



ORIGINAL RESEARCH PAPER

Identification of some bacterial strains isolated from mangrove habitat exhibiting abilities of biofilm-forming

Zahra Zarei Jeliani¹, Morteza Yousefzadi^{2*}, Adnan Shahdadi³

¹ Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, P.O. Box 3995, Bandar Abbas, Iran.

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

³ Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, P.O. Box 3995, Bandar Abbas, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2022/05/26

Revised: 2024/03/8

Accepted: 2024/03/5

Keywords:

16S rRNA gene
Bacterial biofilm
Biofouling, Fouling
Mangrove forest

*Corresponding author:

✉ morteza110110@gmail.com

ORCID: 0000-0003-4955-5288

doi: [10.52547/joc.15.57.1](https://doi.org/10.52547/joc.15.57.1)

ABSTRACT

Background and Objectives: Biofouling has long been a problem for humans. Bio-fouling communities have different ecological, economic and health effects (humans, plants, and marine animals). Generally, bacterial biofilm formation is the first step of the marine fouling process. This study aimed to identify the bacteria capable of forming the biofilms in mangroves.

Methods: After sampling a one-day biofilm layer formed on a wooden panel, the isolates were separated and purified using the Marin Zobel culture medium. From 12 isolates, we selected 9 isolates for molecular identification based on their ability to form bacterial biofilms using the violet crystal method. DNA was extracted using CTAB method and molecular identification was performed using 16S rRNA gene amplification.

Findings: Among isolates, 58.3% showed strong biofilm formation, 16.6% showed moderate biofilm formation, and 25% showed weak biofilm formation. Based on the results, Proteobacteria with 55.5% as dominant phylum (4 genera *Alteromonas*, *Salinimonas*, *Vibrio* and *Pseudoalteromonas*), Firmicutes with 33.3% (3 genera *Bacillus*, *Oceanobacillus* and *Fictibacillus*), and Bacteroidetes 11/11% (genus *Tenacibaculum*) were identified.

Conclusion: Marine biofilms formed on inanimate and living submerged surfaces playing a key role in the establishment of larvae of Barnacles and other macrofoulers are a promising source for safe and environmentally-friendly aquatic anti-fouling approaches.



NUMBER OF TABLES

5



NUMBER OF FIGURES

2



NUMBER OF REFERENCES

35

مقاله پژوهشی

شناسایی برخی سویه‌های باکتریایی تشکیل دهنده بیوفیلم جداسازی شده از منطقه مانگرو

زهرا زارعی جلیانی^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲*}، عدنان شهزادی^۳^۱گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران^۳گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۳/۵

تاریخ بازبینی: ۱۴۰۲/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

چکیده

پیشینه و اهداف: انسان از دیرباز با مسائل مربوط به پدیده‌ی چسبندگی زیستی (بیوفولینگ) درگیر بوده است. جوامع فولینگ زیستی دارای اثرات مختلف اکولوژیک، اقتصادی و سلامت (انسان، گیاهان و جانوران دریایی) می‌باشند. عموماً تشکیل بیوفیلم باکتریایی، اولین مرحله‌ی ایجاد فرایند فولینگ دریایی شناخته شده است. هدف از این مطالعه، شناسایی باکتری‌هایی با توانایی میزان تشکیل بیوفیلم در محدوده جنگل حرا می‌باشد.

روش‌ها: در این راستا پس از نمونه‌برداری از لایه بیوفیلم یک روزه تشکیل شده بروی پنبه چوبی، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها در محیط کشت مرین زوبل انجام شد. با سنجش میزان تشکیل بیوفیلم باکتریایی با استفاده از روش کریستال ویوله از مجموع ۱۲ جدایه، ۹ جدایه با میزان قدرت تشکیل بیوفیلم قوی و متوسط جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. استخراج DNA به روش CTAB و شناسایی مولکولی با استفاده از تکثیر ژن ۱۶S rRNA صورت گرفت.

یافته‌ها: در این میان ۵۸/۳٪ جدایه‌ها تشکیل بیوفیلم قوی و ۱۶/۶٪ جدایه‌ها تشکیل بیوفیلم متوسط و ۲۵٪ جدایه‌ها تشکیل بیوفیلم ضعیف را نشان دادند. بر اساس نتایج شاخه‌ی Proteobacteria با ۵۵/۵٪ شاخه‌ی غالب (۴ جنس *Alteromonas*، *Vibrio*، *Salinimonas* و *Pseudoalteromonas*) و پس از آن Firmicutes با ۳۳/۳٪ (۳ جنس *Bacillus*، *Oceanobacillus* و *Fictibacillus*) و Bacteroidetes با ۱۱/۱۱٪ (جنس *Tenacibaculum*) تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: بیوفیلم‌های دریایی تشکیل شده بروی سطوح غوطه‌ور بی‌جان و جاندار، ضمن دارا بودن نقش کلیدی در استقرار لارو بارناکل‌ها و سایر ماکروفولرها، منبع امیدوارکننده‌ای برای رویکردهای ضدفولینگ ایمن و دوستدار محیط زیست و آبزیان می‌باشند.

واژگان کلیدی:

بیوفیلم باکتریایی

چسبندگی زیستی

فولینگ

جنگل حرا

ژن ۱۶S rRNA

*نویسنده مسئول

✉ morteza110110@gmail.com

orcid: 0000-0003-4955-5288

doi: 10.52547/joc.15.57.1

مقدمه

نامطلوب میکروارگانیسم‌هایی چون باکتری‌ها و دیاتومه‌ها (میکروفولر) و پس‌از آن رشد ارگانیسم‌هایی چون بارناکل‌ها (ماکروفولر) در سطح غوطه‌ور می‌گردند [9]. اگر چه بارناکل‌ها به‌عنوان موجودات فیلتر فیدر نقش حیاتی در پاک‌سازی آب در شبکه غذایی حرا دارند، اما هجوم نشست‌های بی‌رویه بارناکل روی تنه و برگ‌ها می‌تواند منجر به مرگ و میر و کاهش باروری حرا، به‌ویژه برای نهال‌ها گردد [10]. بعلاوه فعالیت‌هایی نظیر ایجاد مزارع آبرزی پروری با استقرار ماکروفولرها با محدودیت‌هایی چون، گرفتگی تورها و قفس‌های پرورش آبزبان، اختلال در جریان آب و انسداد تبادل آن، اثرگذاری بر اکسیژن محلول، بر سلامت و رشد آبرزی تأثیر می‌گذارد [9]. بیوفیلم و بیوفولینگ دریایی هزینه‌های بسیار زیادی را به صنایع دریایی تحمیل می‌کنند که برآورد این هزینه در آمریکا به‌طور سالانه ۵/۷ میلیارد دلار برای کنترل بیوفولینگ گزارش شده است [11]. از این‌رو مناطق حرا از حیث اقتصادی، گردشگری، تنوع زیستی و غیره بسیار حائز اهمیت و توجه برای کاربرد ترکیبات ایمن و دوست‌دار محیط زیست می‌باشد، چراکه هرگونه استعمال ترکیبات مضر و مخرب نظیر ترکیبات ضدفولینگ حاوی مس در این منطقه خسارات جبران ناپذیری را به بار خواهد آورد.

