

# جداسازی و شناسایی برخی از باکتری‌های دریایی تشکیل دهنده بیوفیلم از آب‌های خلیج فارس و بررسی اثر ضد باکتری و ضد بیوفیلم تیمول بر آنها

فاطمه صداقت<sup>1</sup>، مرتضی یوسف‌زادی<sup>۱،۲\*</sup>، آرش قادری<sup>۳</sup>، فاطمه شایسته<sup>۴</sup>

- 1- دکتری، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- 2- استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران
- 3- دانشیار، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- 4- استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

\* نویسنده مسئول: Morteza110110@gmail.com

پذیرش: 1400/10/7

دریافت: 1400/6/13

## چکیده

در محیط دریا، بیوفیلم تشکیل شده بر سطوح غوطه‌ور، منجر به فولینگ ارگانسیم‌های بزرگ‌تر می‌شود که این امر مشکلات اقتصادی و زیست‌محیطی فراوانی برای صنایع دریایی به همراه دارد. با توجه به آثار زیان‌آور آنتی‌فولینگ‌های شیمیایی، توسعه راهکارهای ضد بیوفیلم سازگار با محیط زیست می‌تواند گامی مهم برای کنترل فولینگ باشد. از این رو، مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم از آب‌های خلیج فارس و بررسی اثر ضد میکروبی تیمول بر باکتری‌های منتخب انجام گرفت. 82 ایزوله باکتریایی جداسازی و توانایی تشکیل بیوفیلم توسط آنها سنجش شد. در این میان، پنج ایزوله انتخاب و شناسایی با استفاده از توالی 16S rRNA انجام شد. نتایج نشان داد که پنج ایزوله منتخب متعلق به شاخه Proteobacteria (جنس *Kangiella*, *Vibrio* و *Pseudoaltromonas*) می‌باشند. در بررسی اثر ضد باکتری تیمول به روش انتشار دیسک، ایزوله *K. spongicola* (PH1) (با قطر هاله  $18 \pm 0/57$  میلی‌متر)، بیشترین حساسیت را نشان داد. کمترین غلظت بازدارنده (MIC) و کشنده رشد (MBC) (به ترتیب در غلظت 31/5 و 62/5 میکروگرم/میلی‌لیتر) نیز در مقابل ایزوله مذکور بدست آمد. نتایج حاصل از بررسی قدرت مهار تیمول بر پدیده تشکیل بیوفیلم و همچنین تخریب بیوفیلم تشکیل شده ایزوله (PH18) *Pseudoaltromonas* sp. نشان داد که تیمول در غلظت‌های کمتر از MIC قادر به مهار تشکیل بیوفیلم است که این تأثیر بر تخریب بیوفیلم در غلظت‌های بالاتر از MIC جالب توجه است. براساس نتایج بدست آمده، به دلیل فعالیت ضد بیوفیلم تیمول در مقابل باکتری‌های دریایی، استفاده از آن به عنوان یک ترکیب طبیعی در پوشش‌های آنتی‌فولینگ پیشنهاد می‌شود.

کلید واژگان: باکتری دریایی، حداقل غلظت بازدارندگی، 16S rRNA، ضد بیوفیلم، تیمول.

## مقدمه

چسبندگی زیستی دریایی که به طور معمول با عنوان بیوفولینگ بیان می شود، به تجمع، چسبیدن و رشد میکروارگانیسم ها، گیاهان و جانوران بر سطوح مختلف غوطه ور در آب دریا گفته می شود. این سطوح شامل بسترهای طبیعی غیرزنده (مانند سنگ، چوب و صخره های مرجانی)، بسترهای مصنوعی (مانند سازه های دریایی، بدنه کشتی ها و قایق ها) و همچنین بدن موجودات زنده می باشد. بیش از 4000 گونه از جانداران فولینگ در سراسر جهان گزارش شده است که اغلب در آب های کم عمق ساحلی زندگی می کنند [1]. این جانداران به دو گروه میکروفولینگ (شامل جانداران تک سلولی مانند باکتری ها، قارچ ها، دیاتومه ها و اسپورهای جلبک ها) و ماکروفولینگ شامل گونه های بزرگ تر (مانند بارناکل ها، بربوزوآ، صدف های دو کفه ای، جلبک ها و کرم های پرتار) تقسیم می شوند [2].

پدیده میکروفولینگ به شکل گیری و توسعه بیوفیلم بر سطوح شناور در آب اشاره دارد. بیوفیلم ها اجتماعی از جانوران، گیاهان میکروسکوپی و باکتری ها هستند که به یک سطح می چسبند و لایه ای ژله ای را به وجود می آورند. این لایه علاوه بر اینکه محیط مناسب برای رشد موجودات را فراهم می کند، باعث بهتر چسبیدن و پایدار ماندن میکروب ها روی سطوح شده و نقش حفاظتی نیز دارد [3]. چسبندگی باکتریایی در یک فرآیند دو مرحله ای، چند دقیقه تا چند ساعت پس از غوطه وری اتفاق می افتد [4؛ 5]. این اتصال به سوبسترا نخست برگشت پذیر است، اما به دلیل ترشح پلیمرهای خارج سلولی (اسید پلی ساکاریدها) که یک پل پلیمری بین سوبسترا و سلول ایجاد می کنند، برگشت ناپذیر می شود. در این اجتماع سلول های چسبیده به هم، باکتری ها توسط ماتریسی از مواد پلیمری خارج سلولی احاطه می شوند که از آنها در برابر تغییرات دما، pH، شوری، اشعه ماورای

بنفش، تخلیه مواد مغذی، ترکیبات ضد میکروبی و شکار شدن محافظت می کند [6].

بیوفیلم و بیوفولینگ دریایی هزینه های بسیار زیادی را به صنایع دریایی تحمیل می کنند. بیوفیلم های دریایی به آسانی سطح سازه های انسانی را اشغال می کنند و باعث تسریع در روند خوردگی فلزات و چسبندگی زیستی می شوند. همچنین ممکن است بر شناوری پلاستیک های پلی اتیلنی نیز مؤثر باشند. نشست این گونه ها بر بدنه کشتی ها می تواند سرعت را کاهش و مقاومت اصطکاکی و مصرف سوخت را به طور چشمگیری افزایش دهد. همچنین باعث کاهش ظرفیت حمل و سرعت جریان آب در خطوط لوله و گرفتگی تورها و قفس های پرورش آبزیان شده و خسارت های اقتصادی مختلف دیگری را نیز به دنبال دارد [4].

امروزه از روش های مختلف زیستی و شیمیایی به منظور جلوگیری از استقرار و انباشت موجودات فولینگ (ماکرو و میکروفولینگ) بر بدنه کشتی ها و سطوح غوطه ور در آب دریا استفاده می شود. یکی از روش های موفقیت آمیز و رایج به کارگیری پوشش های آنتی فولینگ است که بیش تر از نوع رنگ می باشند. عملکرد این رنگ ها به عنوان آنتی فولینگ با آزادسازی مداوم ترکیب های سمی، مانند مس، آلومینیوم و غیره در محیط دریا همراه است [7]. اگرچه ثابت شده است که استفاده از ترکیب هایی چون تری بوتیل قلع و مس در رنگ های آنتی فولینگ، به لحاظ کارایی، دوام و هزینه بسیار مؤثر است، اما سمی بودن این ترکیب ها و آثار جانبی آنها بر ارگانیسم های غیرهدف، استفاده از آنها را با ممنوعیت و محدودیت مواجه کرده است [8]. این مسئله باعث شده است که در سال های اخیر تقاضا برای تولید رنگ های بر پایه ترکیب های طبیعی که ضمن سازگاری با محیط زیست به لحاظ اقتصادی نیز سودآور باشند، افزایش پیدا کند.

