

مقاله پژوهشی

بهینه‌سازی کپسوله کردن تیمول در شبکه پلیمری ژلاتین و کاراگینان و بررسی اثر ضدبیوفیلمی آن در برابر باکتری دریایی *Bacillus sp.*

زهرا زارعی جلیانی^۱، مرتضی یوسف‌زادی^{۲*}، صمد نژادابراهیمی^۳، عدنان شهزادی^۴

DOI: 10.22124/japb.2023.22800.1477

تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۱

چکیده

تیمول ترکیبی فنلی با خواص ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی است که در اسانس برخی گیاهان وجود دارد. هدف از این مطالعه کپسوله کردن تیمول در پلیمرهای طبیعی ژلاتین و کاراگینان است. به منظور بهینه‌سازی کپسوله کردن تیمول، از روش CCD نرم‌افزار طراحی آزمایش استفاده شد. بر اساس تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار بدین گونه به دست آمد: pH برابر با ۶، غلظت تیمول ۰/۴ درصد و نسبت میزان کاراگینان به ژلاتین برابر با ۱ که در این حالت بازده کپسولی، اندازه نانوکپسول و شاخص پراکندگی به ترتیب ۹۱ درصد، ۱۱۲ نانومتر و ۱/۱ به دست آمد. در آزمایش ضد میکروبی مقابل باکتری دریایی *Bacillus sp.* تیمول کپسوله شده میزان کمتری از کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) باکتریایی را نسبت به تیمول بدون کپسول نشان داد. همچنین تیمول کپسوله شده ۷۰ درصد بازدارندگی و ریشه‌کنی بیوفیلیم را در غلظت کمتری نسبت به تیمول خالص نشان داد. به طور کلی، نتایج به دست آمده از این پژوهش، بهبود فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی تیمول نانوکپسوله شده را در برابر باکتری دریایی *Bacillus sp.* نشان داد. این فرمول می‌تواند جایگزین یا کمکی برای کنترل بیوفیلیم در باکتری‌های دریایی به عنوان مرحله اول ایجاد پدیده چسبندگی زیستی پیشنهاد شود.

واژگان کلیدی: تیمول، پلیمر زیستی، کپسوله کردن، طراحی آزمایش، بیوفیلیم.

۱- 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 فیتوشیمی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه

در هفته‌ها یا ماه‌های بعد، فرآیند رسوب با چسبیدن لاروهای بارناکل، ماکروجلبک‌ها و اسپورها ادامه می‌یابد که متعاقباً باعث ایجاد چسبندگی زیستی دریایی ضخیم‌تر می‌شوند. این پدیده به نوبه خود باعث کوچک و بسته شدن سوراخ تورهای ماهیگیری و سنگین شدن آن یا افزایش مقاومت بدنه کشتی می‌شود که منجر به افزایش مصرف سوخت و ایجاد مشکلات اقتصادی قابل توجه دیگر می‌شود (Bannister et al., 2019; Tian et al., 2020). در میکرو بیوفولینگ مانند بیوفیلم دریایی (حاوی سلول‌های زنده و مرده و همچنین ماده پلیمری خارج سلولی (Extracellular Polymeric Substances: EPS) شامل پلی ساکارید، پروتئین و DNA)، لاروها و اسپورهای متصل به مواد پیوسته منجر به خوردگی و آسیب سطحی می‌شوند. در حال حاضر، روش‌های اصلی برای حذف بیوفولینگ روی سطوح و سازه‌های مغروق انسان ساخت دریایی، شامل مواد و رنگ‌های شیمیایی و عملیات پرهزینه فیزیکی است. روش‌های شیمیایی معمولاً شامل زیست‌کش‌های سمی یا مواد شیمیایی هستند که می‌توانند از طریق آسیب به ساختار سلولی، میکروارگانیسم‌ها را از بین ببرند. با این حال،