شناسایی باکتری‌هایی با بیش‌ترین میزان تشکیل بیوفیلم می‌تواند اولین قدم به‌منظور ارائه‌ی رویکردهای مؤثر برای مقابله با این پدیده باشد. بدین منظور، در پژوهش حاضر، جداسازی و خالص‌سازی چند باکتری تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم قوی و شناسایی مولکولی آن‌ها در منطقه حرا مد نظر است.

روش پژوهش

۱. مواد و روش‌ها

۱-۱ نمونه‌برداری لایه بیوفیلم دریایی

پس از آماده‌سازی یک پنل چوبی به ابعاد ۱۵×۱۵ و به ضخامت ۲ سانتی‌متر، آن را حین جزر به یک درخت حرا در منطقه حرای منطقه خمیر (26°58'34.7"N 55°38'04.3"E)، نصب کرده و جهت تشکیل لایه‌های بیوفیلم باکتریایی به مدت یک شبانه روز مغروق گردید. پس از آن لایه‌ی بیوفیلم از پنل جداسازی شده و به آزمایشگاه انتقال داده شد. بدین منظور، ابتدا سطح پنل با آب دریای استریل شسته و لایه‌های بیوفیلم از سطح آن توسط اسکالپل استریل تراشیده شد و به یک فالكون استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دریا استریل اضافه گردید. فالكون در ظرف یخ نگه‌داری شده و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

۱-۲ جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های دریایی تشکیل‌دهنده‌ی بیوفیلم پس از ورتکس کردن فالكون به مدت ۵ دقیقه، یک میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته شد و به ۹ میلی‌لیتر آب دریا استریل اضافه گردید. بعد از آماده کردن رقت‌های متوالی مختلف (10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3})، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-3} بر روی پلیت حاوی محیط کشت زوبل مرین آگار (ZoBell Marine agar [g L⁻¹: Meat peptone, 5; yeast extract, 1; sea salts, 30; Iron citrate, 0.1; final pH 7.6 ± 0.2]) ریخته و به روش spread (روشی برای شمارش میکروبی یا جداسازی باکتری‌ها) کشت سطحی انجام گرفت. پلیت در

جنگل‌های مانگرو اکوسیستمی ماندابی از اجتماعات ساحلی منحصر به فرد مناطق حاره‌ای می‌باشند که از استوا تا عرض جغرافیایی ۳۰ درجه در نیمکره شمالی و جنوبی گسترش یافته‌اند. جنگل‌های مانگرو از مناطق بارور اکوسیستم‌های ساحلی می‌باشند که خدمات و بهره‌وری‌های اکولوژیک ارزنده‌ای را چون حفاظت ساحل در برابر فرسایش، ایجاد زیستگاه برای جانداران، پشتیبانی زنجیره‌ی غذایی دریا، تأمین منابع غذایی و صیدگاه، ایجاد چشم‌انداز و مناطق تفرجگاهی، تأمین چوب، تأمین مواد دارویی، جذب سیلاب و استخراج نمک برای مردم جهان فراهم می‌آورند. آبراه‌های خوریات و جنگل‌های مانگرو از مناطق تغذیه‌ای، نوزادگاهی و حفاظتی آبزبان محسوب می‌شوند به‌طوری که صید مستقیماً به این منطقه مرتبط می‌باشد و به موجب این مهم از اهمیت بالایی برخوردارند [1, 2]. تخریب و از بین رفتن جنگل‌های مانگرو سبب کاهش تنوع زیستی و نابودی مناطق نوزادگاهی می‌شود که این مسئله به نوبه خود منجر به تحت تأثیر قرار دادن مناطق مجاور خواهد شد [3, 4].

جنگل مانگرو خلیج فارس در کشور ایران از حیاتی‌ترین اکوسیستم‌های جهان محسوب می‌شود که وسعت آن در رتبه دهم آسیا و چهل و سوم جهان قرار دارد [5]. جنگل‌های مانگرو که سواحل جنوبی خلیج فارس را پوشش می‌دهند دارای عنوان رایج «جنگل‌های حرا» تحت سلطه‌ی گیاه *Avicennia marina* می‌باشد که بنام درخت «حرا» شناخته می‌شود [6]. تالاب بین‌المللی حرای خورخوران با وسعت ۱۰۲۰۶۶/۴ هکتار در حد فاصل بین بندر خمیر و جزیره قشم واقع شده است. تالاب مذکور در سال ۱۹۷۵ میلادی به‌عنوان تالاب بین‌المللی در کنوانسیون رامسر به ثبت رسیده است. تالاب در درون خوری وسیع از جنگل‌های حرا و خورهای کوچک‌تر قرار گرفته که بزرگ‌ترین اکوسیستم جنگلی حرا در ایران را تشکیل می‌دهند. بیش از ۱۲۰ گونه پرنده مانند انواع حواصیل، اگرت ساحلی، سلیم خرچنگ‌خوار، صدف خوار، عقاب ماهیگیر، کرکس مصری، عقاب تالابی، پلیکان پاخاکستری و غیره از انواع پرندگان این تالاب است. همچنین از دیگر زیست‌مندان مهم این منطقه می‌توان به لاک‌پشت دریایی پوزه عقابی، لاک‌پشت دریایی سبز و انواعی از پستانداران دریایی اشاره نمود [7].

