجه تشکیل بیوفیلم دارند. لی و همکاران (۲۰۱۷) دریافتند سطوحی که با عصاره گوشت پوشانده شده باشد، توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های کمپیلوباکتر تاژک‌دار و سالمونلا را افزایش می‌دهد، بدین ترتیب که ذرات



activities of black pepper, cananga, myrrh oils, and nerolidol against

9. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng Y.Y., Gyomai, P., Vogel, B.F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control 18: 1165–1171.
10. Hikal, D.M. 2018. Antibacterial activity of piperine and black pepper oil. Biosci Biotechnol. Res asia 15(4): 877-880.
11. Hyun-jun, Yoo. Su-kyung Jwa. 2018. Inhibitory effects of  $\beta$ -caryophyllene on *Streptococcus mutans* biofilm. Int. J. Oral Biology 88: 42-46.
12. I.P.S, Kapoor., Bandana, singh., Gurdip, singh., Carola, S. De, Heluani., M.P.De, Lampasona., Cesar, A.N, Catalan. 2009. Chemistry and in Vitro Antioxidant Activity of Volatile Oil and Oleoresins of Black Pepper (*Piper nigrum*). J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 12, 5358–5364.
13. Islam, M.S., Noor, M.A., Hossain, M.S. 2015. Chemical investigation of bioactive compounds of black pepper. Int J Pharm Sci Res 6(4):1721–1726.
14. Joon-Goo, Lee. Young, chae. Youngjae, shin. Young-Jun, kim. 2020. Chemical composition and antioxidant capacity of black pepper pericarp. Internet J. Sci.: Biol. Chem. 63:35 (2020).
15. Kotze, M., Eloff, J.N., 2002. Extraction of antibacterial compound from *Combretum microphyllum* (*Combretaceae*). South Afr. J. Bot 68: 62–67
16. Lee, S.H.I., Cappato, L.P., Corassin, C.H., Cruz Oliveira, C.A.F. 2015. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. J. Dairy Sci 99: 2384–2390.
17. Li, J., Feng J., Ma, L., de la, Fuente Núñez C., Gözl G., Lu X., 2017. Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol 253: 20–28.
18. Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., Herman, L. 2012. Biofilm formation in milk production

یک ترکیب طبیعی و ایمن جهت حذف بیوفیلم این باکتری‌ها معرفی نمود. البته تحقیقات گسترده تری جهت ارزیابی اثر این عصاره و سایر عصاره‌های گیاهی بر روی بیوفیلم باکتری‌های مختلف دیگر نیاز است که در آینده انجام گیرد.

#### منابع

1. Ahmad, N., Fazal, H., Abbasi, BH, *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol. Biotechnol 98: 9447-9457.
2. Farooq, S., Ali, M., Khan, M. 2012. Biological role of *Piper nigrum* L. (Black pepper): A review. Asian Pac. J. Trop. Biomed 2(3):S1945–S1953.
3. Ashwini, Prabhu., Vipin, Chembili., Thasleema, Kandal., Rekha, Panchappady-Devasya. 2017. Piper nigrum seeds inhibit biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* strains. Research J. Pharm. and Tech 2017; 10(11): 3894-3898.
4. Barupal, T., Meena, M., Sharma, K. 2019. Inhibitory effects of leaf extract of *Lawsonia inermis* on *Curvularia lunata* and characterization of novel inhibitory compounds by GC-MS analysis. J. Appl. Biotechnol. Rep 23: e00335.
5. Bryers, J. 2000. Biofilm Formation and Persistence. NewYork: Wiley-Liss.
6. Chino, T., Nukui, Y., morishita, Y., moriya, K. 2017. Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. Antimicrob Resist Infect control 6:122.
7. De Souza, E.L., Silva Meira, Q.G., Barbosa, I.M., Aguiar Athayde, A.J.A., Conceição, M.L., Siqueira Júnior J.P. 2014. Biofilm formation by *S.aureus* from food contact surfaces in meat-based broth and sensitivity to sanitizers. Braz. J. Microbiol. 45(1): 67-75.
8. Kayeon, Lee., Jin –Hyung, Lee., Soon-Il Kim., Moo Hwan, cho., Jintae, Lee. 2014. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence and processing environments: influence on milk quality and safety. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf 11(2): 133–147.