ضدمیکروبی این ترکیب به دلیل برهمکش آن با پروتئین‌های غشای سلولی است که می‌تواند منجر به رسوب، نشت یون‌ها و دیگر محتویات سلول شده و در نهایت باعث لیز شدن و مرگ سلول‌ها شود [12].

با توجه به مطالب بیان شده و به دلیل اهمیت موضوع بیوفیلم و بیوفولینگ به‌ویژه در صنایع دریایی، در پژوهش حاضر، نخست برخی از باکتری‌های دریایی تشکیل‌دهنده بیوفیلم از آب‌های خلیج فارس جداسازی و پس از تخلیص و شناسایی، فعالیت ضد باکتری و ضد بیوفیلم تیمول در مقابل باکتری‌های منتخب سنجش شد.

#### مواد و روش‌ها

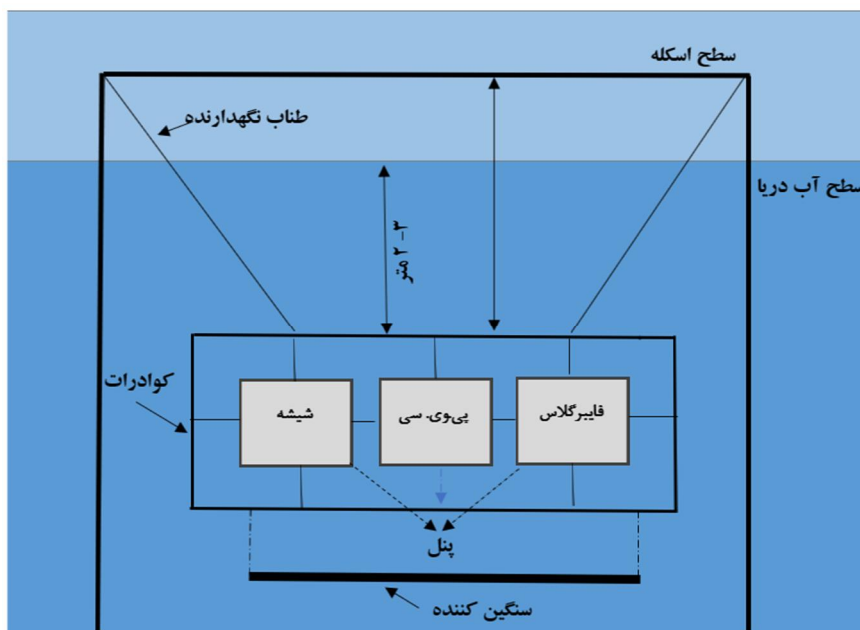
#### آماده‌کردن پنل‌ها و نمونه‌برداری میدانی از مناطق

##### مطالعه‌شده

برای تهیه نمونه‌های بیوفیلم، پنل‌هایی به ابعاد  $10 \text{ cm} \times 10$  در کوادراتی ساخته شده از لوله پی.وی.سی، که مطابق با شکل 1 طراحی گردید، قرار داده شدند. از سه پنل با جنس فایبرگلاس، شیشه و پی.وی.سی برای این منظور استفاده شد.

با توجه به اینکه فولینگ دریایی یک فرآیند چندمرحله‌ای است که در آن کلونیزاسیون باکتری‌ها قبل از استقرار ماکروفولینگ‌ها اتفاق می‌افتد، بنابراین استفاده از ترکیب‌های ضد باکتری می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد برای قطع فرآیند فولینگ در مراحل اولیه مطرح باشد [7]. چندین راهکار به‌منظور جلوگیری از چسبندگی باکتریایی به سطوح مختلف پیشنهاد شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از ترکیب‌های طبیعی چون اسانس اشاره کرد [9]. اسانس‌ها ترکیب‌های فراری هستند که به‌وسیله گیاهان به‌صورت متابولیت ثانویه تولید می‌شوند [10]. تاکنون مطالعات زیادی در مورد فعالیت ضد باکتری (در هر دو حالت پلانکتونی و ثابت (بیوفیلم)) اسانس‌های مختلف گزارش شده است [9]، اما پژوهش‌ها نشان می‌دهد که به‌طور کلی، قوی‌ترین خواص ضدباکتری مربوط به اسانس‌های حاوی ترکیب‌های فنولی چون کارواکرول، تیمول و اوژنول می‌باشد [11].

تیمول جزء اصلی و مهم اسانس‌های خانواده نعناعیان است و به‌عنوان یک بازدارنده بالقوه تشکیل بیوفیلم در بسیاری از باکتری‌ها شناخته شده است [9]. اثر



شکل 1 طرح شماتیک نحوه قرار گرفتن پنل‌ها در آب دریا

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت‌های 96 چاهک انجام شد. بدین منظور، ابتدا هر کلنی باکتریایی به لوله‌ی حاوی محیط کشت مرین براث اضافه شد و در دمای 28 درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، به منظور تشکیل بیوفیلم روی سطوح میکروپلیت، به هر چاهک، 100 میکرولیتر محیط کشت مایع و 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی ( $10^6$  CFU/ml) اضافه شد و به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از انکوباسیون، فاز رویی تخلیه و چاهک‌ها سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس به منظور تثبیت بیوفیلم باکتریایی، میکروپلیت به مدت 30-45 دقیقه در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از خشک شدن، 200 میکرولیتر محلول کریستال ویوله (0/2 درصد) به هر چاهک اضافه و بعد از 15 دقیقه، چاهک‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند. در ادامه، 200 میکرولیتر استیک اسید 33 درصد به چاهک‌ها اضافه شد و جذب نوری در طول موج 595 نانومتر با میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد [14]. توانایی تشکیل بیوفیلم بر اساس روش توضیح داده شده به وسیله استپانوویس<sup>2</sup> و همکاران (2007) ارزیابی شد که بر اساس آن باکتری‌ها از نظر تشکیل بیوفیلم به چهار دسته عدم تشکیل بیوفیلم، تشکیل بیوفیلم ضعیف، تشکیل بیوفیلم متوسط و تشکیل بیوفیلم قوی تقسیم شدند [15].

نمونه برداری در آب‌های خلیج فارس در دو منطقه و دو ایستگاه انجام شد. اسکله پشت شهر در بندرعباس ( $27^{\circ}10'10''\text{N } 56^{\circ}15'53''\text{E}$ ) و اسکله کندالو در جزیره قشم ( $26^{\circ}41'49''\text{N } 55^{\circ}54'46''\text{E}$ ) به عنوان دو ایستگاه مطالعه شده در این پژوهش انتخاب شدند. پنل‌های استریل در عمق 2-3 متری و به مدت یک هفته در این مناطق در آب دریا غوطه‌ور شدند.