چسبندگی زیستی در صنعت آبرزی پروری یکی از موانع پیچیده و پرهزینه می‌باشد که نگرانی قابل توجهی ایجاد کرده است. چسبندگی زیستی دریایی که معمولاً تحت عنوان بیوفولینگ دریایی بیان می‌شود، به تجمع، چسبیدن و رشد میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران بر روی سطوح مختلف غوطه‌ور در آب دریا گفته می‌شود. این سطوح شامل بسترهای طبیعی غیر زنده (مانند سنگ، چوب و صخره‌های مرجانی)، بسترهای مصنوعی (مانند سازه‌های دریایی، بدنه‌ی کشتی‌ها، قایق‌ها، خط لوله‌ها) و همچنین بدن موجودات زنده و گیاهان می‌باشد [8]. در محیط‌های آبی، سلول‌های میکروبی به مواد مغروق می‌چسبند و واکنش‌های معدنی شدن را آغاز می‌نمایند. سلول‌های تثبیت شده رشد می‌کنند و پلی‌مرهای خارج سلولی را بنام بیوفیلم دریایی تولید می‌کنند. بیوفیلم‌های دریایی به آسانی سطح سازه‌های انسانی و طبیعی را اشغال می‌کنند و باعث تسریع در روند رشد

کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل به نسبت ۲۴:۱ به میکروتیوب اضافه کرده و پس از آن مخلوط حاضر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. در این مرحله مایع رویی با احتیاط به میکروتیوب جدید منتقل شد و به همان میزان ایزوپروپانول اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سپس با احتیاط مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب حاوی DNA ۱۰۰ میکرولیتر اتانول خالص سرد اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. سپس میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و دوباره محلول رویی دور ریخته شد و مرحله‌ی خالص‌سازی DNA توسط اتانول ۳ مرتبه تکرار گردید. در آخر پس از خشک شدن پلت DNA به میزان ۷۰ میکرولیتر بافر TE به آن اضافه گردید و محلول DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد جهت PCR نگه‌داری شد.

۱-۶ تکثیر ژن ۱۶S rRNA

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از آغازگر عمومی -5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' (Bac8f) و (3') و (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 1492r صورت گرفت [16]. آماده‌سازی مخلوط واکنش PCR از مواد مورد نیاز طبق جدول ۱، اجرا شد. سپس میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده و برنامه دمایی طبق جدول ۲ تنظیم گردید. در آخر برای بررسی کیفیت محصول PCR با استفاده از دستگاه الکتروفورز، آن را به ژل ۱٪ آگارز در بافر TAE^۲ منتقل کرده و بعد از اعمال ولتاژ مناسب (۹۰ ولت) به مدت ۲۰ دقیقه، موقعیت باندها توسط ژل داک عکس برداری شد.

جدول ۱. مقادیر مواد مورد نیاز آماده‌سازی مخلوط واکنش PCR

ردیف	مواد	مقادیر
۱	۱۲/۵ میکرولیتر	PCR Master Mix ^۳
۲	۱۰/۵ میکرولیتر	آب PCR
۳	۰/۵ میکرولیتر	آغازگر رفت
۴	۰/۵ میکرولیتر	آغازگر برگشت
۵	۱ میکرولیتر	نمونه DNA باکتری

جدول ۲. برنامه زمانی ترموسایکلر برای ژن ۱۶S rRNA

ردیف	تعداد چرخه (تکرار)	مرحله	دما (°C)	زمان
۱	۱	واسرشت اولیه	۹۶	۳ دقیقه
۲		واسرشته سازی	۹۴	۴۵ ثانیه
۳	۳۵	اتصال آغازگر	۵۲	۹۰ ثانیه
۴		گسترش آغازگر	۷۲	۱ دقیقه
۵	۱	طویل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه

دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (۲۴ ساعت تا ۳ روز) انکوبه شده و سپس کلنی‌های باکتریایی با ویژگی‌های مورفولوژیکی مختلف، به پلیت‌های حاوی محیط کشت مرین آگار جدید، انتقال داده شدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون از باکتری اولیه که ممکن است بخواهیم برای کوتاه مدت یا بلند مدت از آن نگهداری کنیم، از جدایه‌های تخلیص شده در محیط زویل مرین برات کشت تازه داده شد و در نهایت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در محیط حاوی گلیسرول ۵۰٪، نگهداری گردید [12].

۳-۱ تعیین میزان تشکیل بیوفیلم باکتری‌های جدایه شده

بررسی میزان قدرت تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ته صاف انجام گردید. بدین منظور، ابتدا سوبه‌های مورد نظر به محیط کشت مرین برات اضافه شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این مرحله کدورت با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر بر روی تراکم جذب ۰/۱۳-۰/۰۸ تنظیم شد (معادل 10^8 CFU/ml). متعاقباً رقیق سازی ۱ به ۱۰۰ سوسپانسیون برای مرحله بعد آماده گردید. سپس به‌منظور تشکیل بیوفیلم روی سطوح میکروپلیت، به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، فاز رویی تخلیه شده و چاهک‌ها سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن چاهک‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله (۰/۰۲٪) به هر چاهک اضافه گردید. بعد از ۱۵ دقیقه، به‌منظور خروج رنگ اضافی، چاهک‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند. در نهایت، ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۹٪ به هر چاهک اضافه شده و جذب هر چاهک در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر قرائت شد [13].

۱-۴ سنجش میزان تشکیل بیوفیلم

وضعیت قدرت تشکیل بیوفیلم در چاهک‌ها طبق فرمول زیر محاسبه گردید که در آن ODC میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل و OD میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار می‌باشد [14]. این آزمایش برای هر باکتری به‌صورت ۳ بار تکرار صورت پذیرفت.

$$\text{عدم تشکیل بیوفیلم} = \text{OD} \leq \text{ODC}$$

$$\text{قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف} = \text{ODC} < \text{OD} \leq (2 \times \text{ODC})$$

$$\text{قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط} = (2 \times \text{ODC}) < \text{OD} \leq (4 \times \text{ODC})$$

$$\text{قدرت تشکیل بیوفیلم قوی} = (4 \times \text{ODC}) < \text{OD}$$

۱-۵ استخراج DNA باکتری‌های منتخب

استخراج DNA باکتری با بهره‌گیری از روش متداول CTAB صورت گرفت [15]. به‌طور خلاصه به میزان یک لوب از تک کلنی کشت یک شبه باکتری به میکروتیوب ۱/۵ ml حاوی ۶۰۰ میکرولیتر بافر CTAB^۱ انتقال داده شد. پس از اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر مرکاپتواتانول، میکروتیوب‌ها به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر

^۳ Tris-HCl pH 8.5, (NH₄)₂SO₄, 3 mM MgCl₂, 0.2% Tween 20, 0.4 mM dNTPs, 0.2 units/μL Tag DNA polymerase [REDiant 2X PCR Master Mix, Denmark]

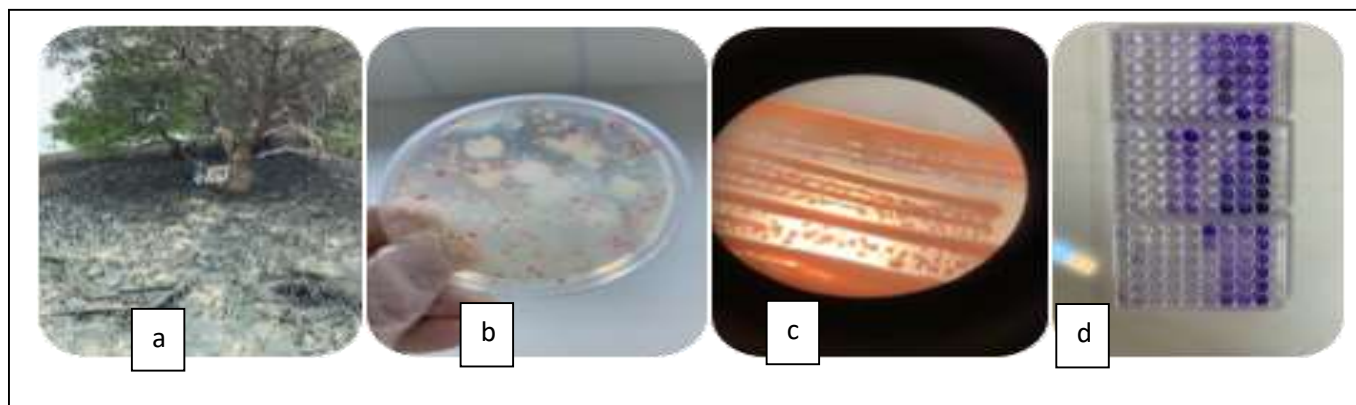
^۱ 100 mL CTAB buffer: 10 mL Tris 1M, 28 mL NaCl 5M, 4mL EDTA 0.5M, 2g Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide [CTAB], 1g PVP, and 58 mL ddH₂O

^۲ 1L TAE: 4.84g Tris, 1.142 mL acetic acid, 0.372g EDTA, pH 8

۷-۱ آنالیز مولکولی

درخت فیلوژنتیکی، توالی‌ها با استفاده از CLUSTAL W در نرم افزار BioEdit هم‌تراز شدند [17]. رابطه فیلوژنی جدایه‌ها با یکدیگر به صورت درخت فیلوژنی با روش حداکثر احتمال (ML) با بوت استرپ ۱۰۰۰ توسط نرم‌افزار raxmlGUI (v.2.0) ترسیم گردید [18]. درخت فیلوژنی توسط نرم افزار FigTree version 1.4.2 مورد مطالعه و ویرایش قرار گرفت (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree) شاخه‌های با حمایت بوت استرپ زیر ۵۰٪ مورد چشم پوشی واقع شد.

پس از انجام PCR، محصول PCR توالی‌یابی شد. نتایج توالی نوکلئوتیدها با نرم افزار Chromas مجدداً بررسی و ویرایش گردید. پس از ویرایش خوانش‌های توالی رفت و برگشت هر باکتری، توالی‌ها با هم ادغام شده و یک توالی واحد برای هر باکتری ایجاد شد. سپس توالی‌ها با سایر توالی‌های ۱۶S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از BLAST N مقایسه شد. در ادامه برای رسم



شکل ۱. تصاویری از نمونه برداری (A)، جداسازی (B)، خالص سازی (C) و سنجش میزان بیوفیلیم (D).

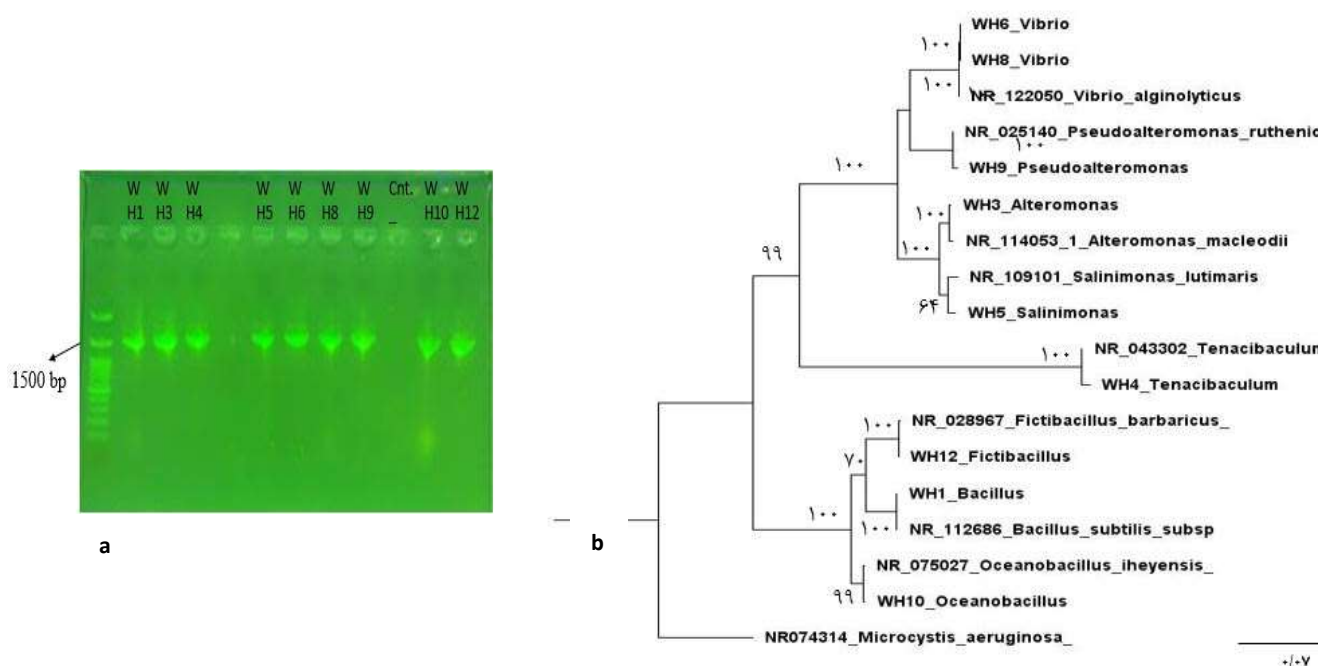
جدول ۳. میزان قدرت تشکیل بیوفیلیم توسط جدایه‌های خالص سازی شده

WH1	WH2	WH3	WH4	WH5	WH6	WH7	WH8	WH9	WH10	WH11	WH12	جدایه‌های باکتریایی
++	+	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	++	قدرت تشکیل بیوفیلیم

بیوفیلیم ضعیف (+)، بیوفیلیم متوسط (++) و بیوفیلیم قوی (+++).