19. Greenberg, M.S., Glick, M. 2003. *Burket's Oral medicine. Diagnosis and Treatment*, 10th ed. BC Decker Inc hamilton:307\_316.
20. Mohammadi, M., Masoumipour, F., Hassanshahian, M., Jafarinasab, T. 2019. Study the antibacterial and antibiofilm activity of *Carum copticum* against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm forms *Microb Pathog*. 129: 99–105.
21. Mohsenipour, Z., Hassanshahian, M. 2016. Antibacterial activity of *Euphorbia hebecarpa* alcoholic extracts against six human pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms, *Jundishapur J. Microbiol* 9(6): e34701.
22. Namjoyan, Foroogh., Hejazi, Hoda., Ramezani, Zahra. 2012. Evaluation of Drying Process on the Composition of Black Pepper Ethanolic Extract by High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector, *J. Jundishapur J Nat pharm* 7(4): 163–167.
23. Noumi, E., Snoussi, M., Merghni, A., Nazzaro, F., Quindos, G., Akdamar, G., Mastouri, M., Al-sieni, A., Ceylan, O. 2017. Phytochemical composition, anti-biofilm and antiquorum sensing potential of fruit, stem and leaves of *Salvadora persica L.* methanolic extracts. *Microb. Pathog* 109: 169–176.
24. Oosthuizen, C.B., Gasa, N., J.Hamilton, C., Lall, N. 2019. Inhibition of mycothione disulphide reductase and mycobacterial biofilm by selected South African plants. *S. Afr. J. Bot* 120: 291–297.
25. Papaioannou, E., Giaouris, E.D., Panagiotis Berillis, P., Ioannis, S., Boziaris, I.S. 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *Int J Food Microbiol* 267: 9-19.
26. Rodrigues, L.B., Santos, L.R.D., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.P.D., Goetz, F., Nascimento, V.P.D. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz. J. Microbiol* 41(4): 1082–1085.
27. Sanjeev, Anand., Diwakar, Singh., Mallika, Avadhanula., Sowmya, Marka. 2014. Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2014 Jan; 13(1):18-33.
28. Shahin, Aziz., Shamsun, Naher., MD, Abukawsar., Sudhungshu, Kumar, Roy. 2012. Comparative Studies on Physicochemical Properties and GC-MS Analysis of Essential Oil of the Two Varieties of the Black Pepper (*Piper nigrum Linn.*). *Int.J.Pharm.Phytopharmacol.Res.*2012, 2(2): 67-70.
29. Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31(2): 572–585.
30. Thien, Hien, Tran., Le, Ke, Ha., Duy, Chinh, Nguyen., Tan, Phat, Dao1., Le, ThiHong, Nhan., Dai, Hai, Nguyen., Trinh, Duy, Nguyen., Dai-Viet, N. Vo, Quoc Toan Tran and Long Giang Bach. 2019. The Study on Extraction Process and Analysis of Components in Essential Oils of Black Pepper (*Piper nigrum L.*) Seeds Harvested in Gia Lai Province, Vietnam, *Int. J. mdpi* 2227-9717.
31. Todorov, S.D., DePaula, O.A.L., Camargo, A.C., Lopes, D.A., Nero, L.A. 2018. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *Revista Argentina DeMicrobiologia*. 50: 48–55.
32. Uzel, A., Dirmenci, T., Celik, A., Arabaci, T., 2006. Composition and antimicrobial activity of *Prangos platychnaena* and *P. uechtritzi*. *J. Chem. Nat. Compd*. 42: 169–171.

## Evaluation of anti-biofilm effect of aqueous-alcoholic extract of black pepper in vitro and food model

Akbari S<sup>1</sup>, Didar Z<sup>1\*</sup>, Vazifedoost M<sup>1</sup>, Hajirostamloo B<sup>1</sup>, Mohtashami M<sup>2</sup>

1. Department of Food Science and Technology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.
2. Department of Biology, School of Basic Science, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, Iran.

\* Corresponding Author: z\_didar57@yahoo.com

Received: 03 November 2021

Accepted: 01 February 2022

### Abstract:

The present study aimed to investigate the chemical composition of black pepper (*Piper nigrum*) aqueous-alcoholic extract and focus on its possible anti-biofilm activity against the two bacteria *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in simulated conditions of the food model. Chemical analysis was used to identify the chemical composition of black pepper extract by mass spectrometry gas chromatography (GC - MS). The anti-biofilm activity of black pepper was measured using an automatic ELISA reader at 570 nm wavelength. The GC - MS analysis results indicated that the major compounds in black pepper extract include  $\delta$ -3-Carene (20.69%), Limonene (18%), Caryophyllene (17.90%) and  $\beta$ -Pinene (10.52%). According to the results in this study, black pepper aqueous- alcoholic extract with a 50% concentration had the highest effect in preventing the biofilm formation of both bacteria. In addition, there was no significant difference between black pepper extract (50%) and peracetic acid 0/5% in the antibiofilm activity. There was also no significant difference in the type of bacterial growth media (TSB culture and fish extract) on bacterial biofilm formation in the presence of black pepper extract.

**Keywords:** Biofilm, Aqueous-alcoholic extracts of black pepper, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

is 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 © 2021 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.