



## بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی کارواکرول (Carvacrol) و اوژنول (Eugenol) بر باکتری‌های جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس

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

DOI: 10.22124/japb.2021.20053.1428

تاریخ پذیرش: مهر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۰

### چکیده

تشکیل بیوفیلیم‌های میکروبی به عنوان یکی از مراحل کلیدی در فولینگ دریایی مطرح است. بنابراین، توسعه راهکارهای ضدبیوفیلیم بویژه از طریق پژوهش در مورد مواد آنتی‌فولینگ سازگار با محیط زیست می‌تواند به کنترل بیوفولینگ کمک کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری‌های دریایی جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس انجام گرفت. در آزمون انتشار دیسک، باکتری *Vibrio sp.* (KM1) بیشترین حساسیت را به کارواکرول ( $17 \pm 0/30$  میلی‌متر) و اوژنول ( $15 \pm 0/5$  میلی‌متر) نشان داد. کمترین غلظت بازدارنده رشد و کشنده نیز به ترتیب در غلظت‌های  $62/5$  و  $125$  میکروگرم در میلی‌لیتر کارواکرول در مقابل باکتری KM1 به دست آمد. در این پژوهش، قدرت مهار کارواکرول و اوژنول بر پدیده تشکیل بیوفیلیم باکتری *Pseudoalteromonas sp.* (PH18) به روش Tissue Culture Plate Method (TCP) نیز مورد بررسی قرار گرفت و در غلظت 4MIC (چهار برابر حداقل غلظت بازدارنده رشد) بیشترین میزان مهار بیوفیلیم مشاهده شد (کارواکرول ۹۰ درصد و اوژنول ۸۷ درصد). بر اساس نتایج به دست آمده، به دلیل فعالیت ضدبیوفیلمی مناسب کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری‌های دریایی، استفاده از آنها به عنوان یک جایگزین بالقوه طبیعی در پوشش‌های آنتی‌فولینگ قابل پیشنهاد است.

### واژگان کلیدی: ضدباکتری، کارواکرول، اوژنول، باکتری‌های دریایی.

۱- دانشجوی دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.

۳- دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [Morteza.110110@gmail.com](mailto:Morteza.110110@gmail.com)

## مقدمه

گیاهان میکروسکوپی هستند که به یک سطح می‌چسبند و لایه‌ای ژله‌ای را به وجود می‌آورند. این لایه علاوه بر فراهم کردن محیط مناسب برای رشد، به بهتر چسبیدن و پایدار ماندن میکروب‌ها روی سطوح کمک می‌کند و نقش حفاظتی نیز دارد (Thein et al., 2007). ماکروفولینگ به موجوداتی اشاره دارد که می‌توانند به میکروفولینگ‌ها بچسبند و بر اساس ساختار شیمیایی بدن به دو گروه سخت (شامل بارناکل‌ها، صدف‌های دوکفه‌ای، کرم‌های پرتار و بریوزا) که دارای اسکلت کربنات کلسیمی هستند) و نرم (شامل جلبک‌ها و علف‌های دریایی که دارای بدنی نرم هستند) تقسیم می‌شوند (Characklis and Cooksey, 1983).

بیوفولینگ دریایی شامل واکنش‌هایی است که در فاصله چند نانومتری از سطح اتفاق می‌افتد و شدت چسبندگی در اثر برهمکنش عناصر ساختاری خاص موجود در ترشحات چسبنده با زیر لایه تعیین می‌شود. به طور کلی، هر سطحی که در آب غوطه‌ور شود در مدت چند ثانیه با لایه‌ای از ترکیبات آلی، مثل پلی‌ساکاریدها، چربی‌ها و پروتئین‌ها، پوشیده خواهد شد. کمتر از ۲۴ ساعت بعد از تشکیل

از آغاز پیدایش صنعت دریانوردی، رشد موجودات آبی در شناورها (قسمت‌های قرار گرفته در زیر آب)، یک مشکل جدی بوده است که توسعه این صنعت را با محدودیت‌هایی مواجه کرده و هرگز روشی کاملاً رضایت‌بخش برای رفع آن یافت نشده است. توانایی فیزیکی شناور در شکافتن آب دریا و امواج در اقتصاد سوخت بسیار اهمیت دارد که لازمه این موضوع، بهبود کیفیت و صافی سطح بدنه شناور است. دو عامل باعث افزایش زبری سطح بدنه شناور می‌شود. یکی از این عامل‌ها، خوردگی و عامل دیگر نشست بیوفولینگ‌ها است (Yebra et al., 2004). بیوفولینگ دریایی عمدتاً به صورت رشد نامطلوب ارگانسیم‌های دریایی روی سازه‌های غوطه‌ور در آب تعریف می‌شود. این مسئله یک مشکل جهانی برای صنایع دریایی به حساب می‌آید که باعث بروز خسارات اقتصادی و زیست‌محیطی فراوانی می‌شود (Yebra et al., 2004; Dang and Lovell, 2016).

بیوفولینگ‌ها به دو دسته میکروفولینگ‌ها و ماکروفولینگ‌ها تقسیم می‌شوند. پدیده میکروفولینگ به شکل‌گیری و توسعه بیوفیلم بر سطوح شناور در آب اشاره دارد. بیوفیلم‌ها اجتماعاتی از باکتری‌ها، جانوران و

رنگ‌ها و پوشش‌هایی که برای استفاده در اجزای زیر آب و کشتی‌ها به کار می‌روند، مخلوط پیچیده‌ای از ترکیبات شامل الیاف، رنگ، توسعه دهنده‌ها، حلال‌ها، رقیق کننده‌ها و افزودنی‌ها است (Watermann et al., 2005). پوشش‌های حاوی تری‌بوتیل قلع از قدیمی‌ترین پوشش‌های آنتی‌فولینگ تجاری هستند، اما به دلیل اثرات مخرب بر موجودات غیرهدف و محیط زیست دریا، از سال ۲۰۰۸ سازمان بین‌المللی دریایی استفاده از این ترکیبات را ممنوع اعلام کرده است (Lin et al., 2009). بعد از ممنوعیت استفاده از این پوشش‌ها، آنتی‌فولینگ‌های حاوی ترکیباتی چون مس به عنوان یک جایگزین معرفی شدند و تا سال‌های اخیر در صنایع دریایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (Edwards et al., 2015). اما با اثبات مضرات این پوشش‌ها و سمیت آنها بر برخی از گونه‌های غیرهدف (مثل صدف‌های خوراکی و موجودات دریایی)، ممنوعیت و محدودیت استفاده از آنها نیز در برخی از کشورهای اروپایی مانند آلمان، سوئد، دانمارک و فرانسه آغاز شده است (Karlsson and Eklund, 2004; Joshi et al., 2015). بنابراین می‌توان گفت که به دلیل ملاحظات زیست‌محیطی و قوانین اعمالی، توسعه مواد

این لایه تهویه‌ای (Conditioning Layer) فرآیند تشکیل رسوبات زیستی آغاز می‌شود. کلونیزاسیون اولیه عمدتاً از باکتری‌ها، مخمرها و دیاتوم‌هایی که خود را در ساختار لایه زیستی محافظ جای می‌دهند، تشکیل می‌شود. کلونیزاسیون ثانویه، متشکل از هاگ‌های ماکرو جلبک‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها است که در صورت مطلوب بودن شرایط محیطی، حدود یک هفته بعد از غوطه‌وری رسوب می‌کنند. تشکیل رسوب لاروی بی‌مه‌ره غالباً آخرین مرحله از فرآیند بیوفولینگ دریایی است که ظهور آنها بر سطح به طور متوسط دو تا سه هفته بعد از غوطه‌وری و در فصل تخم‌ریزی اتفاق می‌افتد (Wahl, 1989; Salta et al., 2013).