جدول ۴. شناسایی باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلیم بر اساس ژن ۱۶S rRNA برای هر سویه بر پایه پایگاه داده NCBI

درصد تشابه	شماره دسترسی	نزدیکترین سویه در پایگاه داده NCBI	طول توالی (bp)	جدایه‌های منتخب	
۱۰۰	NR_112686.1	<i>Bacillus subtilis</i>	۱۴۱۴	WH1	۱
۹۸/۶۴	NR_114053.1	<i>Alteromonas macleodii</i>	۱۴۰۱	WH3	۲
۹۸/۸۵	NR_043302.1	<i>Tenacibaculum litoreum</i>	۱۳۹۳	WH4	۳
۹۷/۹۰	NR_109101.1	<i>Salinimonas lutimaris</i>	۱۴۰۰	WH5	۴
۹۹/۷۲	NR_122050.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	۱۴۱۹	WH6	۵
۹۹/۵۱	NR_122050.1	<i>Vibrio alginolyticus</i>	۱۴۲۲	WH8	۶
۹۸/۹۳	NR_025140.1	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	۱۳۹۷	WH9	۷
۹۹/۷۲	NR_075027.1	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	۱۴۳۱	WH10	۸
۹۹/۵۸	NR_028967.1	<i>Fictibacillus barbaricus</i>	۱۴۱۵	WH12	۹



شکل ۲. محصول PCR باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی در مقایسه با مارکر 100bp+3K (a). درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی ژن S 16rRNA (سویه‌های باکتری‌های مورد مطالعه و توالی‌های مرجع در GeneBank، اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش bootstrap (۱۰۰۰) می‌باشد. از باکتری *Microcystis aeruginosa* strain NIES-843 (NR074314) به عنوان outgroup استفاده شد (b).

شاخه‌ی Proteobacteria با ۵/۵۵٪ شاخه‌ی غالب و پس از آن Firmicutes با ۳/۳۳٪ و Bacteroidetes با ۱۱/۱۱٪ تشخیص داده شد (جدول ۴). در شاخه غالب Proteobacteria، ۴ جنس *Pseudoalteromonas* و *Vibrio*، *Salinimonas*، *Alteromonas*، شناسایی گردید. همچنین در شاخه Firmicutes، ۳ جنس *Bacillus*، *Oceanobacillus* و *Fictibacillus* شناسایی گردید. و در آخر تنها جنس متعلق به شاخه Bacteroidetes، مربوط به *Tenacibaculum* می‌باشد.

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۲ و درخت فیلوژنی (شکل ۲)، سویه WH1 با ۱۰۰٪ تشابه گونه‌ی *Bacillus subtilis* تشخیص داده شد. همچنین WH9 با ۹۸/۹۳٪ تشابه متعلق به گونه‌ی *Pseudoalteromonas ruthenica* و WH10 با ۹۹/۷۲٪ تشابه متعلق به گونه‌ی *Oceanobacillus iheyensis* می‌باشد. بر اساس نتایج به دست آمده از BLAST سایر سویه‌ها در پایگاه داده NCBI، درصد تشابه هر سویه با بیش از یک گونه از جنس مورد نظر مشاهده گردید، بنابراین سویه‌های مذکور در حد جنس شناسایی گردید (جدول ۵، شکل ۲).

نتایج و بحث

پس از رقت‌سازی نمونه بیوفیلم برداشت شده از محیط، از رقت 10^{-3} جهت کشت در پلیت و جداسازی و متعاقباً خالص‌سازی جدایه‌ها استفاده گردید (شکل ۱، a-b). در این مرحله ۱۲ جدایه بر اساس ریخت‌شناسی ظاهری با استفاده از میکوسکوپ استریو لوپ، جهت به حداقل رساندن تشابه، خالص‌سازی گردید (شکل ۱، c).

۱۲ جدایه حاصل از جداسازی و خالص‌سازی نهایی، مورد سنجش میزان توانایی تشکیل بیوفیلم قرار گرفت که در تمامی آنها توانایی تشکیل لایه‌ی بیوفیلم در ۳ سطح ضعیف، متوسط و قوی مشاهده گردید (شکل ۱، d). در این میان ۳/۵۸٪ جدایه‌ها شامل WH3، WH4، WH5، WH6، WH8، WH9 و WH10 تشکیل بیوفیلم قوی و ۱۶/۶٪ جدایه‌ها شامل WH1 و WH12 تشکیل بیوفیلم متوسط و ۲۵٪ جدایه‌ها شامل WH2، WH7 و WH11 تشکیل بیوفیلم ضعیف را نشان دادند (جدول ۳). در ادامه جهت مطالعات مولکولی و شناسایی باکتری‌ها از جدایه‌های واجد توانایی تشکیل بیوفیلم قوی و متوسط استفاده گردید و جدایه‌های مربوط به تشکیل بیوفیلم ضعیف از ادامه مطالعه حذف گردید.

سویه‌های باکتری با استفاده از ژن 16S rRNA بر اساس پایگاه داده NCBI مورد شناسایی قرار گرفتند. سویه‌ها در این مطالعه متعلق به ۴ شاخه مجزا می‌باشند. بر اساس نتایج خاص از توالی‌یابی سویه‌های جداسازی شده،

جدول ۵. کد دسترسی ژن بانک توالی‌های DNA مربوط به سویه‌های باکتری

مانند مس و آلومینیوم در محیط دریا همراه است [24]. مس دارای اثرات منفی بر موجودات غیر هدف یعنی آبزیان می‌باشد. غلظت نسبتاً کم مس برای ماهی‌ها مضر بوده و عوارض گوناگون سمیت آن در مطالعات مختلف گزارش شده است [25]. این مسئله باعث شده که در سال‌های اخیر تقاضا برای تولید ترکیبات ضدفولینگ بر پایه‌ی ترکیبات طبیعی، که ضمن سازگاری با محیط زیست به لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه باشند، افزایش یابد. در این راستا مطالعه تنوع میکروارگانیسم‌های دریایی به‌عنوان قدم اول در تشکیل بیوفولینگ به درک بهتر راهکارهای ایمن ضدفولینگ منجر خواهد شد.