### جمع‌آوری نمونه‌های بیوفیلم

نمونه‌های بیوفیلم از سطح هر پنل، با استفاده از یک اسکالپل تراشیده شده و به فالكون‌های حاوی 10 میلی‌لیتر آب دریا استریل منتقل شدند. به منظور جلوگیری از آلودگی میکروبی و تکثیر، انتقال فالكون‌ها به آزمایشگاه در ظروف حاوی یخ انجام گرفت.

### جداسازی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم

بعد از انتقال فالكون‌های حاوی نمونه‌های بیوفیلم به آزمایشگاه و ورتکس کردن به مدت 5 دقیقه، یک میلی‌لیتر از محلول حاصل به 9 میلی‌لیتر آب دریا استریل اضافه شد. بعد از آماده کردن رقت‌های مختلف، 100 میکرولیتر از هر رقت بر پلیت‌های حاوی محیط کشت زوبل مرین آگار<sup>1</sup> (که ترکیب آن در جدول 1 فهرست شده است) اسپری شد. پلیت‌ها به مدت یک هفته در دمای 28 درجه سانتی‌گراد انکوبه و در ادامه کلنی‌های باکتریایی با ویژگی‌های مورفولوژیکی مختلف، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مرین آگار جدید منتقل شدند. در نهایت، نگهداری و ذخیره ایزوله‌های تخلیص شده در دمای 80- درجه سانتی‌گراد و در محیط تازه‌ای که حاوی 50 درصد گلیسرول می‌باشد، انجام شد [13].

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم ایزوله‌های تخلیص شده

جدول 1 مواد مصرف‌شده در محیط کشت مرین آگار

مقدار مورد مصرف (گرم/لیتر)	مواد شیمیایی
5/00	پپتون
1/00	عصاره مخمر
0/10	سیترات آهن
19/45	سدیم کلراید
3/24	سدیم سولفات
0/16	سدیم بی‌کربنات
0/004	سدیم سیلیکات
0/002	سدیم فلوراید
0/008	دی‌سدیم فسفات
1/80	کلسیم کلراید
8/80	منیزیم کلراید
0/55	پتاسیم کلراید
0/080	پتاسیم بروماید
0/034	استراتیوم کلراید
0/0016	آمونیم نیترات
0/022	بوریک اسید
15/00	آگار

مایع رویی حاوی DNA به یک میکروتیوب استریل جدید منتقل به‌عنوان الگو برای آزمون PCR استفاده شد. تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از دو پرایمر 27f و 1522r (که توالی آن در جدول 2 فهرست شده است) انجام گرفت [16]. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم 25 میکرولیتر شامل 12 میکرولیتر مسترمیکس، 9 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل، 1 میکرولیتر (10 میکرومولار) از هر آغازگر و 2 میکرولیتر DNA الگو انجام شد. از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی که در جدول 3 ذکر شده است، انجام گرفت. در ادامه، محصول PCR به‌وسیله الکتروفورز بر ژل آگارز 1/5 درصد بررسی شده و توالی آن تعیین شد. سپس توالی‌های تعیین‌شده با استفاده از نرم‌افزار کروماس<sup>3</sup>

### شناسایی باکتری‌ها با استفاده از توالی 16S rRNA

پس از تعیین میزان تشکیل بیوفیلم توسط ایزوله‌های تخلیص شده، پنج ایزوله با بیش‌ترین میزان تشکیل بیوفیلم و رشد سریع‌تر انتخاب و برای تکثیر ژن 16S rRNA با روش PCR و تعیین توالی آن، ژنوم آن‌ها استخراج گردید. بدین‌منظور، از روش اصلاح شده‌ی جوشاندن استفاده شد. برای این منظور، از کشت تازه باکتری در محیط مرین آگار، یک لوپ برداشته و به میکروتیوب 1/5 میلی‌لیتری حاوی 200 میکرولیتر آب دیونیزه استریل منتقل شد. بعد از حل کردن کلنی در آب، میکروتیوب به مدت 10 دقیقه در دمای 70- درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس جوشانده شد و مجدداً در دمای 70- درجه سانتیگراد قرار گرفت. درنهایت مخلوط حاصل در 8000 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد و

بازنگری شدند و در پایگاه اطلاعاتی NCBI هم‌ردیف‌سازی، توالی‌های هومولوگ و درصد همسانی آنها مطالعه شد. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

جدول 2 توالی نوکلئوتیدی آغازگر مستقیم<sup>4</sup> و آغازگر معکوس<sup>5</sup> برای تکثیر ناحیه 16S rRNA

توالی نوکلئوتیدی	نام پرایمر	پرایمر
(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')	27F	آغازگر مستقیم
(5'-AAGGAGGTGATCCANCCR CA-3')	1518R	آغازگر معکوس

جدول 3 دوره حرارتی تنظیم‌شده برای انجام PCR

مرحله	نام مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد تکرار
اول	دناتوراسیون اولیه	95	300	1
	دناتوراسیون	95	30	
دوم	اتصال	58	15	34
	طویل شدن	72	60	
سوم	طویل شدن نهایی	72	300	1

4 Forward primer  
5 Reverse primer

آخرین غلظتی که قادر به مرگ 99/9 درصد از باکتری‌های اولیه بود؛ به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد. تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام گرفت [18].

#### تأثیر بر مهار تشکیل بیوفیلم

به‌منظور بررسی تأثیر تیمول بر تشکیل بیوفیلم توسط باکتری، نخست باکتری موردنظر به مدت 24 ساعت در دمای 28 درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس استوک باکتری با غلظت  $10^6$  CFU/ml تهیه شد. با استفاده از سریال‌های رقت، غلظت تیمول در چاهک‌های میکروپلیت معادل 4-MIC, 2-MIC, MIC, 1/2-MIC, 1/4-MIC تنظیم شد. درنهایت به هر چاهک بجز چاهک کنترل منفی، 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه و میکروپلیت به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون، تعیین بیوفیلم براساس روش کابارکاپا<sup>10</sup> و همکاری انجام گرفت [14]. درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری در حضور غلظت‌های مختلف تیمول از فرمول 1 محاسبه گردید [19]:

$$\text{درصد حذف بیوفیلم (فرمول 1)} =$$

$$100 \times \frac{\text{میانگین چاهک تیمار - میانگین چاهک کنترل مثبت}}{\text{میانگین چاهک کنترل مثبت}}$$

#### تأثیر بر تخریب ساختارهای بیوفیلمی تشکیل شده

ابتدا، به‌منظور تشکیل بیوفیلم، 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های میکروپلیت اضافه و در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شد. پس از تشکیل بیوفیلم، محیط به آرامی تخلیه و سلول‌های غیرچسبنده با شستن بیوفیلم‌ها به‌وسیله بافر فسفات سالین استریل (3 مرتبه) حذف شدند. سپس، به منظور بررسی اثر تیمول بر تخریب ساختارهای بیوفیلمی

#### بررسی خواص ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک<sup>6</sup>

در این روش، نخست کدورت سوسپانسیون باکتریایی با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم و با استفاده از سوآپ بر محیط مرین آگار به صورت سطحی کشت داده شد. سپس دیسک‌های آماده بلانک به‌وسیله پنس استریل روی سطح محیط کشت قرار گرفتند. مقدار 14 میکرولیتر تیمول در غلظت 10 mg/ml روی دیسک‌های بلانک انتقال داده شد. بعد از انکوبه کردن پلیت‌های حاصل به مدت 24 ساعت در دمای 28 درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری و ثبت شد. هر آزمایش سه بار تکرار شده و میانگین قطر هاله مهاری محاسبه شد. از اتانول به‌عنوان کنترل استفاده شد [17].

#### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی<sup>7</sup> و حداقل غلظت کشندگی<sup>8</sup>

آزمون MIC در میکروپلیت 96 چاهک استریل و با روش میکرودیالوشن برات<sup>9</sup> انجام گرفت. سریال‌های رقت با استفاده از محیط مرین برات از 4 تا 1000 میکروگرم/ میلی‌لیتر تهیه شدند. سپس، به هر چاهک، 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^6$  CFU/ml اضافه شد. محیط کشت و غلظت‌های مختلف حلال به‌عنوان کنترل منفی و محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی بدون اضافه‌کردن تیمول به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. میکروپلیت به مدت 24 ساعت در دمای 28 درجه سانتیگراد انکوبه و پس از آن، چاهک‌ها از نظر کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها بررسی شدند. آخرین چاهکی که هیچ کدورتی در آن دیده نشد، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین MBC، از تمامی چاهک‌های بدون کدورت رشد به روش پورپلیت کشت داده شد و

6 Disk diffusion method

7 MIC: Minimum inhibitory concentration

8 MBC: Minimum bactericidal concentration

9 Microdilution broth method

10 Cabarkapa

بیوفیلیم متوسط و 27 ایزوله دارای بیوفیلیم ضعیف/عدم تشکیل بیوفیلیم می‌باشند (جدول 4). در غربالگری ثانویه، ایزوله‌های دارای بیوفیلیم قوی از نظر سرعت رشد مقایسه شدند و در پایان 5 ایزوله KM1, KM5, KH9, KM5, PH18 که نسبت به سایر ایزوله‌ها سرعت رشد بیش‌تری داشتند و توانایی تشکیل بیوفیلیم در آنها بیشتر بود، برای مطالعه‌های بعدی انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به ایستگاه نمونه‌برداری، نوع پنل جداسازی، عمق و مدت زمان غوطه‌وری پنل پنج ایزوله منتخب در جدول 5 آورده شده است.

تشکیل شده، غلظت‌های مختلف تیمول (2-MIC, 4-MIC) به چاهک‌ها اضافه و پلیت به مدت 24 ساعت دیگر انکوبه شد. مهار بیوفیلیم تشکیل شده با رنگ‌آمیزی کریستال ویوله تجزیه و تحلیل و درصد کاهش ساختارهای بیوفیلیمی براساس فرمول 1 محاسبه شد [18].

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال 95 درصد انجام شد. به‌منظور ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل 2019 استفاده شد.

#### نتایج

#### جداسازی ایزوله‌های باکتریایی و بررسی میزان تشکیل

##### بیوفیلیم

جداسازی و غربالگری اولیه ایزوله‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلیم به روش کشت سطحی<sup>11</sup> انجام گرفت و کلونی‌های دارای مشخصات ریخت‌شناسی متفاوت (شکل، اندازه، رنگ، قوام، حاشیه و برآمدگی سطحی) جداسازی شدند. به‌منظور خالص‌سازی ایزوله‌ها، کشت متوالی از تک‌کلنی انجام شد و کلنی‌هایی که بعد از چندین کشت متوالی بر محیط مرین آگار، از نظر رشد و ویژگی‌های ریخت‌شناسی رفتار ثابتی از خود نشان دادند، به‌عنوان کلنی خالص در نظر گرفته شدند. درمجموع از سه نوع پنل غوطه‌ور در هر دو ایستگاه کندالو و پشت‌شهر، 82 ایزوله باکتریایی در فرم خالص جداسازی و توانایی تشکیل بیوفیلیم به‌وسیله آنها با استفاده از Tissue culture plate method (TCP) سنجش شد. نتایج حاصل از غربالگری اولیه نشان داد که از مجموع 82 ایزوله، 37 ایزوله دارای بیوفیلیم قوی، 18 ایزوله دارای

11 Spread plate



جدول 4 غربالگری اولیه ایزوله‌ها براساس منطقه‌ی نمونه‌برداری، نوع پنل و توانایی تشکیل بیوفیلم

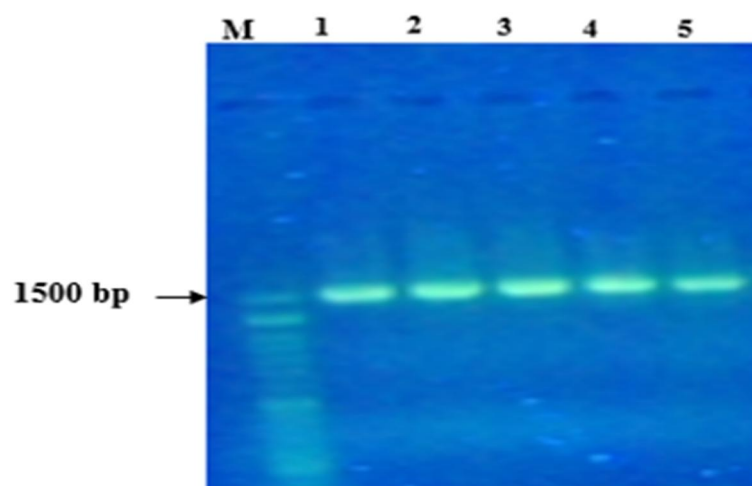
ایستگاه	مختصات جغرافیایی	تعداد ایزوله‌ها براساس نوع پنل			تعداد ایزوله‌ها براساس توانایی تشکیل بیوفیلم		
		شیشه	فایبرگلاس	پی.وی.سی	قوی	متوسط	ضعیف
کندالو	26°41'49" N 55°54'46" E	15	15	14	19	11	14
پشت شهر	27°10'10" N 56°15'53" E	13	16	9	18	7	13

جدول 5 عمق و مدت زمان غوطه‌وری پنل، نوع پنل و ایستگاه‌های مطالعه‌شده ایزوله‌های منتخب

کد ایزوله	ایستگاه	مدت زمان غوطه‌وری پنل	جنس پنل	عمق غوطه‌وری
PH1	پشت شهر	7 روز	فایبرگلاس	3-2 متر
KH9	کندالو	7 روز	فایبرگلاس	3-2 متر
PH18	پشت شهر	7 روز	فایبرگلاس	3-2 متر
KM1	کندالو	7 روز	فایبرگلاس	3-2 متر
KM5	کندالو	7 روز	پی.وی.سی	3-2 متر

### شناسایی مولکولی

شناسایی ایزوله‌های موردنظر با استفاده از توالی 16S rRNA انجام شد. نتایج محصول PCR در شکل 2 نشان داده شده است. تکثیر قطعه 1500 جفت بازی نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش می‌باشد.