رسوب فولینگ بر سطح کشتی‌ها و قایق‌ها باعث بروز مشکلاتی مانند کاهش سرعت، خوردگی بدنه، افزایش مصرف سوخت، افزایش دفعات پهلوگیری برای تمیزکاری، کاهش ظرفیت حمل و سرعت جریان آب در خطوط لوله و گرفتگی تورها و قفس‌های پرورش آبزیان شده که در نهایت منجر به تحمیل هزینه‌های گزاف به صنایع دریایی می‌شود (De Carvalho, 2018).

راهکار اولیه برای مبارزه با فولینگ، استفاده از رنگ‌های حاوی کشنده‌های زیستی است.

(Pavela, 2015). منتول، کارواکرول، اوژنول و تیمول از مواد موثره مهم و شناخته شده در اسانس‌های گیاهی مختلف هستند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که به طور کلی، قوی‌ترین خواص ضدباکتریایی مربوط به اسانس‌های حاوی این ترکیبات است (Mastromatteo et al., 2010; Martinez-Hernandez et al., 2017).

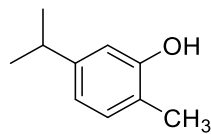
کارواکرول یک ترکیب فنولی مونوترپنیک و از اجزای اصلی اسانس گیاه مرزنجوش است که در مطالعات مختلف خواص متنوع زیستی و دارویی مانند ضدقارچ، ضدحشره، ضدباکتری، ضدالتهاب، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و غیره برای آن گزارش شده است (De Sousa et al., 2015; Suntres et al., 2012). اوژنول نیز یک آنتی‌اکسیدان فنولی و از ترکیبات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی است که از دارچین و برگ گیاه میخک استخراج می‌شود (Vazquez et al., 2001). فرمول ساختاری این دو ترکیب در شکل ۱ نشان داده شده است.

آنتی‌فولینگ سازگار با محیط زیست با حداقل اثرات جانبی بر جانداران غیرهدف، ضرورتی است که بویژه در صنایع دریایی برای حل معضل فولینگ احساس می‌شود.

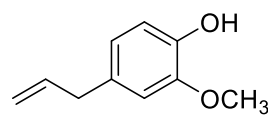
از آنجایی که میکروارگانیسم‌های روی سطوح می‌توانند اتصال دیگر موجودات را افزایش دهند، بنابراین جلوگیری از توسعه بیوفیلم میکروبی می‌تواند باعث کاهش اتصال و تجمع ماکروارگانیسم‌ها روی سطوح شده و به عنوان رویکردی مهم برای قطع زنجیره فولینگ در مراحل اولیه مطرح شود (Tang and Cooney, 1998). چندین راهکار به منظور جلوگیری از چسبندگی باکتریایی به سطوح مختلف پیشنهاد شده است که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به استفاده از ترکیبات طبیعی چون اسانس اشاره کرد (Gutierrez-Pacheco et al., 2018).

اسانس‌ها ترکیبات روغنی فراری هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان ساخته می‌شوند و حاوی ترکیبات متعددی هستند

الف



ب



شکل ۱: ساختار شیمیایی کارواکرول (الف) و اوژنول (ب)

با توجه به مطالب گفته شده، به دلیل ضرورت مطالعه بر روی ترکیبات طبیعی ضد میکروبی برای مقابله با پدیده بیوفولینگ و همچنین عدم وجود مطالعات کافی در مورد تاثیر اسانس‌ها و ترکیبات موثره آنها بر باکتری‌های دریایی، پژوهش حاضر با هدف تعیین میزان فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم کارواکرول و اوژنول بر باکتری‌های جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس به صورت آزمایشگاهی انجام گرفت.

و شماره دسترسی NCBI این باکتری‌ها در جدول ۱ فهرست شده است. باکتری‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در گلیسرول ۵۰ درصد نگهداری شدند. از محیط‌های کشت مارین آگار (Marine Agar) و مارین برات (Marine Broth) برای آزمون انتشار دیسک، بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)، حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration: MBC) و همچنین آزمون بیوفیلم استفاده شد.

### مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌های مطالعه شده و محیط کشت در این پژوهش، پنج گونه باکتری دریایی جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس، به منظور بررسی اثر ضدباکتریایی کارواکرول و اوژنول انتخاب شدند. کد جدایه، اطلاعات تاکسونومیکی

ترسیم منحنی رشد باکتری به منظور ترسیم منحنی رشد، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر معادل با کدورت نیم مک‌فارلند ( $10^8 \text{ CFU/mL} \times 1/5$ ) به ارلن‌های حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت

جدول ۱: میکروارگانیزم‌های مطالعه شده به همراه شماره دسترسی NCBI

شماره دسترسی NCBI	اطلاعات تاکسونومیکی	کد جدایه	ردیف
MZ461010	<i>Kangiella spongicola</i>	PH1	۱
MZ461012	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	KH9	۲
MZ461011	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	PH18	۳
MZ461008	<i>Vibrio sp.</i>	KM1	۴
MZ461009	<i>Vibrio sp.</i>	KM5	۵

روی دیسک‌های بلانک ریخته شد و پلیت‌های حاوی باکتری و دیسک به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی‌متر) به کمک کولیس اندازه‌گیری شد. دیسک حاوی اتانول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Ashrafudoulla et al., 2020).

#### تعیین حداقل غلظت مهاري و حداقل غلظت کشندي (MBC) کارواکروول و اوژنول

به منظور تعیین حداقل غلظت مهاري (MIC) از روش میکرودیلوژن در پلیت‌های ۹۶ خانه استفاده شد. سریال‌های رقت با استفاده از محیط مارین برات از ۱۰۰۰ تا ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شدند. سپس به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^6$  CFU/mL اضافه شد. چاهک حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتریایی بدون اضافه کردن ترکیبات به عنوان شاهد مثبت و چاهک حاوی محیط کشت مارین برات و غلظت‌های مختلف حلال (بدون باکتری) به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. این آزمون برای هر گونه باکتری سه بار تکرار شد. بعد از انکوباسیون، چاهک‌ها از نظر

مارین برات افزوده شد و در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و  $120\text{rpm}$  قرار گرفت. سپس جذب نوری ( $600\text{nm}$ ) در زمان‌های مختلف (۰، ۲، ۴، ۸، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت) خوانده شد و منحنی رشد باکتری ترسیم شد (Brian-Jaisson et al., 2014).