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر، *Proteobacteria* بیشترین سهم را از باکتری‌های جداسازی شده به خود اختصاص داده‌اند و *Firmicutes* و *Bacteroidetes* به ترتیب کمترین میزان از باکتری را دارا می‌باشند. در راستای تأیید نتایج مذکور، *Salta* و همکاران (۲۰۱۳) عنوان کردند که باکتری‌های گروه *Proteobacteria*، اصلی‌ترین گروه باکتریایی شناسایی شده به‌عنوان باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم معرفی شده‌اند، همچنین *Acidobacteria*، *Actinobacteria*، *Bacteroidetes*، *Firmicutes*، *Planctomycetes* و غیره درصد بسیار کمتری از این‌گونه باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند. بعلاوه بیشترین گروه فیلوژنتیکی باکتریایی از گروه *Proteobacteria* به‌طور غالب به *Alteromonadales* و سپس *Vibrionales* اشاره شده که پراکنش جهانی نیز دارند [26]. این گزارش با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم راستا و تأییدکننده می‌باشد.

مطالعات زیادی در زمینه گزارش باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی در محیط‌های مختلف صورت گرفته است. باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Vibrio alginolyticus* از جمله باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی گزارش شده‌اند [27, 28]. مطالعات نشان داده است که اعضای گروه *Proteobacteria* به‌عنوان فراوان‌ترین گروه‌های هتروتروف دریایی، به‌راحتی قابل کشت بوده که همین قابلیت کشت آسان را می‌توان از دلایل غالبیت آن نیز برشمرد [29]. از طرفی گونه‌های *Vibrio* یکی از شناخته شده‌ترین گونه‌های تشکیل دهنده بیوفیلم معرفی شده‌اند که این فراوانی به علت سازگاری بالا با تغییرات پارامترهای اکوسیستم آبی و میزبان آنها می‌باشد که متعاقباً نقش بسزایی را در بقا و استعمار آنها ایفا کرده است [30]. در مطالعه حاضر نیز ۲ سویه از ۹ سویه جداسازی شده متعلق به گونه‌ی *Vibrio* تشخیص داده شد. همچنین جنس *Pseudoalteromonas* نیز متعلق به گروه *Proteobacteria* در بسیاری از اقیانوس‌های جهان یافت می‌شود. جنس *Pseudoalteromonas* شامل گونه‌های دریایی متعددی است که استقرار و دگردیسی لاروی را در بی‌مهرگان دریایی متنوع از جمله اسفنج‌ها، نرم تنان، خرچنگ‌ها، بریوزوآها، انلیدها و آسیدین‌ها تحریک و امکان‌پذیر می‌کند [31]. *Tenacibaculum maritimum* باکتری گرم منفی و رشته‌ای از شاخه *Bacteroidetes*، به‌عنوان بیماری ایجاد زخم تناسیباکتوزیس^۱ در ماهیان دریایی شناخته شده است که می‌تواند به دلیل استراتژی‌های بالقوه زیستشان نظیر توانایی

ردیف	کد سویه	نام‌گذاری انجام شده	کد دسترسی ژن بانک
۱	WH1	<i>Bacillus subtilis</i>	MZ298732
۲	WH3	<i>Alteromonas sp.</i>	MZ298733
۳	WH4	<i>Tenacibaculum sp.</i>	MZ298734
۴	WH5	<i>Salinimonas sp.</i>	MZ298735
۵	WH6	<i>Vibrio sp.</i>	MZ298736
۶	WH8	<i>Vibrio sp.</i>	MZ298737
۷	WH9	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	MZ298738
۸	WH10	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	MZ298739
۹	WH12	<i>Fictibacillus sp.</i>	MZ298740

نتیجه‌گیری

بیوفولینگ یا چسبندگی زیستی و رشد بیوفیلم بر سازه‌های ساخت بشر و همچنین سطوح طبیعی (زنده و بی‌جان) تأثیر می‌گذارند. بسیاری از گونه‌های مختلف ماکروفلورها و میکروفولورها را می‌توان بر روی بسترهای دریایی، از جمله شبکه‌های آبی پروری، خطوط لوله نفت و گاز، و بدنه کشتی‌ها (مانند جلبک‌ها، بارناکل‌ها و صدف‌ها) مشاهده کرد. در حقیقت باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم دریایی جوامعی از باکترهای قابل کشت و غیرقابل کشت را نشان می‌دهند. در روش کشت مبتنی بر محیط کشت مرین زوبل (مورد استفاده در مطالعه حاضر)، تنها بخشی از گروه‌های باکتریایی و نه کل جامعه میکروبی کشت داده می‌شود.

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم با استفاده از میکروپلیت، روشی جامع و مقبول جهت تعیین کمیت چسبندگی سویه‌های مختلف باکتریایی بر اساس چگالی نوری محاسبه شده و مقدار میانگین آن می‌باشد که می‌توان قابلیت چسبندگی باکتری‌ها را به سه دسته باکتری‌های سازنده بیوفیلم چسبنده قوی، متوسط یا ضعیف تقسیم کرد [19].

باکتری‌های دریایی تشکیل دهنده بیوفیلم و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) نقش بسیار مهمی در اتصال و نشست لارو بارناکل شناور به سطوح دارند [20]. بر اساس مطالعات، لایه‌ی بیوفیلم دریایی از سلول‌های زنده (از جمله میکروارگانیسم‌ها) و سلول‌های مرده و همچنین EPS تشکیل شده است [21]. EPS تولید شده توسط باکتری‌ها حاوی موادی چون پلی‌ساکارید، اسید نوکلئیک، لیپید و پروتئین می‌باشد و واجد خواص فیزیکوشیمیایی ویژه بوده که کاربردهای فراوانی در صنایع دارد [22]. میکروارگانیسم‌های دریایی در EPS تولید شده می‌توانند بروی طیف وسیعی از بسترها، به‌واسطه‌ی واکنش‌های شیمیایی پیچیده و اتصالات محکم، فیکس و ثابت شوند. EPS یک ماده قوی و چسبناک است که در صورت اتصال غیرقابل برگشت می‌باشد [23]. بنابراین، ممکن است راهکارهای رسوب زدایی بیوفولینگ از سطوح با چالش‌هایی مواجه گردد. رنگ‌های ضدفولینگ حاوی مس با عملکرد کاهش خوردگی آهن، تنها تکنولوژی ضدفولینگ است که امروزه به‌صورت منحصر به فرد قابل استفاده است. عملکرد این رنگ‌ها به‌عنوان ضدفولینگ با آزادسازی مداوم ترکیبات سمی،