چسبندگی زیستی دریایی که معمولاً تحت عنوان بیوفولینگ دریایی بیان می‌شود، به تجمع، چسبیدن و رشد میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران بروی سطوح مختلف غوطه‌ور در آب دریا گفته می‌شود. بیوفولینگ یا چسبندگی زیستی دریایی با وجود منافع بسیار برای پاکسازی دریا و منابع غذایی آبزیان، نگرانی قابل توجهی در افزایش هزینه‌ها برای صنایع صید و کشتی‌رانی ایجاد کرده است. به طور کلی چسبندگی زیستی به عنوان کلونیزاسیونی ناخواسته و در حال رشد بر سطح سازه‌های مغروق همراه با چسبندگی میکروارگانیسم‌ها و سپس ماکروارگانیسم‌ها شناخته می‌شود. در برخی منابع پدیده چسبندگی زیستی فرآیندی متوالی دارای چهار مرحله اصلی گزارش شده است: (۱) جذب ذرات آلی و مواد محلول در آب بر روی سطح مغروق از اولین ثانیه پس از غوطه‌ور شدن. (۲) ورود مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌های متحرک در ۲۴ ساعت اول، تولید بیوفیلم و تشکیل میکروفولینگ. (۳) استقرار اسپور ماکروجلبک‌هایی مانند (Ulvophyceae. ۴) استقرار لاروهای بی‌مهرگان (مانند سیپرید بارناکل و دوکفه‌ای) (Rajitha et al., 2020; Tian et al., 2020).

ژلاتین، کاراگینان، کیتوزان و یا پلیمرهای غیرزیستی اندیشیده شده است تا ضمن پایدار کردن این ترکیبات، به سبب اندازه ریزشان، نفوذ بهتر ماده موثره رخ دهد (Hsieh et al., 2006; Wattanasatcha et al., 2012). ژلاتین از پلیمرهای زیستی با منشا دریایی و غیردریایی است که از هیدرولیز حرارتی کلاژن، پروتئین عمده بافت پیوندی جانوران، به دست می‌آید. این پلیمر زیستی ارزشمند و بسیار کاربردی به واسطه قابلیت تولید ژل، خاصیت چسبندگی، شفاف کنندگی و قوام دهندگی در زمینه‌های متعدد از جمله صنایع غذایی، دارویی و کپسوله کردن ترکیبات زیست‌فعال کاربرد وسیعی دارد (Gilsenan and Ross- Murphy, 2000). کاراگینان‌ها، از تعداد محدودی از جلبک‌های قرمز مانند *Hypnea* و *Kappaphycus* با حدود نیمی از تولید کاراگینان جهانی، به دست می‌آیند (Zarei et al., 2021). انواع کاراگینان‌ها طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی چون آنتی‌کسیدان، ضدفساد و گندیدگی، ضدانعقاد، ضدسرطان، ضدلختگی و غیره را نشان می‌دهند که استفاده بسیار در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی دارند (Holdt and Kraan, 2011; Mak et al., 2013).

ضمن به دنبال داشتن آلودگی زیست‌محیطی آب دریا، اگر برای مدت طولانی استفاده شوند، منجر به مقاومت دارویی میکروارگانیسم‌ها نیز می‌شود (Ludensky, 1998).

تاکنون تیمول و کارواکرول به عنوان فعال‌ترین مونوترپنوئیدها شناسایی شده‌اند. ترپنوئیدها فعالیت ضد میکروبی در برابر انواع عوامل بیماری‌زا از خود نشان داده‌اند که توسط بسیاری از پژوهشگران مورد مطالعه قرار گرفته است. تیمول جزء اصلی روغن آویشن است که از نظر ساختاری شبیه کارواکرول بوده و دارای گروه هیدروکسیل بر روی حلقه فنلی است. در حالی که این گونه ترکیبات به عنوان عوامل ضد میکروبی بسیار مورد مطالعه و تایید قرار گرفته‌اند، بهره‌گیری از آنها در محیط با محدودیت‌هایی روبه‌رو است. از جمله مشکلات استفاده مستقیم از اسانس‌های گیاهی و مشتقات آن، می‌توان به تمایل حل شدن در چربی و ترکیب سریع با چربی و پروتئین موجود در محیط و کاهش کارایی ضد میکروبی آن و نیز قابلیت اکسیداسیون بالا اشاره کرد. به سبب مقابله با این مشکلات و افزایش بهره‌وری از این ترکیبات، تدابیری چون ساخت نانو و میکرومولسیون‌های حاوی اسانس یا کپسوله کردن این ترکیبات با پلیمرهای زیستی چون

و کاراگینان در مقابل باکتری دریایی *Bacillus* sp. (FNI, KHM 123) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه تیمول کپسوله شده در شبکه پلیمری کاراگینان- ژلاتین

ابتدا کاراگینان، ژلاتین و تیمول با خلوص ۹۹ درصد (Merck، آلمان) و توپین ۸۰ (Sigma، آمریکا) تهیه شد. در این آزمایش برای کپسوله کردن تیمول در شبکه پلیمری کاراگینان (به عنوان تولید کننده بار منفی) و ژلاتین (به عنوان تولید کننده بار مثبت)، سه مرحله کلی بر اساس روش ژل‌سازی یونی به کار گرفته شد (Da Silva Carvalho et al., 2019).