#### بررسی اثر ضدباکتریایی کارواکروول و اوژنول به روش انتشار دیسک

فعالیت ضدباکتریایی کارواکروول و اوژنول با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. به منظور تهیه سوسپانسیون باکتریایی از کشت تازه باکتری در محیط مارین آگار استفاده شد. ۳-۵ کلنی منفرد باکتریایی به ۴ میلی‌لیتر محیط مارین برات افزوده شد و بعد از ۱۲-۱۸ ساعت که باکتری به میانه فاز رشد لگاریتمی (Mid-log Phase) رسید، کدورت سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک‌فارلند ( $10^8 \times 1/5$  CFU/mL) تنظیم و از این استوک در سطح محیط کشت، با استفاده از سوآپ کشت چمنی داده شد. سپس دیسک‌های بلانک به کمک پنس استریل، روی سطح محیط کشت قرار گرفتند. مقدار ۱۴ میکرولیتر کارواکروول و اوژنول در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر

میلی‌لیتر محیط مارین براث منتقل شد (ضریب رقت ۱:۱۰۰). سپس به منظور تشکیل بیوفیلم روی سطوح میکروپلیت، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در ادامه، فاز رویی تخلیه شده و چاهک‌ها به مدت سه مرتبه با آب مقطر شست و شو داده شدند. سپس به منظور تثبیت بیوفیلم باکتریایی، میکروپلیت به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خشک شدن چاهک‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله (۰/۲ درصد) به هر چاهک اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه، به منظور خروج رنگ اضافی، چاهک‌ها با آب مقطر شست و شو داده شدند. در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد به هر چاهک اضافه شده و جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با میکروپلیت ریدر (BioTek, Epoch 2، آمریکا) اندازه‌گیری شد (Cabarkapa et al., 2019).

#### تأثیر کارواکروول و اوژنول در ممانعت از تشکیل بیوفیلم

بررسی اثر کارواکروول و اوژنول در ممانعت از تشکیل بیوفیلم نیز با استفاده از میکروپلیت‌های

کدورت ناشی از رشد باکتری‌ها بررسی شدند و آخرین چاهکی که هیچ کدورتی در آن دیده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد.

به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) از چاهک‌های فاقد کدورت رشد، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بر روی محیط مارین آگار به روش چمنی کشت داده شد. بعد از انکوبه پلیت‌های به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، میزان رشد باکتری‌ها بررسی شد. در نهایت، کمترین غلظتی که در آن رشد و تشکیل کلنی مشاهده نشد، به عنوان MBC در نظر گرفته شد (Jadhav et al., 2013).

#### قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های مورد بررسی

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش (Tissue Culture Plate) TCP (Method)، در پلیت‌های ۹۶ چاهک انجام گرفت. برای این منظور، ابتدا باکتری‌های مورد نظر به محیط کشت مارین براث اضافه شدند و به مدت ۱۶-۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از تنظیم کدورت با استاندارد نیم مک‌فارلند، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به لوله حاوی ۹/۹

پس از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. به منظور ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2019 استفاده شد.

### نتایج

#### منحنی رشد

ترسیم منحنی رشد باکتری‌ها با هدف تعیین فاز رشد لگاریتمی در یک بازه زمانی ۷۲ ساعته انجام گرفت. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تفاوت‌هایی در زمان شروع فاز رشد لگاریتمی در باکتری‌های مختلف مشاهده شد، به طوری که در باکتری‌های PH18 و KH9 بعد از دو ساعت، در باکتری PH1 بعد از ۴ ساعت و در باکتری‌های KM5 و KM1 بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد. بررسی منحنی‌های رشد همچنین تفاوت‌هایی در زمان رسیدن به میانه فاز رشد لگاریتمی نشان داد که این زمان از ۱۲ تا ۱۸ ساعت در باکتری‌های مختلف متفاوت بود. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، در مطالعه پیش رو از سوسپانسیون باکتریایی ۱۸-۱۲ ساعته (با توجه به نوع باکتری)، برای انجام آزمون‌های ضدباکتری استفاده شد.

۹۶ خانه انجام شد. ابتدا با استفاده از سریال‌های رقت، غلظت کارواکرول و اوژنول در چاهک‌های میکروپلیت معادل MIC، 2MIC، 4MIC، 1/2MIC و 1/4MIC تنظیم شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی با غلظت  $10^6$  CFU/mL به هر چاهک اضافه شد به طوری که حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ میکرولیتر رسید. بعد از انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، محتویات چاهک‌ها تخلیه و رنگ‌آمیزی با محلول کریستال ویوله مطابق با روش Cabarkapa و همکاریان (۲۰۱۹) انجام گرفت. در نهایت درصد مهار تشکیل بیوفیلم باکتری (BFI) در حضور غلظت‌های مختلف کارواکرول و اوژنول از رابطه ۱ محاسبه شد (Miladi et al., 2016; Cabarkapa et al., 2019).