شکل 2 نمایش محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA ایزوله‌های جداشده از پنل‌های غوطه‌ور در آب‌های خلیج فارس به همراه مارکر مولکولی (M) بر ژل آگارز 1/5 درصد (PH1 :1, KH9 :2, KM5 :3, KM1 :4, PH18 :5)

با انجام توالی یابی و مقایسه همردیفی در پایگاه NCBI، ایزوله PH1، 97/35 درصد تشابه با *Kangiella spongiicola*، ایزوله‌های KH9 و PH18 به ترتیب 99/45 و 99/49 درصد تشابه با جنس *Pseudoalteromonas* و ایزوله‌های KM1 و KM5 به ترتیب 99/37 و 99/54 درصد تشابه با جنس *Vibrio* نشان دادند. شماره دسترسی ثبت شده در بانک ژنی مربوط به ایزوله‌های مذکور در جدول 6 فهرست شده است.

جدول 6 جزئیات همردیفی. شماره دسترسی NCBI ایزوله‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی جداسازی شده از آب‌های

#### خلیج فارس

ردیف	کد جدایه	اطلاعات تاکسونومیک	شماره دسترسی NCBI
1	PH1	<i>Kangiella spongiicola</i>	MZ461010
2	KH9	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	MZ461012
3	PH18	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	MZ461011
4	KM1	<i>Vibrio sp.</i>	MZ461008
5	KM5	<i>Vibrio sp.</i>	MZ461009

PH1 و کمترین حساسیت با قطر هاله  $10 \pm 0/57$  میلی‌متر در ایزوله KM5 مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که براساس شاخص‌های آماری، اختلاف معناداری بین فعالیت مهارتی تیمول در ایزوله‌های PH18 و KH9 وجود ندارد ( $p > 0/05$ ).

بررسی اثر ضد باکتری به روش انتشار دیسک نتایج حاصل از بررسی اثر تیمول بر مهار فرم منفرد ایزوله‌های مطالعه شده در جدول 7 نشان داده شده است. براساس مشاهده‌های انجام شده، بیشترین حساسیت به تیمول با قطر هاله  $18 \pm 0/57$  میلی‌متر در مقابل ایزوله

جدول 7 میانگین قطر هاله عدم رشد  $\pm$  انحراف معیار تیمول در مقابل ایزوله‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی. حروف یکسان عدم اختلاف معنادار و حروف غیریکسان اختلاف معنادار بین میانگین‌های هر ستون را براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

ایزوله	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)
	تیمول (0/1 درصد)
PH18	$14 \pm 0/57^c$
KM1	$15/5 \pm 0/28^b$
KH9	$14 \pm 0/50^c$
KM5	$10 \pm 0/57^d$
PH1	$18 \pm 0/57^a$

### حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی

در جدول 8 نتایج مربوط به اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت کشندگی تیمول در مقابل ایزوله‌های منتخب نمایش داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده، کمترین غلظت بازدارنده و کشنده رشد (بیشترین حساسیت به ترکیب)، به‌ترتیب در غلظت

31/25 و 62/5 میکروگرم / میلی‌لیتر تیمول در مقابل ایزوله PH1 به دست آمد. نتایج همچنین نشان داد که کمترین حساسیت به تیمول مربوط به ایزوله‌های PH18، KH9 و KM5 با مقدار MIC و MBC، 125 و میکروگرم / میلی‌لیتر 250 می‌باشد.

جدول 8 میانگین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تیمول در مقابل ایزوله‌های تشکیل‌دهنده

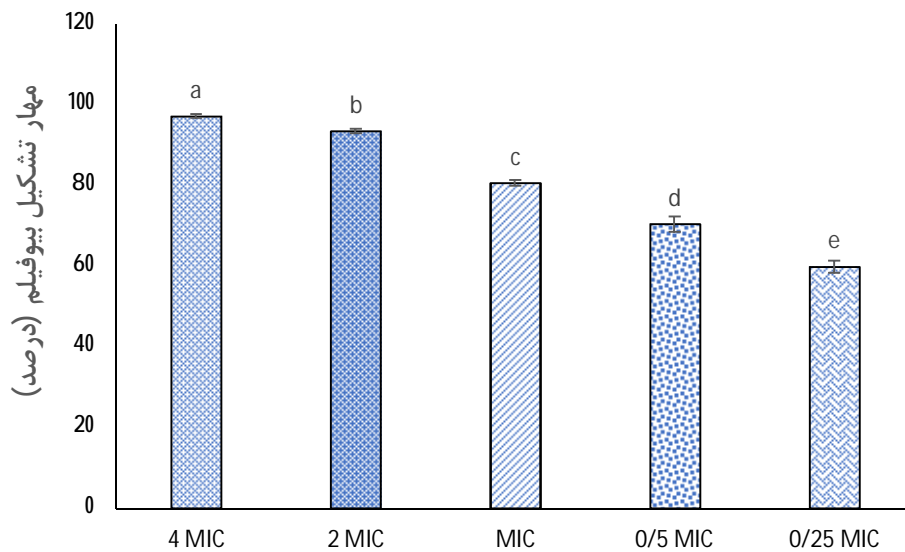
#### بیوفیلم دریایی

ایزوله	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )	MBC ( $\mu\text{g/ml}$ )
PH18	125	250
KM1	62/5	125
KH9	125	250
KM5	125	250
PH1	31/25	62/5

### تأثیر بر مهار تشکیل بیوفیلم

با توجه به نتایج حاصل از غربالگری اولیه، ایزوله PH18 نسبت به سایر ایزوله‌های منتخب توانایی بالاتری در تشکیل بیوفیلم نشان داد. از این‌رو، در ادامه به‌منظور بررسی تأثیر تیمول بر مهار تشکیل بیوفیلم و همچنین تأثیر بر تخریب ساختار بیوفیلمی تشکیل‌شده از این ایزوله استفاده شد. قدرت مهاري تیمول در غلظت‌های 4-MIC، 2-MIC، MIC، 1/2-MIC، 1/4-MIC بررسی شد که نتایج آن در شکل 3 آورده شده است. همان‌طور که از

نمودار برمی‌آید، افزایش غلظت، تأثیر مستقیمی بر مهار ساختار بیوفیلمی دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت، میزان مهار بیوفیلم نیز افزایش پیدا می‌کند. تیمول در غلظت 4-MIC با 97 درصد بیشترین میزان مهار بیوفیلم را نشان داد که این میزان در غلظت 1/4-MIC به کمترین مقدار خود (59 درصد) رسید. به‌طورکلی نتایج آنالیز آماری داده‌ها، اختلاف معناداری بین میزان مهار ساختار بیوفیلمی در غلظت‌های مختلف نشان داد ( $p < 0.05$ ).