مرحله اول: برای تهیه محلول کاراگینان (مقادیر ۰/۱، ۰/۱۷، ۰/۵۸، ۱ و ۱/۲۸ درصد نسبت به میزان ژلاتین)، پس از توزین مقدار تعیین شده و افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط روی هیتراستیرر با گرمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۴۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا محلول شفاف شود. سپس توپین ۸۰ (مشابه غلظت تیمول) بتدریج به محلول اضافه شد و اجازه داده شد تا کاملاً حل شود.

به منظور کاهش اثرات ناخوشایند و مخرب حیات دریایی بر اثر استفاده از ترکیبات شیمیایی ضدفولینگ، برای مقابله یا حذف لایه بیوفیلم به عنوان اولین مرحله از تشکیل فولینگ زیستی، دانشمندان درصدد بهره‌گیری از ترکیبات زیستی با الهام از طبیعت هستند تا بتوانند ضمن حفاظت از موجودات غیرهدف و جلوگیری از تخریب محیط زیست دریایی، رویکردی برای قطع فرآیند فولینگ در مراحل اولیه ارائه دهند.

در مطالعه حاضر، کاراگینان معمولی از نوع کاپا که دارای پیوندهای سولفات کمتر و استفاده بیشتر در تولیدات هستند، به عنوان پلی‌ساکاریدی برای تثبیت ژلاتین انتخاب شد. سپس تیمول به این سیستم برای کپسوله کردن آن وارد شد و سورفکتانت توپین ۸۰ برای کمک به آن اضافه شد تا بدین ترتیب یک نانوسیستم پایدار با لایه بیرونی بار منفی به دست آید. علاوه بر این، تاثیر مقادیر مختلف pH، غلظت تیمول و نسبت میزان کاراگینان به ژلاتین بر بازده کپسولی و اندازه آن مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه با توجه به اهمیت شایان توجه موضوع بیوفیلم و بیوفولینگ، در پژوهش حاضر فعالیت ضدبیوفیلم ترکیب زیست‌فعال تیمول نانوکپسوله شده در شبکه پلیمری ژلاتین

محلول رویی هر فرمولاسیون در طول موج ۲۷۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانش شد. در این راستا از محلول رویی آزمایش بدون تیمول به عنوان شاهد استفاده شد. با کمک منحنی استاندارد تهیه شده از تیمول و رابطه ۱ میزان درصد بازده کپسولی محاسبه شد (Ghaderi et al., 2021).

رابطه ۱:

$$EE(\%) = [(T_T - T_F) / T_T] \times 100$$

T_T : میزان کل تیمول (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)؛ T_F : میزان تیمول آزاد در محلول رویی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر).

برای رسم منحنی استاندارد، سری رقعی تیمول (۰/۰۹-۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با استفاده از حلال اتانول ساخته شد. پس از خوانش جذب نوری در طول موج ۲۷۷ نانومتر نمودار منحنی استاندارد در نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 ترسیم شد. در ادامه غلظت نمونه‌های تیمول نانوکپسوله با معادله خط استاندارد $y = 11/077x + 0/0165$ ($R^2 = 0/9955$) محاسبه شد.

سنجش اندازه نانوکپسول و شاخص پراکندگی اندازه ذرات به واسطه طیف‌سنجی همبستگی فوتون و حرکت براونی ذرات

پس از سرد شدن محلول به دست آمده، تیمول (مقادیر ۰/۰۹۷، ۰/۲، ۰/۳۵، ۰/۵ و ۰/۶ درصد حجم کل) بتدریج اضافه شد و اجازه داده شد تا امولسیون شیری رنگ یک‌دستی حاصل آید. در ادامه با اعمال سونیک پروب به مدت ۱۰ دقیقه (۱ ثانیه روشن و ۴ ثانیه خاموش) و قدرت ۷۰ درصد نانوامولسیون تیمول به دست آمد.