#### رابطه ۱:

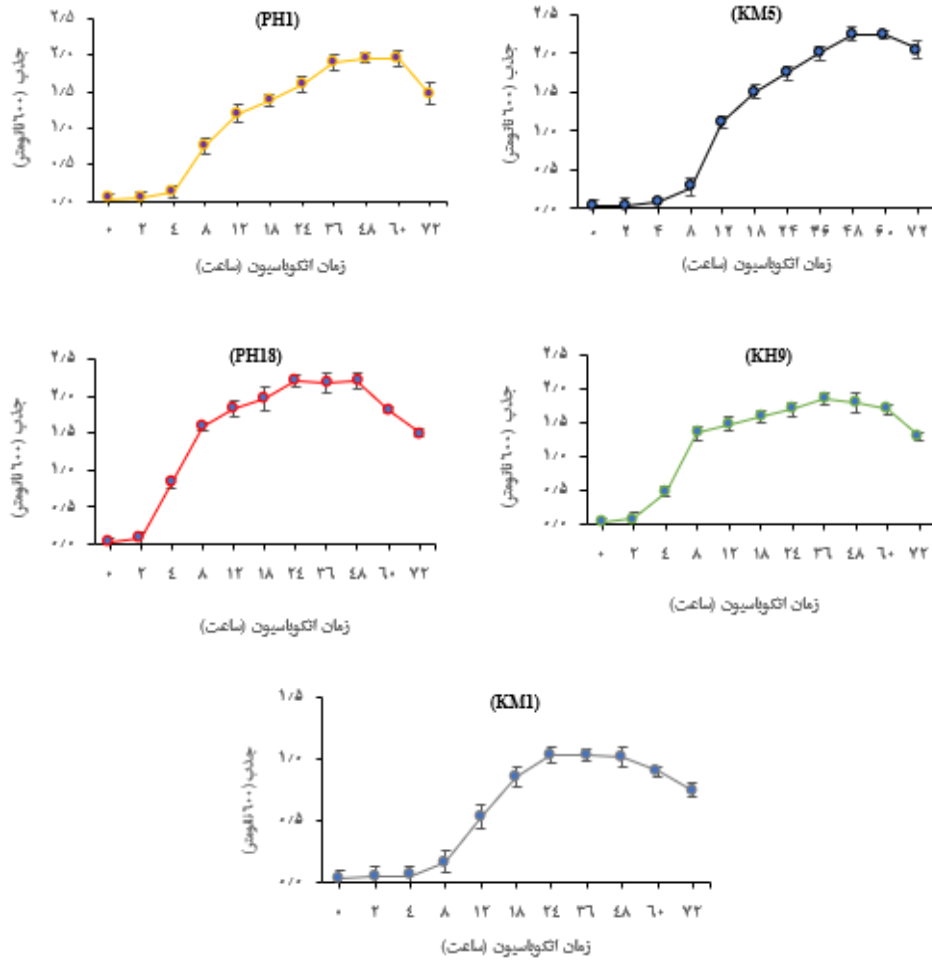
$$BFI (\%) = [(W_{CP} - W_T) / W_{CP}] \times 100$$

$W_{CP}$ : میانگین چاهک شاهد مثبت؛  $W_T$ : میانگین چاهک تیمار.

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 24 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و





شکل ۲: منحنی رشد باکتری‌های دریایی جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

مشاهدات انجام شده، باکتری KM1 بیشترین حساسیت را به کارواکرول ( $17 \pm 0/30$  میلی‌متر) و اوژنول ( $15 \pm 0/5$  میلی‌متر) نشان داد. کمترین میزان حساسیت به کارواکرول و اوژنول نیز در باکتری KM5 به ترتیب با قطر هاله  $10/5 \pm 0/5$

قابلیت کارواکرول و اوژنول در مهار فرم منفرد باکتری‌ها میانگین قطر هاله مهاری کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری‌های دریایی مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. بر اساس

و  $9 \pm 0.3$  میلی‌متر مشاهده شد. نتایج همچنین نشان داد که بر اساس شاخص‌های آماری، اختلاف معنی‌داری بین فعالیت مهاری کارواکروال در باکتری‌های PH18، KH9 و PH1 وجود نداشت ( $P > 0.05$ ; جدول ۲).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری حداقل غلظت مهاری و حداقل کشندگی کارواکروال و اوژنول در مقابل پنج باکتری مورد بررسی در جدول ۳ نمایش داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، کمترین غلظت بازدارنده رشد و کشنده (بیشترین حساسیت به ترکیب)، به ترتیب در غلظت‌های  $62/5$  و  $125$  میکروگرم در میلی‌لیتر کارواکروال در مقابل باکتری KM1 به

دست آمد. کمترین حساسیت به ترکیب نیز با اوژنول به ترتیب با مقدار MIC و MBC،  $500$  و  $1000$  میکروگرم در میلی‌لیتر در مقابل باکتری‌های PH18، KH9 و KM5 مشاهده شد.

#### قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری

توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی به منظور تشکیل بیوفیلم، با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است.

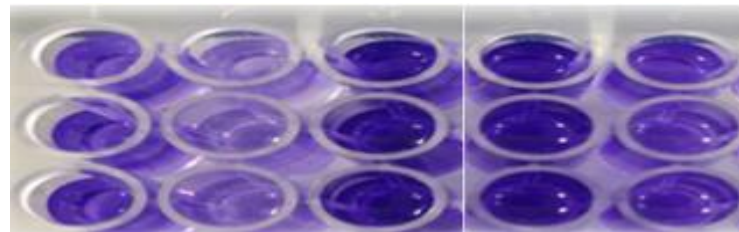
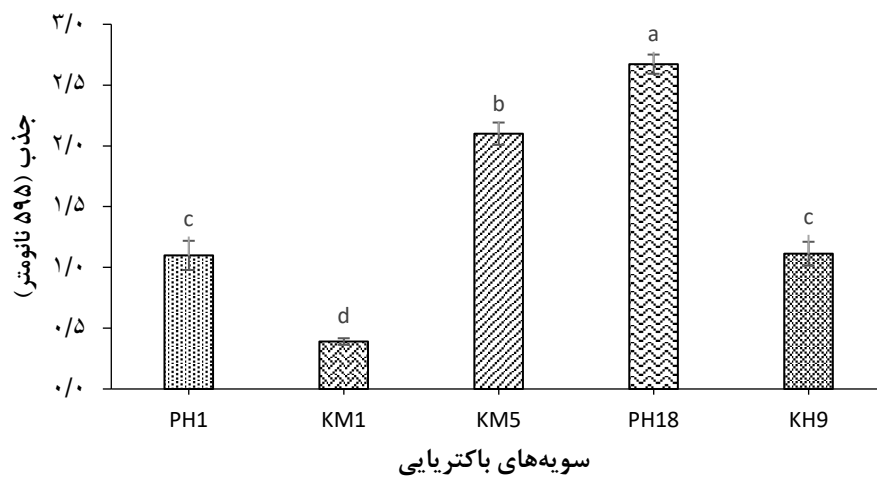
جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد کارواکروال و اوژنول در مقابل باکتری‌های دریایی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

باکتری	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)	
	کارواکروال ( $10 \text{ mg/mL}$ )	اوژنول ( $10 \text{ mg/mL}$ )
PH18	$14.5 \pm 1.0^b$	$12.0 \pm 0.7^c$
KM1	$17.0 \pm 0.3^a$	$15.0 \pm 0.5^a$
KH9	$14.5 \pm 0.5^b$	$13.5 \pm 0.5^b$
KM5	$10.5 \pm 0.5^d$	$9.0 \pm 0.3^d$
PH1	$15.0 \pm 0.3^b$	$14.0 \pm 1.0^{ab}$

حروف غیر یکسان اختلاف معنی‌دار را بین میانگین‌های هر ستون نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۳: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری‌های دریایی

باکتری	(μg/mL) MIC		(μg/mL) MBC	
	کارواکرول	اوژنول	کارواکرول	اوژنول
PH18	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
KM1	۶۲/۵	۱۲۵	۱۲۵	۲۵۰
KH9	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
KM5	۲۵۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰
PH1	۱۲۵	۲۵۰	۲۵۰	۵۰۰



شکل ۳: قابلیت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های مختلف باکتری (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر یکسان اختلاف معنی‌دار را بین میانگین‌های هر ستون نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