¹ Tenacibaculosis

منابع

- [1]. Bonecker, F.T.; Castro, M.; Bonecker, A.T., (2009). Larval fish assemblage in a tropical estuary in relation to tidal cycles, day/night and seasonal variations. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2): 239-46.
https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Bonecker+FT%2C+Castro+M%2C+Bonecker+AT.+Larval+fish+assemblage+in+a+tropical+estuary+in+relation+to+tidal+cycles
- [2]. Faunce, C.H.; Serafy, J.E., (2006). Mangroves as fish habitat: 50 years of field studies. *Marine Ecology Progress Series*, 318: 1-18.
<https://www.int-res.com/abstracts/meps/v318/p1-18/>
- [3]. Mumby P.J.; Edwards, A.J., (2004). Ernesto Arias-Gonzalez J, Lindeman KC, Blackwell PG, Gall A, et al. Mangroves enhance the biomass of coral reef fish communities in the Caribbean. *Nature*, 427(6974): 533-6.
<https://www.nature.com/articles/nature02286>
- [4]. Ward, R.D.; Friess, D.A.; Day, R.H.; MacKenzie, R.A., (2016). Impacts of climate change on mangrove ecosystems: a region by region overview. *Ecosystem Health and Sustainability*, 2(4): e01211.
<https://spj.science.org/doi/full/10.1002/ehs2.1211>
- [5]. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018. Meeting the sustainable development goals Rome Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2018.
<https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=HXI-bMvH1mgC&oi=fnd&pg=PR12&dq=FAO.+The+State+of+World+Fisheries+and+Aquaculture+2018.>
- [6]. Ghasemi, S.; Mola, N.; Zakaria, M., (2013). Aboveground Biomass, Litterfall, and Forest Structure in the Mangroves of Hormozgan Province, Iran. *Natural Areas Journal*, 33: 339-343.
<https://bioone.org/journals/Natural-Areas-Journal/volume-33/issue-3/043.033.0312/Aboveground-Biomass-Litterfall-and-Forest-Structure-in-the-Mangroves->
- [7]. Dadashi, M.; Ghaffari, S.; Bakhtiari A.R.; Tauler R., (2018). Multivariate curve resolution of organic pollution patterns in mangrove forest sediment from Qeshm Island and Khamir Port-Persian Gulf, Iran. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(1): 723-35.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-017-0450-z>
- [8]. Yebra, D.M.; Kiil, S.; 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.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300944003001644>
- [9]. Sathe, P.; Laxman, K.; Myint, M.T.Z.; Dobretsov, S.; Dutta, J.R.J., (2017). Bioinspired nanocoatings for biofouling prevention by photocatalytic redox reactions. *Scientific Reports*, 7(1): 1-12.
<https://www.nature.com/articles/s41598-017-03636-6>
- [10]. Wong, J.Y., (2014). Effects of biofilm and gastropod grazing on barnacle cyprid settlement in a mangrove rehabilitation site, Sg. Besar, Selangor, Malaysia/Wong Jin Yung: University of Malaya.
<http://studentsrepo.um.edu.my/4915/>
- [11]. Rajitha, K.; Nancharaiah, Y.V.; Venugopalan, V.P., (2020). Insight into bacterial biofilm-barnacle larvae interactions for environmentally benign antifouling strategies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 149: 104937.
- تشکیل بیوفیلم باشد [32]. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ۱۶S rRNA، WH4 متعلق به *Tenacibaculum* sp. تشخیص داده شد که توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم از خود نشان داده است. Kavita و همکاران (۲۰۱۴)، نشان دادند که گونه *Oceanobacillus iheyensis* واجد توانایی مختل کردن بیوفیلم‌های باکتریایی و نیز دارای ویژگی سورفکتانت و امولسیفایر زیستی در EPS خود می‌باشد [33].
- باکتری‌های چسبیده به سطوح، مانند *Bacillus* و *Pseudoalteromonas*، با تشکیل لایه بیوفیلم آگروپلیمری، بستری مناسب برای اتصال ارگانسیم‌های بزرگتر فراهم می‌کنند [34]. اغلب پروتئین‌های سطحی توسط باکتری‌هایی که در اولین مرحله فولینگ بیوفیلم تشکیل می‌دهند، مورد مصرف واقع می‌شود. مواد آگروپلیمری دفع شده توسط این میکروارگانسیم‌ها، آنها را در برابر بیشتر عوامل ضد میکروبی مقاوم می‌کند و متعاقباً این پدیده به آنها اجازه می‌دهد حتی روی سطوح حاوی مواد ضد فولینگ نیز زنده بمانند [35].
- بمنظور توسعه راه‌حل‌های جدید جهت تولید مواد ضد فولینگ ایمن و دوستدار محیط زیست دریایی، شناسایی و مطالعه‌ی عملکرد باکتری‌های دریایی تشکیل دهنده بیوفیلم به‌عنوان اولین مرحله از ایجاد پدیده فولینگ از اهمیت بسیار بالایی برخوردارند چراکه فولینگ باعث مشکلات عملیاتی شدید و هزینه‌های اقتصادی در صنایع کشتیرانی، بندری و آبی‌زی پروری می‌گردند. جنگل‌های حرا در ایران با توجه به اکوسیستم غنی از مواد مغذی، به‌عنوان یک منطقه حفاظت شده طبقه‌بندی می‌شود که واجد تنوع زیستی بسیار غنی است. اگرچه فعالیت ماهیگیری در این مناطق بسیار رواج دارد، اما پدیده فولینگ یکی از عواملی است که ماهیگیران را به مصرف محصولات ضد فولینگ سوق می‌دهد. در نتیجه، مناطق حفاظتی دریایی می‌توانند با اطمینان از استفاده از رنگ ضد فولینگ غیر سمی، آلودگی را کاهش دهند. از این‌رو، این کار با هدف شناسایی باکتری‌های دریایی تشکیل دهنده بیوفیلم بر روی پل چوب در منطقه جنگل حرا انجام شد، چراکه شناسایی آنها درک بهتری از اکولوژی باکتری را ممکن می‌سازد. مطالعه حاضر یکی از چندین گام ضروری در تحقیقات آینده جهت تولید ترکیبات ایمن و زیست تخریب‌پذیر برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، بیوفولینگ و به دنبال آن هزینه‌های وارده بر صنعت و محیط زیست دریایی خواهد بود.