مرحله دوم: برای تهیه محلول ژلاتین (بر

اساس مقادیر نسبتی کاراگینان)، پس از توزین مقدار تعیین شده و افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط روی هیتر استیرر با چرخش ۴۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا محلول شفاف به دست آید. در ادامه pH محلول تنظیم شد (۲/۶، ۴، ۶/۶، ۸ و ۱۰).

مرحله سوم: محلول ژلاتین به صورت قطره

قطره به نانوامولسیون تیمول تحت استیرر ۱۰۰۰ دور در دقیقه اضافه شد تا تیمول در شبکه پلیمری کپسوله شود.

محاسبه میزان درصد بازده کپسولی

برای بررسی مقدار بازده کپسولی (Encapsulation Efficiency: EE) تیمول،

۱ میلی‌لیتر از هر یک از فرمولاسیون‌ها سانتریفیوژ شد (به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه). جذب نوری

تولید کننده بیوفیلیم *Bacillus* sp. (FNI, KHM 123) تهیه شده از آزمایشگاه علوم دریایی هرمزگان، استفاده شد. برای کشت باکتری‌های دریایی از محیط کشت مارین زوبل (ZoBell Marine Agar) استفاده شد که به ازای هر لیتر میزان پپتون گوشت ۵ درصد، عصاره مخمر ۱ درصد، نمک دریا ۳۰ درصد، سیترات آهن ۰/۱ درصد و pH نهایی برابر با ۷/۶ بود (ZoBell, 1941).

تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی رشد و کمترین غلظت کشندگی تیمول و تیمول نانوکپسوله شده بهینه

این بخش، بر اساس استانداردهای ارائه شده توسط (CLSI Clinical Laboratory Standard Institute)، انجام شد. برای تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی رشد (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) از روش رقت‌سازی در پلیت ۹۶ خانه ته گرد استفاده شد. محیط کشت مورد استفاده، مارین زوبل براث و مراحل انجام کار به شرح زیر بود:

سری رقتی از تیمول خالص و تیمول نانوکپسوله شده تهیه شد (۰/۸-۰/۰۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با حجم نهایی ۱۰۰

شاخص پراکندگی، Polydispersity Index: (PDI) به کمک دستگاه پراش دینامیکی نور (Dynamic Light Scattering: DLS)، (Malvern, Zetasizer Nano ZS انگلستان) اندازه‌گیری شد. سوسپانسیون نانوکپسوله بدون اعمال رقت‌سازی برای سنجش اندازه ذرات مورد استفاده قرار گرفت. دمای سل ۱۹/۴۱ درجه سانتی‌گراد، حلال آب و ویسکوزیته ۱/۰۱۷۰ در نظر گرفته شد. اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق، به صورت سه بار تکرار و بر اساس قطر حجم میانگین کپسول‌ها گزارش شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM

میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscopy) برای مشاهده ویژگی‌های ریختی تیمول نانوکپسوله شده از میکروسکوپ الکترونی FE-SEM (TESCAN, MIRA3)، (چک) استفاده شد. نمونه قبل از عکس‌برداری با روکش طلا آماده‌سازی شد.

شرایط کشت سویه باکتری دریایی *Bacillus* sp.

برای انجام آزمایش‌های مربوط به سنجش خواص ضدباکتری و ضدبیوفیلیم تیمول و نانوکپسوله منتخب، از سویه باکتری دریایی

بررسی اثر بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم تیمول و تیمول نانوکپسوله شده بهینه به منظور بررسی اثر بازدارندگی (Biofilm Inhibition Assay) تشکیل بیوفیلم تیمول و فرمولاسیون بهینه از پلیت ۹۶ خانه ته صاف و روش کریستال ویوله استفاده شد. ابتدا چاهک‌ها با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مارین براث پر شدند، سپس سری رقتی از تیمول و فرمولاسیون مورد بررسی در چاهک‌ها تهیه شد (۰/۴-۰/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر). در ادامه، سوسپانسیونی را که از کشت تازه باکتری تهیه و کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تنظیم شده بود (معادل 10^8 واحد CFU در میلی‌لیتر)، به نسبت ۱:۱۰۰ با مارین زوبل براث رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. پلیت در انکوباتور در دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. چاهک مربوط به شاهد مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده باکتری بود. پس از ۲۴ ساعت انکوبه، محتوی همه چاهک‌ها به آرامی تخلیه و دو مرتبه توسط آب مقطر شستشو داده شد. برای تثبیت بیوفیلم باکتری، پلیت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵

میکرولیتر). سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری تهیه و کدورت آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ تنظیم شد (معادل 10^8 واحد CFU در میلی‌لیتر). این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ با مارین زوبل براث رقیق شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک منتقل شد. با اضافه شدن سوسپانسیون باکتری، غلظت نهایی ماده مورد بررسی در هر چاهک نصف شد. پس از انکوبه شدن در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، چاهک‌ها از لحاظ داشتن کدورت بررسی شدند و کمترین غلظت مهار کننده رشد تعیین و بر اساس میلی‌گرم در میلی‌لیتر ثبت شد. به علاوه، شاهد‌ها شامل شاهد منفی (چاهک حاوی تنها ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع) و شاهد مثبت (چاهک حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون رقیق شده باکتری) بود. در ادامه برای تعیین (Minimum Bactericidal Concentration) یعنی کمترین غلظتی از ماده مورد بررسی که سبب کشندگی باکتری می‌شود، به میزان ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون چاهک مربوط به MIC و چاهک غلظت‌های بالاتر از آن بروی محیط جامد کشت داده شد.

مراحل رنگ‌آمیزی و خوانش همانند مراحل بازدارندگی تشکیل بیوفیلم اجرا شد (Ghaderi et al., 2021).

طراحی آزمایش

برای بهبود بازده فرآیند، تعداد آزمایش کمتر، بررسی برهم‌کنش متقابل متغیرها و نتیجتاً دستیابی به نقطه بهینه کپسوله کردن تیمول در شبکه پلیمری کاراگینان- ژلاتین از روش طراحی آزمایش استفاده شد. بر این اساس، برای تحلیل آماری داده‌ها و بهینه‌سازی آن با استفاده از طراحی مرکب مرکزی (CCD) ۲۰ سری آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری Design Expert 13 طراحی شد. در این راستا ۲۰ مورد با ۳ متغیر و در ۵ سطح طراحی آزمایش شد. همچنین ۲ عامل درصد بازده کپسولی و اندازه نانوذره به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. متغیرهای طراحی شده در جدول ۱، آورده شده است. در کلیه آزمایش‌ها میزان نسبت تیمول به توپین ۸۰، یک در نظر گرفته شد.

بررسی آماری داده‌ها

ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 و Design Expert 13 صورت

دقیقه قرار داده شد. در ادامه به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۰/۲ درصد افزوده شد و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در مجاورت این رنگ و دمای اتاق قرار گرفت. بعد از تخلیه رنگ و سه مرتبه شستشو با آب مقطر، پلیت در دمای محیط خشک شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۰ درصد به هر چاهک اضافه و بخوبی پیمتاژ شد. در نهایت توسط دستگاه الایزایدر جذب همه چاهک‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۰ درصد به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. آزمون به صورت شش بار تکرار صورت گرفت (Ghaderi et al., 2021).

برای بررسی ریشه‌کنی (Biofilm Eradication Assay) بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری با استفاده از تیمول و نانوکپسول آن، ابتدا به مدت ۲۴ ساعت پلیت ۹۶ خانه حاوی باکتری (رقت ۱:۱۰۰ استاندارد نیم‌مک فارلند) در انکوباتور برای تشکیل بیوفیلم در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس تحت شرایط استریل از ماده ضدبیوفیلم (با غلظت نهایی ۰/۲۵-۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و اجازه داده شد که ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور بماند. در ادامه

گرفت. همچنین از نرم‌افزار Design Expert 13 برای طراحی آزمایش و مطالعات بهینه‌سازی با روش آماری سطح پاسخ استفاده شده است. آزمایش‌های بهینه‌سازی عوامل موثر بر کپسوله کردن تیمول توسط پلیمرهای ژلاتین و کاراگینان با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) انجام شد. در این پژوهش، متغیرهای تاثیرگذار منتخب، pH، غلظت تیمول و نسبت کاراگینان به ژلاتین، در پنج سطح +۱، ۰، -۱، $-\alpha$ و $+\alpha$ به صورتی که در جدول ۱ ارائه شده است مورد مطالعه قرار گرفت. بر این اساس، با استفاده از طرح مرکب مرکزی (CCD) ۲۰ سری آزمایش طراحی شد. در این سری آزمایش‌ها مقادیر بازده کپسولی و اندازه نانوکپسول به عنوان متغیرهای سطح پاسخ در نظر گرفته شدند.