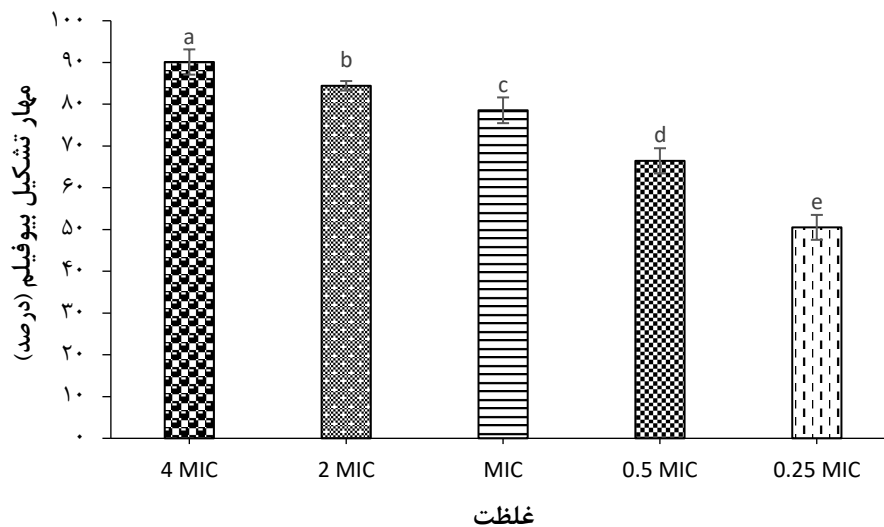
قابلیت کارواکروول و اوژنول در مهار ساختار

### بیوفیلمی باکتری PH18

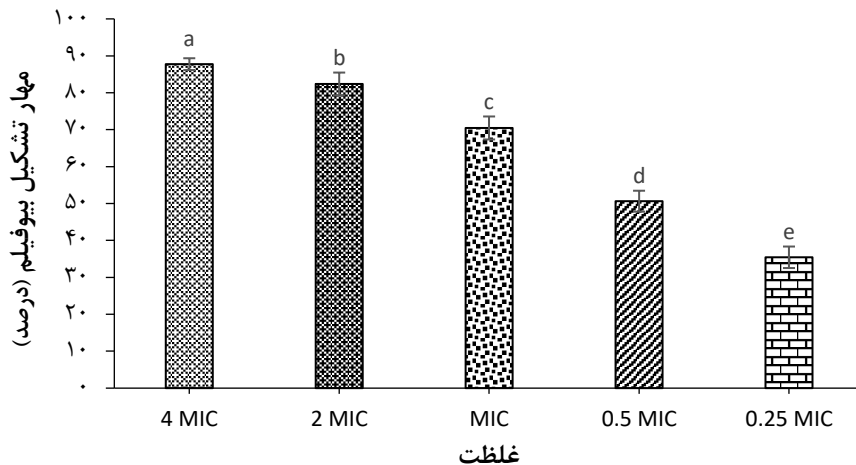
قدرت مهاری کارواکروول و اوژنول بر پدیده تشکیل بیوفیلیم باکتری PH18 در غلظت‌های 1/4MIC, 1/2MIC, MIC, 2MIC, 4MIC مورد بررسی قرار گرفت که نتایج آن به ترتیب در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که افزایش غلظت، تاثیر مستقیمی بر مهار ساخت بیوفیلمی باکتری داشت، به طوری که با افزایش غلظت، میزان مهار بیوفیلیم نیز افزایش یافت.

هر پنج باکتری مورد مطالعه، مقادیر قابل قبولی از تشکیل بیوفیلیم را نشان دادند. بالاترین میزان بیوفیلیم در باکتری PH18 و کمترین میزان در باکتری KM1 مشاهده شد. به طور کلی، نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه، اختلاف معنی‌داری را بین میزان تشکیل بیوفیلیم در باکتری‌های مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ).

با توجه به توانایی بیشتر باکتری PH18 در تشکیل بیوفیلیم، در ادامه از این باکتری به منظور بررسی اثر کارواکروول و اوژنول بر مهار تشکیل بیوفیلیم استفاده شد.



شکل ۴: تاثیر غلظت‌های مختلف کارواکروول بر مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری PH18 (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر یکسان اختلاف معنی‌دار را بین میانگین‌های هر ستون نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵: تاثیر غلظت‌های مختلف اوژنول بر مهار تشکیل بیوفیلم باکتری PH18 (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). حروف غیر یکسان اختلاف معنی‌دار را بین میانگین‌های هر ستون نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ).

می‌تواند کمک شایانی به معضل چسبیدن ماکروفولینگ‌ها و استقرار آن‌ها بر روی ادوات دریایی و در نتیجه قطع فولینگ در مراحل اولیه کند. امروزه از روش‌های مختلفی به منظور مقابله با پدیده بیوفیلم و بیوفولینگ دریایی استفاده می‌شود که یکی از آسان‌ترین و موثرترین این روش‌ها استفاده از ترکیبات شیمیایی است. با توجه به این که این ترکیبات دارای اثرات جانبی مضر بر موجودات غیرهدف هستند، کاربرد آن‌ها با محدودیت‌هایی روبه‌رو است. این مشکلات باعث شده است که در سال‌های اخیر تقاضا برای استفاده از ترکیبات طبیعی به منظور مقابله با فولینگ افزایش یابد

همان‌طور که از نمودار برمی‌آید، کارواکرول (شکل ۴) و اوژنول (شکل ۵) در غلظت‌های 4MIC و 1/4MIC به ترتیب بیشترین (کارواکرول ۹۰ درصد و اوژنول ۸۷ درصد) و کمترین (کارواکرول ۵۰ درصد و اوژنول ۳۵ درصد) میزان مهار بیوفیلم را نشان دادند. به طور کلی نتایج تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، اختلاف معنی‌داری را بین میزان مهار ساخت بیوفیلم در غلظت‌های مختلف نشان داد ( $P < 0.05$ ).

## بحث

با توجه به این که تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها به عنوان یکی از مراحل کلیدی در فولینگ دریایی مطرح است، مقابله با این پدیده

کارواکروول و اوژنول بر باکتری‌های دریایی و نیاز به استفاده از ترکیبات سازگار با محیط زیست به منظور مقابله با پدیده فولینگ در صنایع دریایی، در مطالعه حاضر فعالیت این ترکیبات بر باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم جداسازی شده از آب‌های خلیج فارس بررسی شد. نتایج مطالعه حاضر در آزمون انتشار دیسک، MIC و MBC نشان داد که کارواکروول و اوژنول توانایی قابل قبولی در جلوگیری از رشد باکتری‌های دریایی دارند. بیشترین حساسیت به کارواکروول و اوژنول در مقابل باکتری KM1 به ترتیب با قطر هاله  $17 \pm 0/30$  و  $15 \pm 0/5$  به دست آمد. همچنین مقادیر MIC و MBC کارواکروول و اوژنول بر باکتری‌های مطالعه شده به ترتیب در محدوده غلظتی  $500-62/5$  و  $1000-125$  میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که قابلیت مهار کارواکروول و اوژنول در محیط مایع (آزمون MIC) چند برابر محیط جامد (آزمون انتشار دیسک) است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کارواکروول و اوژنول نیز مانند بسیاری از عصاره‌های گیاهی، در محیط جامد، قابلیت انتشار اندکی دارند و برای تاثیرگذاری قابل قبول در این محیط، نیازمند غلظتی بسیار بیشتر از غلظت مطلوب و موثر در محیط مایع هستند. پاسخ متفاوت

(Inbakandan et al., 2013; Perez et al., 2015).