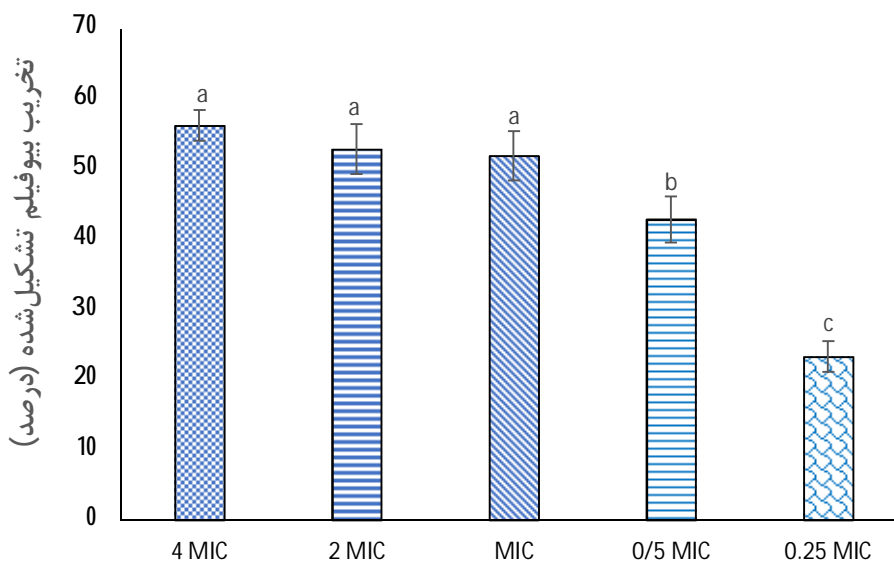


نمودار شکل 3 تأثیر تیمول بر مهار تشکیل بیوفیلم ایزوله PH18. حروف غیر یکسان اختلاف معنادار بین میانگین‌های هر ستون را براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

درصد بیوفیلم تشکیل شده می‌شود که از نظر آماری اختلاف معناداری بین غلظت‌های مذکور مشاهده نمی‌شود. نتایج همچنین نشان داد که غلظت 1/4-MIC تیمول با 24 درصد مهار، کمترین تأثیر را بر تخریب ساختار بیوفیلمی می‌گذارد (شکل 4).

#### تأثیر بر تخریب ساختار بیوفیلمی تشکیل شده

در مطالعه حاضر تأثیر تیمول بر تخریب ساختار بیوفیلم تشکیل شده ایزوله PH18 نیز بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که تیمول در غلظت‌های 4-MIC, 2-MIC, MIC به ترتیب باعث تخریب 51 و 52, 56



شکل 4 تأثیر تیمول بر تخریب ساختار بیوفیلم تشکیل شده ایزوله PH18. حروف یکسان عدم اختلاف معنادار و حروف غیر یکسان اختلاف معنادار بین میانگین‌های هر ستون را براساس آزمون دانکن نشان می‌دهد.

## بحث و نتیجه‌گیری

در محیط‌های دریایی، میکروارگانیسم‌های متنوع قادر به کلونیزاسیون سطوح زنده و غیرزنده می‌باشند که منجر به تشکیل بیوفیلم و در ادامه بیوفولینگ می‌شود [20]. این مسئله باعث شده است که در صنایع دریایی سالیانه میلیاردها دلار صرف مقابله با این پدیده شود. از این‌رو، مقابله با پدیده فولینگ از راه کنترل موجودات مزاحم چسبنده، به‌منظور کارآمد کردن عملیات نگهداری و کاهش هزینه‌های ناشی از آنها امری ضروری محسوب می‌شود [4]. با توجه به اینکه تشکیل بیوفیلم به‌وسیله باکتری‌ها، از مراحل اولیه و کلیدی در فولینگ دریایی است، ممانعت از تشکیل این لایه لزج محافظت‌کننده، می‌تواند گامی مؤثر به‌منظور قطع زنجیره فولینگ باشد. به دلیل آثار منفی مواد آنتی‌فولینگ شیمیایی و رنگ‌های آنتی‌فولینگ پایه فلزی بر موجودات غیرهدف و محیط‌زیست دریا، پژوهش حاضر، با هدف معرفی یک جایگزین طبیعی و سازگار با محیط‌زیست برای این ترکیبات، در دو گام انجام گرفت. نخست، ایزوله‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم از پنل‌های غوطه‌ور (شیشه، فایبرگلاس، پی.وی.سی) در دو ایستگاه کندالو و پشت‌شهر در استان هرمزگان، جداسازی و توانایی آنها در تشکیل بیوفیلم سنجش شد. نتایج حاصل نشان داد که از مجموع ایزوله‌های جداشده، 77 درصد دارای بیوفیلم متوسط و قوی می‌باشند که این ایزوله‌ها برای غربالگری ثانویه انتخاب شدند. در نهایت براساس ثبات در ویژگی‌های ریخت‌شناسی و متعادل بودن سرعت رشد، پنج ایزوله انتخاب و شناسایی مولکولی از راه ژن 16s rRNA انجام گرفت. نتایج حاصل از توالی‌یابی نشان داد که پنج ایزوله منتخب متعلق به شاخه Proteobacteria می‌باشند. نتایج مطالعات دیگر نیز نشان‌دهنده حضور اعضای این شاخه در بیوفیلم‌های دریایی است. در پژوهش انجام‌شده به‌وسیله گرسلند<sup>12</sup> و

همکاران در سال 2003، ایزوله‌های باکتریایی از بیوفیلم‌های تشکیل‌شده روی پنل‌های شیشه‌ای غوطه‌ور در آب دریا جداسازی و شناسایی شدند. نتایج این پژوهش نشان داد که در میان 20 باکتری مطالعه‌شده، 75 درصد متعلق به شاخه Proteobacteria، 10 درصد متعلق به CFB group bacteria و 15 درصد متعلق به Gram- positive bacteria می‌باشند [21].

در پژوهشی که توسط کاویتا<sup>13</sup> و راگاوان در سال 2018 انجام گرفت، توانایی تشکیل بیوفیلم 12 ایزوله‌ی باکتریایی بدست آمده از بدنه‌ی کشتی، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که 41 درصد ایزوله‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم می‌باشند که از این تعداد، سه ایزوله با ماکزیمم میزان تشکیل بیوفیلم برای شناسایی با ژن 16s rRNA انتخاب شدند. براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، این سه ایزوله در دو گروه Proteobacteria (*Psychrobacter alimentarius* و *P. celer*) و Actinobacteria (*Koucuria rhizophila*) قرار گرفتند [22].

پژوهش دیگری به‌وسیله اینباکاندان<sup>15</sup> و همکاران (2010) بر روی باکتری‌های دریایی تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم جدا شده از بدنه کشتی انجام گرفت. براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، 16 باکتری مطالعه‌شده در این پژوهش از نظر میزان فراوانی به‌ترتیب در پنج گروه High GC Gram- positive bacteria, Firmicutes, Gamma-proteobacteria, CFB group bacteria و Enterobacteria قرار گرفتند [13].

تأیید حضور اعضای شاخه Proteobacteria در بیوفیلم‌های دریایی در پژوهش براگادیواران<sup>16</sup> و کوماران<sup>17</sup> (2019) نیز اثبات شد. در این پژوهش،

13 Kavitha  
14 Raghavan  
15 Inbakandan  
16 Bragadeewaran  
17 Kumaran

12 Grasland

تیمول، کارواکروول و اوژنول در مقابل گونه‌های *S. typhimurium* سنجش شد. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمول نسبت به سایر ترکیبات تست شده از قابلیت مهاری بالاتری برخوردار است. مقدار MIC تیمول نیز در محدوده غلظتی 32-128 میکروگرم / میلی لیتر به دست آمد که با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی دارد [19].