نتایج

مقادیر متغیرها و پاسخ‌های آزمایش‌های بهینه‌سازی در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌طور که از نتایج این جدول مشاهده می‌شود کمترین و بیشترین مقدار بازده کپسولی بین دو میزان ۸۱ و ۹۵ درصد و اندازه نانوکپسول بین دو مقدار ۹۲ و ۲۹۸ نانومتر متغیر بود. برای بررسی تعیین و تایید موثر بودن اثرات اصلی و برهمکنش بین متغیرها، آزمون تحلیل واریانس انجام شد. مقدار p برای مدل طراحی شده برای هر دو متغیر پاسخ کمتر از ۰/۰۵ و مقدار F در جدول تحلیل واریانس نشان دهنده تاثیر بیشتر متغیرها با سطح اطمینان ۹۵ درصد بود که دلالت بر صحت مدل پیشنهادی دارد (جدول‌های ۳ و ۴).

جدول ۱: متغیرهای روش طراحی مرکب مرکزی و سطوح کد شده

سطح‌ها					نماد	متغیرها
$+\alpha$	+۱	۰	-۱	$-\alpha$		
۱۰	۸	۶/۵	۴	۲/۶	A	pH
۰/۶	۰/۵	۰/۳۵	۰/۲	۰/۰۹۷	B	غلظت تیمول (% W/V)
۱/۲۸	۱	۰/۵۸	۰/۱۷	۰/۱	C	نسبت کاراگینان به ژلاتین (%)

جدول ۲: نتایج طراحی آزمایش‌های بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار طراحی آزمایش CCD

پاسخ ۲	پاسخ ۱	متغیر ۳	متغیر ۲	متغیر ۱	Run	استاندارد
(nm) NCS	(%) EE	(CRG/Gel) C	(تیمول) B	(pH) A		
۱۴۲	۹۰	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۱	۱۵
۱۸۲	۹۵	۱	۰/۵	۸	۲	۸
۹۲	۹۱/۵	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۳	۱۹
۱۴۲	۹۰	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۴	۱۷
۱۲۳	۸۸	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۲/۶	۵	۹
۲۴۰	۹۰/۵	۰/۵۸۵	۰/۶۰۲۲۶۹	۶/۵	۶	۱۲
۱۵۹	۹۴	۱	۰/۵	۴	۷	۷
۱۲۰	۸۴	۰/۲	۰/۲	۴	۸	۱
۱۹۸	۸۸	۰/۲	۰/۵	۴	۹	۳
۱۴۲	۸۹	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۱۰	۱۰	۱۰
۱۳۹	۸۷	۱	۰/۲	۴	۱۱	۵
۹۲	۹۱/۵	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۱۲	۱۸
۱۳۷	۹۲	۱	۰/۲	۸	۱۳	۶
۱۴۲	۹۰	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۱۴	۱۶
۱۰۷	۸۳	۰/۵۸۵	۰/۰۹۷۷۳۱۱	۶/۵	۱۵	۱۱
۲۲۴	۸۱	۰/۱	۰/۳۵	۶/۵	۱۶	۱۳
۹۲	۹۳	۰/۵۸۵	۰/۳۵	۶/۵	۱۷	۲۰
۱۴۷	۹۴	۱/۲۸۲۹۴	۰/۳۵	۶/۵	۱۸	۱۴
۱۷۱	۸۳	۰/۲	۰/۲	۸	۱۹	۲
۲۹۸	۸۹	۰/۲	۰/۵	۸	۲۰	۴

CRG/Gel: نسبت کاراگینان به ژلاتین؛ EE: بازده کپسولی؛ NCS: اندازه نانو کپسول.