مشارکت نویسندگان

زهرا زارعی جلیانی انجام آزمایش و آنالیزها، نگارش مقاله. مرتضی یوسفزادی طرح آزمایش و راهنمای تحقیق. عدنان شهدادی مشارکت در انجام آنالیزهای مولکولی.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

- <https://academic.oup.com/femsle/article/223/2/287/499525>
[24]. Pérez, M.; García, M.; Blustein, G., (2015). Evaluation of low copper content antifouling paints containing natural phenolic compounds as bioactive additives. *Marine environmental research*, 109: 177-84.
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141113615300131>
[25]. Brooks, S.J.; Bolam, T.; Tolhurst, L.; Bassett, J.; La Roche, J.; Waldock, M.; et al. (2008). Dissolved organic carbon reduces the toxicity of copper to germlings of the macroalgae, *Fucus vesiculosus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 70(1): 88-98. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651307000802>
- [26]. Salta, M.; Wharton, J.A.; Blache, Y.; Stokes, K.R.; Briand, J.F., (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 15: 2879-93. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651307000802>
- [27]. Sillankorva, S.; Neubauer, P.; Azeredo, J., (2008). *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *Bmc Biotechnology*, 8(1): 1-12. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651307000802>
- [28]. Sonak, S.; Bhosle, N., (1995). Observations on biofilm bacteria isolated from aluminium panels immersed in estuarine waters. *Biofouling*, 8(3): 243-54. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08927019509378277>
- [29]. Abouelkheir, S.S.; Abdelghany, E.A.; Ghozlan, H.A.; Sabry, S.A., (2019). Characterization of Biofilm Forming Marine *Pseudoalteromonas* spp. *Journal of Marine Science*, 2(1). <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/84434241/1148libre.pdf?1650335280=&response-content-disposition>
- [30]. Yildiz FH, Visick KL. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends in Microbiology*. 2009; 17(3): 109-18. [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(09\)00023-7](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(09)00023-7)
- [31]. Cavalcanti, G.S.; Alker, A.T.; Delherbe, N.; Malter, K.E.; Shikuma, N.J., (2020). The Influence of Bacteria on Animal Metamorphosis. *Annual Review of Microbiology*, 74: 137-58. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-micro-011320-012753>
- [32]. Levipan, H.A.; Tapia-Cammas, D.; Molina, V.; Irgang, R.; Toranzo, A.E.; Magariños, B.; et al. (2019). Biofilm development and cell viability: An undervalued mechanism in the persistence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture*, 511. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0044848619306283>
- [34]. Bhosale, S.H.; Nagle, V.L.; Jagtap, T.G., (2002). Antifouling potential of some marine organisms from India against species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Marine biotechnology* (New York, N.Y.), 4(2): 111-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10126-001-0087-1>
- [35]. Sánchez-Rodríguez, D.E.; Ortiz-Aguirre, I.; Aguila-Ramírez, R.N.; Rico-Virgen, E.G.; González-Acosta, B.; Hellio, C., (2018). Marine bacteria from the Gulf of California with antimicrofouling activity against colonizing bacteria and microalgae. *Revista de Biología Tropical*, 66(4). https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442018000401649&script=sci_arttext&tlng=en
- <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830519304202>
[12]. Prakash, O.; Nimonkar, Y.; Shouche, Y.S., (2013). Practice and prospects of microbial preservation. *FEMS microbiology letters*, 339(1): 1-9.
- <https://academic.oup.com/femsle/article/339/1/1/496578>
[13]. Choi, N.Y.; Bae, Y.M.; Lee, S.Y., (2015). Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food science and biotechnology*, 24(6): 2257-64. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-015-0301-y> [14]. Stepanovic, S.; Vukovic, D.; Hola, V.; Bonaventura, G.D.; Djukic, S.; Ćirkovic, I.; et al. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, 115(8): 9. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- [15]. Wilson, K., (1989). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current protocols in molecular biology*, 241-5. <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- [16]. Baker, G.C.; Smith, J.J.; Cowan, D.A., (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3): 541-55. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701203002276>
- [17]. Hall, T., (1999). editor BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/29520866/1999hall1-libre.pdf>
- [18]. Edler, D.; Klein, J.; Antonelli, A.; Silvestro, D., (2020). raxmlGUI 2.0: a graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/2041-210X.13512>
- [19]. Kavitha, S.; Vimala, R., (2018). Isolation and characterization of marine biofilm forming bacteria from a ship's hull. *Frontiers in Biology*, 13(3): 208-14. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11515-018-1496-0>
- [20]. Rajitha, K.; Nancharaiiah, Y.V.; Venugopalan, V.P., (2020). Role of bacterial biofilms and their EPS on settlement of barnacle (*Amphibalanus reticulatus*) larvae. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 150. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096483051930887X>
- [21]. Lee, J.W.; Nam, J.H.; Kim, Y.H.; Lee, K.H., (2008). Lee DH. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. *Journal of Microbiology*. 46(2): 174-82. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12275-008-0032-3>
- [22]. Satpute, S.K.; Banat, I.M.; Dhakephalkar, P.K.; Banpurkar, A.G.; Chopade, B.A., (2010). Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28(4): 436-50. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975010000261>
- [23]. Tsuneda, S.; Aikawa, H.; Hayashi, H.; Yuasa, A.; Hirata, A., (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2): 287-92.

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Z., Zarei Jeliani, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, P.O. Box 3995, Bandar Abbas, Iran.

✉ zareizahra92@gmail.com



M., Yousefzadi, Department of Biology, Faculty of Science, University of Qom, Qom, Iran

✉ morteza110110@gmail.com



A., Shahdadi, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, P.O. Box 3995, Bandar Abbas, Iran.

✉ adnan1361@gmail.com



این قسمت توسط نشریه تکمیل می‌گردد:



HOW TO CITE THIS ARTICLE

Citation (Vancouver)

<http://doi.org/10.52547/joc.15.57.1>

<http://joc.inio.ac.ir/article-1-1717-fa.html>

<https://orcid.org/>



COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.