قابلیت انتشار اندک اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در محیط جامد نسبت به محیط مایع می‌تواند توضیحی برای افزایش چشمگیر قدرت مهاری تیمول در غلظت‌های بسیار پایین‌تر در آزمون MIC و MBC در مقایسه با آزمون انتشار دیسک باشد. گزارش شده است که گروه هیدروکسیل فنولی تیمول نقش مهمی در فعالیت ضد میکروبی آن دارد [24]. درحقیقت اثر ضد میکروبی تیمول به دلیل نفوذپذیرکردن غشای سلول است که می‌تواند به کاتیون‌های سطح غشای عوامل پاتوژن متصل شده و فعالیت‌های حیاتی آنها را مختل کند. تیمول منجر به تغییرات ساختاری و عملکردی در غشای سیتوپلاسمی می‌شود که در نتیجه می‌تواند به غشاهای خارجی و داخلی آسیب برساند. همچنین می‌تواند با پروتئین‌های غشایی و نشانگرهای داخل سلولی ارتباط برقرار کند [25، 26].

توانایی تولید بیوفیلم مزیتی برای حفظ و بقای باکتری‌ها در شرایط نامساعد محیطی محسوب می‌شود. با استفاده از این سازوکار مهم، باکتری‌ها می‌توانند از حمله و دفاع میزبان در امان بمانند [27]. براساس نتایج به دست آمده در مورد تأثیر تیمول بر تشکیل بیوفیلم (که در شکل 3 نشان داده شده است) می‌توان مشاهده کرد که تیمارهای اعمال شده در غلظت‌های کمتر از MIC (Sub-MIC) نیز به میزان چشمگیری موجب کاهش تشکیل بیوفیلم در ایزوله مطالعه شده می‌شوند. این یافته نشان‌دهنده اثر مهاری بالقوه غلظت‌های زیرکشنده تیمول (Sub-MBC) بر سازوکارهای چسبندگی باکتریایی و

باکتری‌های بیوفیلم از سه نوع پنل با جنس شیشه، چوب و فایبرگلاس جداسازی شدند که در میان 29 باکتری مطالعه شده، اعضای خانواده Proteobacteria با 52 درصد غالب بودند [23].

تیمول به عنوان یک بازدارنده بالقوه تشکیل بیوفیلم در بسیاری از باکتری‌های پاتوژن شناخته شده است [9]. اما جستجو در بانک‌های اطلاعاتی نشان می‌دهد که تاکنون تأثیر این ترکیب بر باکتری‌های دریایی تشکیل‌دهنده بیوفیلم بررسی نشده است. از این رو در گام دوم مطالعه پیش رو، اثر ضد باکتری و ضد بیوفیلیمی تیمول بر پنج ایزوله دریایی جداسازی شده بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر در آزمون انتشار دیسک، MIC و MBC، توانایی قابل قبول تیمول در جلوگیری از رشد باکتری‌های دریایی را نشان داد.

از محدود گزارش‌های موجود در مورد تأثیر ترکیب‌های مؤثره اسانس بر باکتری‌های دریایی می‌توان به پژوهش باتارا<sup>18</sup> و همکاران (2007) اشاره کرد. در این پژوهش، فعالیت ترکیب فنولی اوژنول به همراه چندین ترکیب طبیعی دیگر، در مقابل باکتری‌های دریایی و اسپورهای جلبک اولوا در فاز آزمایشگاهی و میدانی بررسی شدند. نتایج پژوهش مذکور نشان داد که اوژنول به همراه سایر ترکیبات طبیعی تست شده، پتانسیل بالایی برای توقف تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی اولیه دارد که در نهایت می‌تواند منجر به کاهش اتصال ماکروفولینگ‌ها شود [8].

در مقابل، گزارش‌های بسیاری در مورد فعالیت ضد میکروبی تیمول در مقابل پاتوژن‌هایی مانند *Escherichia coli*، *Clostridium perfringens*، *Salmonella sp.* و *Listeria innocua*، O157:H7 وجود دارد. در پژوهشی که به وسیله میلادی<sup>19</sup> و همکاران در سال 2017 انجام گرفت، اثر ضد باکتری و ضد بیوفیلم

18 Bhattarai

19 Miladi

[2] Melo L. F., Bott T. R. (1997) "Biofouling in water systems", *Exp. Therm. Fluid Sci.* 14: 375–381.

[3] Thein Z. M., Samaranayake Y. H., Samaranayake L. P. (2007) "In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions", *Arch. Oral Biol.* 52: 761-767.

[4] Powell M. S., Slater N. K. H. (1983) "The deposition of bacterial cells from laminar flows onto solid surfaces", *Biotechnol. Bioeng.* 25: 891-900.

[5] De Carvalho C. C. C. R. (2018) "Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications", *Front. Mar. Sci.* 126.

[6] Marshall K. C., Stout R., Mitchell R. (1971) "Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces", *J. Gen. Microbiol.* 68: 337-348.

[7] Perez M., García M., Blustein G. (2015) "Evaluation of low copper content antifouling paints containing natural phenolic compounds as bioactive additives", *Mar. Environ. Res.* 109: 177-184.

[8] Bhattarai H. D., Paudel B., Park N. S., Lee K. S., Shin H. W. (2007) "Evaluation of antifouling activity of eight commercially available organic chemicals against the early foulers marine bacteria and *Ulva* spores", *J. Environ. Biol.* 28: 857-863.

[9] Gutierrez-Pacheco M. M., Gonzalez-Aguilar G. A., Martinez-Tellez M. A., Lizardi-Mendoza J., Madera-Santana T. J., Bernal-Mercado A. T., Vazquez-Armenta F. J., Ayala-Zavala J. F. (2018) "Carvacrol inhibits biofilm formation and production of extracellular polymeric substances of *Pectobacterium carotovorum* subsp", *Carotovorum. Food Control.* 89: 210-218.

[10] Pavela R., (2015) "Essential oils for the development of eco-friendly mosquito

سنتز ماتریس بیوفیلم می‌باشد [14]. بررسی سایر مطالعات نیز به وجود آثار مهارى اسانس‌ها و ترکیبات آنها روی چسبندگی اولیه و در نتیجه شکل‌گیری بیوفیلم اشاره دارد [28؛ 29].

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که در واقع غلظت‌های زیرکشنده از راه تأثیر بر تحرک باکتری‌ها و در نتیجه تداخل در سیستم کوثروم سنسینگ، توانایی باکتری را در تشکیل بیوفیلم کاهش می‌دهند. درحقیقت اثر مهارى در ایجاد بیوفیلم، شامل سازوکارهایی متفاوت از مهار رشد و مرگ سلولی است [28؛ 30].

در پژوهش پیش رو اثر تیمول بر تخریب ساختارهای بیوفیلمی تشکیل شده نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که تأثیر تیمول بر بیوفیلم‌های ساخته‌شده بسیار کمتر از تأثیر آن بر مهار تشکیل بیوفیلم است. تأثیر ضعیف اسانس‌ها بر بیوفیلم‌های ساخته‌شده در مطالعات دیگر نیز تأیید شده است [18؛ 31]. دلیل این موضوع را می‌توان به حضور ماتریس خارج سلولی<sup>20</sup> نسبت داد که در سطوح مختلف می‌تواند به‌عنوان یک مانع انتشار عمل کند [14].