از جمله ترکیبات طبیعی که نقش موثری در مهار بیوفیلم‌های باکتریایی و ممانعت از چسبیدن باکتری‌ها به سطوح مختلف نشان داده‌اند، اسانس‌ها و ترکیبات اصلی آنها همچون کارواکروول، تیمول و اوژنول هستند (Gutierrez-Pacheco et al., 2018). تا به امروز گزارش‌های بسیار اندکی در مورد فعالیت این ترکیبات در بحث فولینگ دریایی وجود دارد که از معدود گزارش‌ها در این مورد می‌توان به پژوهشی که در سال ۲۰۰۷ توسط Bhattarai و همکاران انجام گرفت، اشاره کرد. در این پژوهش، فعالیت ترکیب فنولی اوژنول به همراه چندین ترکیب طبیعی دیگر، در مقابل باکتری‌های دریایی و اسپورهای جلبک *Ulva* در فاز آزمایشگاهی و میدانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که اوژنول به همراه دیگر ترکیبات طبیعی بررسی شده، دارای پتانسیل بالایی برای توقف تشکیل بیوفیلم‌های باکتریایی اولیه هستند که در نهایت می‌توانند منجر به کاهش اتصال ماکروفولینگ‌ها شوند (Bhattarai et al., 2007).

به دلیل عدم مطالعات کافی در مورد فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی ترکیباتی چون

Olasupo et al., 2003; Michiels et al., 2007). در پژوهش Michiels و همکاران (۲۰۰۷)، اثر ضدباکتریایی تیمول، کارواکرول، اوژنول و سینامالدهید بر باکتری‌های پاتوژن مختلف مورد بررسی قرار گرفت که تیمول و کارواکرول بیشترین و اوژنول کمترین اثر ضدباکتریایی را نشان دادند. در پژوهش دیگری که توسط Olasupo و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت، کارواکرول فعالیت ضدباکتریایی بالاتری ( $1/5\text{mM}$ ) در مقابل باکتری *Escherichia coli*، نسبت به سینامیک اسید ( $5/0\text{mM}$ ) و اوژنول ( $2/5\text{mM}$ ) نشان داد که دلیل این موضوع می‌تواند مربوط به چربی‌دوستی کمتر این ترکیبات در مقایسه با کارواکرول باشد (Olasupo et al., 2003).

در پژوهش مسلمی و کاشف (۱۳۹۹)، غلظت ۳ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اوژنول به ترتیب به عنوان کمترین غلظت مهارکننده رشد و کمترین غلظت کشنده برای سویه استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* تعیین شد که در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر، می‌توان گفت که اوژنول عملکرد بهتری (حداکثر غلظت بازدارنده رشد: ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در مهار رشد هر پنج باکتری بیوفیلم دریایی باکتری‌ها به اسانس‌ها یا ترکیبات آنها نیز می‌تواند به دلیل ساختار متفاوت غشای سلولی و گرم منفی یا گرم مثبت بودن آنها باشد، چون به طور معمول اسانس‌ها بر غشای سلولی آنها اثر می‌گذارند و میزان نفوذپذیری به اسانس‌ها یا ترکیبات آنها، بستگی به ساختار دیواره سلولی و آبگریز بودن این ترکیبات دارد (Lambert et al., 2001). در مورد کارواکرول این فرضیه مطرح است که مکانیسم عمل آن مرتبط با ماهیت چربی‌دوستی (لیپوفیلیسیته) آن است که با نفوذ در غشای سلول باکتری موجب تغییر سیستم‌های آنزیمی و از بین رفتن محتویات سلولی می‌شود (Gutierrez-Pacheco et al., 2018).

گزارش شده است که اوژنول به دلیل داشتن ساختار فنولی از فعالیت سطحی برخوردار است و با آسیب به غشای سلول‌های باکتری، باعث مهار آنزیم‌ها و همچنین تداخل در تولید برخی از آمینواسیدهای مورد نیاز برای رشد باکتری شده که در نهایت این موضوع منجر به مرگ سلول می‌شود (Shiravani et al., 2020).

نتایج مطالعه حاضر همچنین نشان داد که اوژنول در مقایسه با کارواکرول، دارای اثر ضدباکتریایی به مراتب کمتری است. مشابه این نتایج در پژوهش‌های دیگر نیز مشاهده شد

بررسی شده نشان داد (مسلمی و کاشف، ۱۳۹۹).

تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری برای حفظ و بقایای آن‌ها در شرایط نامساعد محیطی است. مقاومت بالا در برابر تنش‌های محیطی به ویژه تنش خشکی، تغییرات ناگهانی اسیدیته و دمای محیط زیست از جمله مزایای زندگی بیوفیلمی محسوب می‌شود (Mhatre et al., 2014; Khelissa et al., 2017). اسانس‌ها و مواد موثره آنها در جلوگیری از شکل‌گیری بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا در مطالعات مختلف اثبات شده است (Kang et al., 2019; Cui et al., 2020). در مطالعه حاضر نیز فعالیت ضدبیوفیلمی کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری دریایی PH18 بسیار کارآمد بود. اثر بازدارندگی این ترکیبات ارتباط مستقیمی با غلظت نشان داد. به طوری که اثر مهاری کارواکرول و اوژنول در غلظت 4MIC به ترتیب ۹۰ و ۸۷ درصد بود.