به‌طور کلی، نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تیمول قادر به جلوگیری یا حداقل تداخل در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های دریایی می‌باشد و همچنین آثار چشمگیری بر تخریب بیوفیلم‌های ساخته‌شده دارد. بنابراین می‌تواند برای توسعه استراتژی‌های سازگار با محیط‌زیست به‌منظور مبارزه با بیوفیلم و بیوفولینگ دریایی استفاده شود.

#### منابع

[1] Yebra D. M., Kiil S., Dam-Johansen K. (2004a) "Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings", *Prog. Org. Coat.* 50: 75–104.

<sup>20</sup> Extracellular matrix

- [18] Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E. A (2013) Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*. 29 (1), 125-130.
- [19] Miladi, H., Mili, D., Slama, R. B., Zouari, S., Ammar, E., Bakhrouf, A (2016) Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microb. Pathog.* 93, 22-31.
- [20] Lejars, M., Margailan, A., Bressy, C (2012) Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. *Chem. Rev.* 112 (8), 4347-4390.
- [21] Grasland, B., Mitalane, J., Briandet, R., Quemener, E., Meylheuc, T., Linossier, I., Vallee-Rehel, K., Haras, D (2003) Bacterial biofilm in seawater: cell surface properties of early-attached marine bacteria. *Biofouling*. 19 (5), 307-313.
- [22] Kavitha, S., Raghavan, V (2018) Isolation and characterization of marine biofilm forming bacteria from a ship's hull. *Front. Biol.* 13 (3), 208-214.
- [23] Bragadeeswaran, S., Kumaran, S. N (2019) Genetic diversity among culturable marine biofilm forming bacteria isolated from different test panels. *Res. J. Biotechnol.* 14 (1), 25-33.
- [24] Ultee, A., Bennik, MH., Moezelaar, R (2002) The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68,1561-1568.
- [25] Lambert, RJW., Skandamis, PN., Coote, PJ., Nychas, GJE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 91, 453-462.
- [26] Xu, J., Zhou, F., Ji, BP., Pei, RS., Xu, N (2008) The antibacterial mechanism of larvicides: a review", *Ind. Crops. Prod.* 76: 174-87.
- [11] Martínez-Hernández G. B., Amodio M. L., Colelli G. (2017) "Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots", *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 41: 56-63.
- [12] Nychas G. J. E., Skandamis P. N., Tassou C. C. (2000) *Antimicrobials from herbs and spices*. In S. Roller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods*. Boca Raton FL (USA): *CRC Press*, Boca Raton.
- [13] Inbakandana D., Sriyutha Murthy P., Venkatesand R., Ajmal Khan S. (2010) "16S rDNA sequence analysis of culturable marine biofilm forming bacteria from a ship's hull", *Biofouling*, 26: 893- 899.
- [14] Čabarkapa I., Čolović R., Đuragić O., Popović S., Kokić B., Milanov D., Pezo L (2019) "Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella enteritidis*", *Biofouling*, 35(3): 361-375.
- [15] Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura G. D., Djukić S., Čirković I., Ruzicka F. (2007) "Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci", *Apmis*, 115 (8): 891-899.
- [16] Kwon K. K., Lee H. S., Jung S. Y., Yim J. H., Lee J. H., Lee H. K (2002) "Isolation and identification of biofilm-forming marine bacteria on glass surfaces in Dae-Ho Dike", *Korea. J. Microbiol.* 40(4): 260-266.
- [17] Ashrafudoulla, M., Mizan, M. F. R., Ha, A. J. W., Park, S. H. Ha, S. D (2020) Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. *Food Microbiol.* 91, 103500.



of *Salmonella Typhimurium* biofilms from polystyrene and stainless-steel surfaces by essential oils and phenolic constituent carvacrol. *J. Food. Prot.* 76, 205–212.

- [30] Inamuco, J., Veenendaal, A. K. J., Burt, S. A., Post, J. A., Tjeerdsma-van Bokhoven, J. L. M., Haagsman, H. P., Veldhuizen, E. J. A (2012) Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella Typhimurium* motility and invasion of porcine epithelial cells. *Vet. Microbiol.* 157(1-2), 200–207.
- [31] Szczepanski S., Lipski A (2014) "Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation", *Food. Cont.* 36: 224–229.

carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 174–179.

- [27] Khezri, M., The effects of biofilm formation in bacteria from different perspectives (2019) The effects of biofilm formation in bacteria from different perspectives. *Nova Biol. Rep.* 6 (1), 70-78.
- [28] Burt, SA., Ojo-Fakunle, VT., Woertman, J., Veldhuizen, EJ (2014) The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. *PLoS One.* 9 (4): e 93414.
- [29] Soni, KA., Oladunjoye, A., Nannapaneni, R., Schilling, MW., Silva, JL., Mikel, B., Bailey, RH (2013) Inhibition and inactivation

# Isolation and identification some of biofilm-forming marine bacteria from Persian Gulf waters and evaluation of antibacterial and anti-biofilm effect of thymol against them

Fatemeh Sedaghat<sup>1</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>1,2\*</sup>, Arash Ghaderi<sup>2</sup>, Fatemeh Shayesteh<sup>3</sup>

1- Ph.D, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2- Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

3- Associate professor, Department of Chemistry, College of Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

4- Assistant professor, Department of Fisheries Science, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

\*Corresponding Author: [Morteza110110@gmail.com](mailto:Morteza110110@gmail.com)

Received: 2021/9/4

Accepted: 2021/12/28

## Abstract

In a marine environment, the biofilm formed on the submerged surfaces leads to fouling of larger organisms. This leads to many environmental and economic problems for the marine industries. Due to the harmful effects of chemical antifouling, the development of environmentally friendly anti-biofilm strategies can be an important step to control fouling. Therefore, the present study was performed with the aim of isolation of biofilm-forming bacteria from Persian Gulf waters and investigating the antimicrobial effect of thymol against selected bacteria. 82 bacterial were isolated and their ability to form biofilm was measured. Among these, 5 isolates were selected and identified using 16S rRNA sequences. The results showed that the 5 selected isolates belonged to the Proteobacteria (genus *Vibrio*, *Kangiella* and *Pseudoaltromonas*). In the study of the antibacterial effect of thymol, *K. spongicola* (PH1) showed the highest sensitivity in disk diffusion method (with a growth inhibition zone diameter of  $18 \pm 0.57$  mm). The minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration (at 31.5 and 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively) were obtained against the same bacterium. The inhibitory thymol on biofilm formation and performed biofilm by *Pseudoaltromonas* sp. (PH18) showed that thymol at concentrations sub-MIC is able to inhibit biofilm formation. The effect of thymol on the performed biofilm at concentrations higher than MIC is noticeable. Based on the results, due to the anti-biofilm activity of thymol against marine bacteria, its use as a natural compound in antifouling coatings can be suggested.

**Key words:** Marine bacterium, Minimum inhibitory concentration, 16S rRNA gene, Anti- biofilm, Thymol