تشکیل بیوفیلم باکتریایی در حضور کارواکرول در مطالعه Joshi و همکاریان (۲۰۱۶) و همچنین Gutierrez-Pacheco و همکاریان (۲۰۱۸) نیز تایید شد. این پژوهشگران اظهار داشتند که کارواکرول ممکن است با تداخل در سیستم کوئروم سنسینگ (Quorum Sensing) باکتری مانع از تشکیل بیوفیلم شود (Joshi et al., 2016; Gutierrez-Pacheco et al., 2018). فعالیت مهاری کارواکرول بر تشکیل بیوفیلم همچنین به اثرگذاری آن روی چسبندگی سطح سلول باکتری نسبت داده شده است. برخی مطالعات ثابت کرده‌اند که فلاژله، فیمبریای نوع I و کرلی (Curli) در مراحل اولیه چسبندگی نقش دارند و اینها توسط مکانیسم‌های ارتباط بین سلولی کنترل می‌شوند. از این نظر ممکن است کارواکرول در این مرحله، از چسبندگی اولیه و در نتیجه ایجاد بیوفیلم جلوگیری کند (Guttenplan and Kearns, 2013). ایجاد اختلال در سیستم کوئروم سنسینگ و یا تداخل در فلاژل و پیلی تایپ IV و در ادامه کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های پایین‌تر از MIC اوژنول، در پژوهش مسلمی و کاشف (۱۳۹۹) مشاهده شد. در این پژوهش، ممانعت از تشکیل بیوفیلم به دنبال کاهش حرکت Swarming این پیشنهاد را مطرح می‌کند که اوژنول علاوه بر تاثیر بر مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم، می‌تواند اثرگذاری فاحشی نیز بر طراحی ساختار بیوفیلم داشته باشد (مسلمی و کاشف، ۱۳۹۹).

تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری برای حفظ و بقایای آن‌ها در شرایط نامساعد محیطی است. مقاومت بالا در برابر تنش‌های محیطی به ویژه تنش خشکی، تغییرات ناگهانی اسیدیته و دمای محیط زیست از جمله مزایای زندگی بیوفیلمی محسوب می‌شود (Mhatre et al., 2014; Khelissa et al., 2017). اسانس‌ها و مواد موثره آنها در جلوگیری از شکل‌گیری بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا در مطالعات مختلف اثبات شده است (Kang et al., 2019; Cui et al., 2020). در مطالعه حاضر نیز فعالیت ضدبیوفیلمی کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری دریایی PH18 بسیار کارآمد بود. اثر بازدارندگی این ترکیبات ارتباط مستقیمی با غلظت نشان داد. به طوری که اثر مهاری کارواکرول و اوژنول در غلظت 4MIC به ترتیب ۹۰ و ۸۷ درصد بود.

کاهش تشکیل بیوفیلم باکتریایی در حضور کارواکرول در مطالعه Joshi و همکاریان (۲۰۱۶) و همچنین Gutierrez-Pacheco و همکاریان (۲۰۱۸) نیز تایید شد. این پژوهشگران اظهار داشتند که کارواکرول ممکن است با تداخل در سیستم کوئروم سنسینگ (Quorum Sensing) باکتری مانع از تشکیل بیوفیلم شود (Joshi et al., 2016; Gutierrez-Pacheco et al., 2018). فعالیت مهاری کارواکرول بر تشکیل بیوفیلم همچنین به اثرگذاری آن روی چسبندگی سطح سلول باکتری نسبت داده شده است. برخی مطالعات ثابت کرده‌اند که فلاژله، فیمبریای نوع I و کرلی (Curli) در مراحل اولیه چسبندگی نقش دارند و اینها توسط مکانیسم‌های ارتباط بین سلولی کنترل می‌شوند. از این نظر ممکن است کارواکرول در این مرحله، از چسبندگی اولیه و در نتیجه ایجاد بیوفیلم جلوگیری کند (Guttenplan and Kearns, 2013). ایجاد اختلال در سیستم کوئروم سنسینگ و یا تداخل در فلاژل و پیلی تایپ IV و در ادامه کاهش تشکیل بیوفیلم باکتری *P. aeruginosa* در غلظت‌های پایین‌تر از MIC اوژنول، در پژوهش مسلمی و کاشف (۱۳۹۹) مشاهده شد. در این پژوهش، ممانعت از تشکیل بیوفیلم به دنبال کاهش حرکت Swarming این پیشنهاد را مطرح می‌کند که اوژنول علاوه بر تاثیر بر مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم، می‌تواند اثرگذاری فاحشی نیز بر طراحی ساختار بیوفیلم داشته باشد (مسلمی و کاشف، ۱۳۹۹).



در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۹ توسط Lou و همکاران انجام شد، مشاهده شد که اوژنول می‌تواند با کاهش تولید پایوسیائین و رامنولپید در باکتری *P. aeruginosa*، موجب ممانعت از تشکیل بیوفیلم و حرکت باکتری شود که این کاهش به غلظت اوژنول بستگی دارد. در مجموع، عملکرد مطلوب هر دو ماده کارواکرول و اوژنول در مقابل باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم دریایی، می‌تواند این ترکیبات را به عنوان انتخاب امیدبخشی برای ترکیبات سمی آنتی‌فولینگ مطرح کند. با توجه به این که پژوهش حاضر در فاز آزمایشگاهی انجام گرفته است، پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی در مورد عملکرد این ترکیبات در فاز میدانی نیز مورد پژوهش قرار گیرد.

## منابع

- نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۳۶(۶): ۹۸۵-۱۰۰۴.
- Ashrafudoulla M., Mizan M.F.R., Ha A.J.W., Park S.H. and Ha S.D. 2020.** Antibacterial and antibiofilm mechanism of eugenol against antibiotic resistance *Vibrio parahaemolyticus*. Food Microbiology, 91: 1–13 (103500).
- Bhattarai H.D., Paudel B., Park N., Lee K.S. and Shin H. 2007.** Evaluation of antifouling activity of eight commercially available organic chemicals against the early foulers marine bacteria and *Ulva* spores. Journal of Environmental Biology, 28(4): 857–863.
- Brian-Jaisson F., Ortalo-Magne A., Guentas-Dombrowsky L., Armougom F., Blache Y. and Molmeret M. 2014.** Identification of bacterial strains isolated from the Mediterranean Sea exhibiting different abilities of biofilm formation. Microbial Ecology, 68(1): 94–110.
- Cabarkapa I., Colovic R., Duragic O., Popovic S., Kokic B., Milanov D. and Pezo L. 2019.** Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella enteritidis*. Biofouling, 35(3): 361–375.
- مسلمی ص. و کاشف ن. ۱۳۹۹. اوژنول: عامل کارآمد مهار کننده سیستم Quorum Sensing برای کاهش بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا.
- Characklis W.G. and Cooksey K.E. 1983.** Biofilms and microbial fouling. Advances in Applied Microbiology, 29: 93–138.
- Cui H., Zhang C., Li C. and Lin L. 2020.** Inhibition mechanism of cardamom essential oil on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. LWT- Food Science and Technology, 122: 1–7 (109057).
- Dang H. and Lovell C.R. 2016.** Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(1): 91–138.
- De Carvalho C.C. 2018.** Marine biofilms: A successful microbial strategy with economic implications. Frontiers in Marine Science, 5: 1–11 (126).
- De Sousa J.P., De Azeredo G.A., De Araujo Torres R., Da Silva Vasconcelos M.A., Da Conceição M.L. and De Souza E.L. 2012.** Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. International Journal of Food Microbiology, 154(3): 145–151.

- Edwards C.D., Pawluk K.A. and Cross S.F. 2015.** The effectiveness of several commercial antifouling treatments at reducing biofouling on finfish aquaculture cages in British Columbia. *Aquaculture Research*, 46(9): 2225–2235.
- 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. and 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.
- Guttenplan S.B. and Kearns D.B. 2013.** Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(6): 849–871.
- Inbakandan D., Kumar C., Abraham L.S., Kirubakaran R., Venkatesan R. and Khan S.A. 2013.** Silver nanoparticles with anti microfouling effect: A study against marine biofilm forming bacteria. *Colloids and Surfaces (B)*, 111: 636–643.
- Jadhav S., Shah R., Bhawe M. and Palombo E.A. 2013.** Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control*, 29(1): 125–130.
- Joshi J.R., Khazanov N., Senderowitz H., Burdman S., Lipsky A. and Yedidia I. 2016.** Plant phenolic volatiles inhibit quorum sensing in pectobacteria and reduce their virulence by potential binding to ExpI and ExpR proteins. *Scientific Reports*, 6(1): 1–15.
- Joshi M., Mukherjee A., Misra S.C. and Ramesh U.S. 2015.** Need of natural biocides in antifouling paints for prevention of marine pollution. *International Journal Innovative Research and Development*, 4: 43–49.
- Kang J., Jin W., Wang J., Sun Y., Wu X. and Liu L. 2019.** Antibacterial and anti-biofilm activities of peppermint essential oil against *Staphylococcus aureus*. *LWT- Food Science and Technology*, 101: 639–645.
- Karlsson J. and Eklund B. 2004.** New biocide-free anti-fouling paints are toxic. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5-6): 456–464.
- Khelissa S.O., Abdallah M., Jama C., Faille C. and Chihib N.E. 2017.** Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *Journal of Materials Environmental Science*, 8(9): 3326–3346.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P.J. and Nychas G.J. 2001.** A study of the minimum inhibitory

- concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3): 453–462.
- Lin X.Y., Lu C.Y. and Ye Y. 2009.** Toxicity of crude extracts from several terrestrial plants to barnacle larvae on mangrove seedlings. *Ecological Engineering*, 35(4): 502–510.
- Lou Z., Letsididi K.S., Yu F., Pei Z., Wang H. and Letsididi R. 2019.** Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Protection*, 82(3): 379–389.
- Martinez-Hernandez G.B., Amodio M.L. and Colelli G. 2017.** Carvacrol-loaded chitosan nanoparticles maintain quality of fresh-cut carrots. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41: 56–63.
- Mastromatteo M., Danza A., Conte A., Muratore G. and Del Nobile M.A. 2010.** Shelf life of ready to use peeled shrimps as affected by thymol essential oil and modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2): 250–256.
- Mhatre E., Monterrosa R.G. and Kovacs A.T. 2014.** From environmental signals to regulators: Modulation of biofilm development in Gram-positive bacteria. *Journal of Basic Microbiology*, 54(7): 616–632.
- Michiels J., Missotten J., Fremaut D., De Smet S. and Dierick N. 2007.** In vitro dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Science*, 109(1-3): 157–160.
- Miladi H., Mili D., Slama R.B., Zouari S., Ammar E. and Bakhrouf A. 2016.** Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three Mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93: 22–31.
- Olasupo N.A., Fitzgerald D.J., Gasson M.J. and Narbad A. 2003.** Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6): 448–451.
- Pavela R. 2015.** Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Industrial Crops and Products*, 76: 174–187.
- Perez M., Garcia M. and Blustein G. 2015.** Evaluation of low copper content antifouling paints containing natural phenolic compounds as bioactive additives.

- Marine Environmental Research, 109: 177–184.
- Salta M., Wharton J.A., Blache Y., Stokes K.R. and Briand J.F. 2013.** Marine biofilms on artificial surfaces: Structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 15(11): 2879–2893.
- Shiravani Z., Tajik H. and Aliakbarlu J. 2020.** Antibacterial activity of eugenol and organic acids against *Escherichia coli* O157: H7. *Razi Journal of Medical Sciences*, 26(11): 53–63.
- Suntres Z.E., Coccimiglio J. and Alipour M. 2015.** The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3): 304–318.
- Tang R.J. and Cooney J.J. 1998.** Effects of marine paints on microbial biofilm development on three materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5): 275–280.
- Thein Z.M., Samaranyake Y.H. and Samaranyake L.P. 2007.** In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Archives of Oral Biology*, 52(8): 761–767.
- Vazquez B.I., Fente C., Franco C.M., Vazquez M.J. and Cepeda A. 2001.** Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1-2): 157–163.
- Wahl M. 1989.** Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: Some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series*, 58: 175–189.
- Watermann B.T., Daehne B., Sievers S., Dannenberg R., Overbeke J.C., Klijnstra J.W. and Heemken O. 2005.** Bioassays and selected chemical analysis of biocide-free antifouling coatings. *Chemosphere*, 60(11): 1530–1541.
- Yebra D.M., Kiil S. and Dam-Johansen K. 2004.** Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2): 75–104.



Research Paper

## Evaluation of antibacterial and anti-biofilm effects of carvacrol and eugenol on bacteria isolated from the Persian Gulf waters

Fatemeh Sedaghat<sup>1</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>2\*</sup>, Arash Ghaderi<sup>3</sup>, Fatemeh Shayesteh<sup>4</sup>

Received: July 2021

Accepted: October 2021

### Abstract

The formation of microbial biofilms is one of the key steps in marine fouling. Therefore, the development of anti-biofilm strategies, especially through research on environmentally friendly antifouling materials, can help control biofouling. The present study was performed to evaluate the antibacterial and anti-biofilm activity of carvacrol and eugenol against marine bacteria isolated from Persian Gulf waters. In disk diffusion method, *Vibrio* sp. (KM1) bacteria showed more sensitivity against carvacrol and eugenol with a growth inhibition zone diameter of  $17\pm 0.3$  and  $15\pm 0.5$  mm, respectively. Minimum inhibitory concentration ( $62.5\mu\text{g/mL}$ ) and minimum bactericidal concentration ( $125\mu\text{g/mL}$ ) were also obtained with carvacrol against KM1. In this study, the inhibitory effect of carvacrol and eugenol on biofilm formation by *Pseudoalteromonas* sp. (PH18) using tissue culture plate method (TCP) was investigated and 4MIC concentration showed the highest biofilm inhibition (carvacrol 90% and eugenol 87%). Based on the results, carvacrol and eugenol can be used as an alternative in antifouling coatings due to their appropriate anti-biofilm activity against marine bacteria.

**Key words:** *Antibacterial, Carvacrol, Eugenol, Marine Bacteria.*

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

2- Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Qom, Qom, Iran.

3- Associated Professor in Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

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

\*Corresponding Author: [Morteza.110110@gmail.com](mailto:Morteza.110110@gmail.com)