جدول ۳: تحلیل واریانس مدل پیشنهادی برای پاسخ بازده کپسولی

	p-value	F-value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source
significant	< .0001	17/27	75/17	3	225/51	Model Linear model R1= EE%
	.03226	1/04	4/53	1	4/53	A-pH
	.00006	17/90	77/88	1	77/88	B-Thymol
	< .0001	32/87	143/04	1	143/04	C-CRG/Gel
			4/35	16	69/62	Residual
not significant	.0773	3/77	5/65	11	62/12	Lack of Fit
			1/50	5	7/50	Pure Error
				19	295/14	Cor Total

جدول ۴: تحلیل واریانس مدل پیشنهادی برای پاسخ اندازه نانوکپسوله

	p-value	F-value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source
significant	.0010	8/86	5238/61	9	47147/48	Model Quadratic model R2= Size
	.0594	4/52	2673/24	1	2673/24	A-pH
	.0003	28/66	16939/72	1	16939/72	B-Thymol
	.0025	16/06	9493/18	1	9493/18	C-CRG/Gel
	.2875	1/26	746/11	1	746/11	AB
	.0692	4/14	2449/53	1	2449/53	AC
	.0685	4/17	2463/37	1	2463/37	BC
	.4456	.06305	372/72	1	372/72	A²
	.0095	10/24	6056/24	1	6056/24	B²
	.0013	19/39	11464/32	1	11464/32	C²
			591/15	10	5911/47	Residual
not significant	.0720	.05764	432/29	5	2161/47	Lack of Fit
			750/00	5	3750/00	Pure Error
				19	53058/95	Cor Total

فرآیند کپسوله شدن تیمول را توسط شبکه پلیمری کاراگینان و ژلاتین توصیف می‌کند. نتایج تحلیل واریانس مدل، متغیرهای اصلی و برهم‌کنش متغیرها در جدول‌های ۳ و ۴ نشان می‌دهد که متغیرهای اصلی B و C از لحاظ آماری روی فرآیند پاسخ‌های بازده کپسولی و اندازه نانوکپسول تاثیرگذار بودند. به علاوه متغیرهای B^2 و C^2 بر فرآیند اندازه نانوکپسول اثرگذاری معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$).

از آنجایی که بر اساس نتایج جدول‌های ۳ و ۴ تحلیل واریانس متغیر pH واجد اثر معنی‌داری تشخیص داده نشد ($P > 0.05$), برای ترسیم نمودار سه بعدی برهم‌کنش متغیرها، میزان pH ثابت در نظر گرفته شد ($pH=6$). همان‌طور که از نمودارهای شکل ۲ مشخص است با افزایش میزان غلظت تیمول و افزایش نسبت کاراگینان به ژلاتین، میزان بازده کپسولی افزایش یافت. همچنین با قرار گرفتن میزان غلظت تیمول و نسبت کاراگینان به ژلاتین در حد میانه، کاهش اندازه نانوکپسول مشاهده شد (شکل ۲). در نتیجه، بر اساس نتایج به دست آمده مشخص شد که شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار Design expert 13، به این صورت است: pH ۶، غلظت تیمول ۰/۴ درصد (وزنی- حجمی) و نسبت کاراگینان به ژلاتین ۱

مقادیر R_2 برای پاسخ بازده کپسولی برابر با ۰/۷۶ و برای پاسخ اندازه ذره برابر با ۰/۸۹ بود که بیانگر توانایی پیش‌بینی خوب مدل پیشنهادی برای مقادیر تجربی آزمایش یاد شده است. بنابراین مستندات مدل پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار برای هر یک از پاسخ‌ها به صورت زیر تعریف شد:

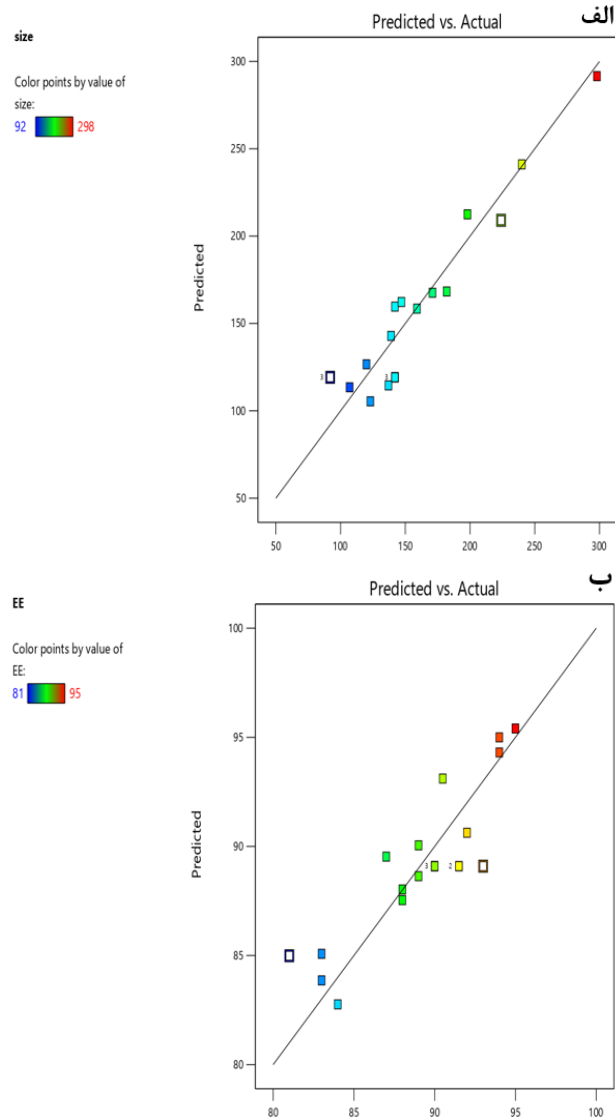
$$R1 (EE\%) = 76.7941 + 0.273721A + 15.9204B + 8.4598C$$

$$R2 (Size) = 115.605 + 13.3452A + 35.5468B + (-30.3581)C + 9.53473AB + (-17.9707)AC + (-18.2006)BC + 4.34297A^2 + 20.5266B^2 + 35.9617C^2$$

با توجه به معادله پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار برای پاسخ‌های بازده کپسولی و اندازه نانوکپسول، متغیر B یا به عبارتی متغیر تیمول با داشتن بالاترین ضریب، بیشترین اثر را بر سطح پاسخ دارد، به طوری که با افزایش غلظت تیمول میزان بازده کپسولی و نیز اندازه نانوکپسول افزایش می‌یابد.

در بیان کارآمدی مدل، شکل ۱ انحراف داده‌های تجربی از داده‌های پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد که با توجه به نزدیکی بیشتر داده‌های تجربی به خط ترسیم شده، می‌توان نتیجه گرفت که معادله ارائه شده به خوبی

که در این صورت میزان بازده کپسولی ۹۳ شد. در ادامه این فرمول بهینه برای آزمایش‌های تکمیلی انتخاب و مورد اجرا قرار گرفت. درصد و اندازه نانوکپسول ۱۳۰ نانومتر خواهد



شکل ۱: مقایسه مقادیر تجربی و پیش‌بینی شده به منظور ارزیابی کارآمدی مدل. الف) اندازه نانوکپسول. ب) بازده کپسولی (EE).

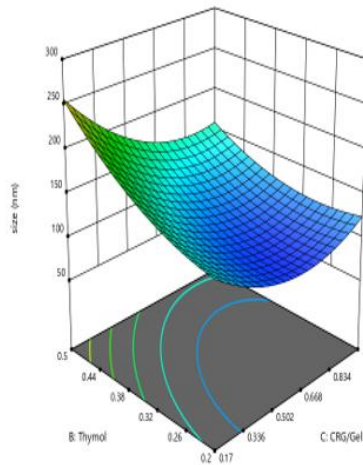
Factor Coding: Actual

3D Surface **الف**

size (nm)
92 290

X1 = C
X2 = B

Actual Factor
A = 6



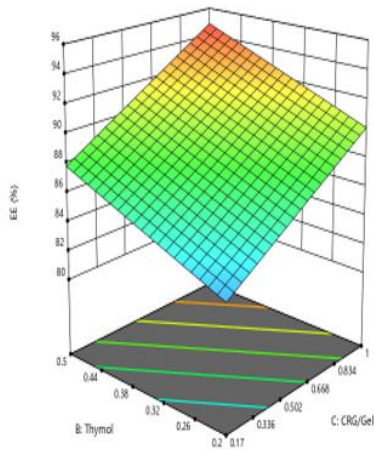
Factor Coding: Actual

3D Surface **ب**

EE (%)
81 95

X1 = C
X2 = B

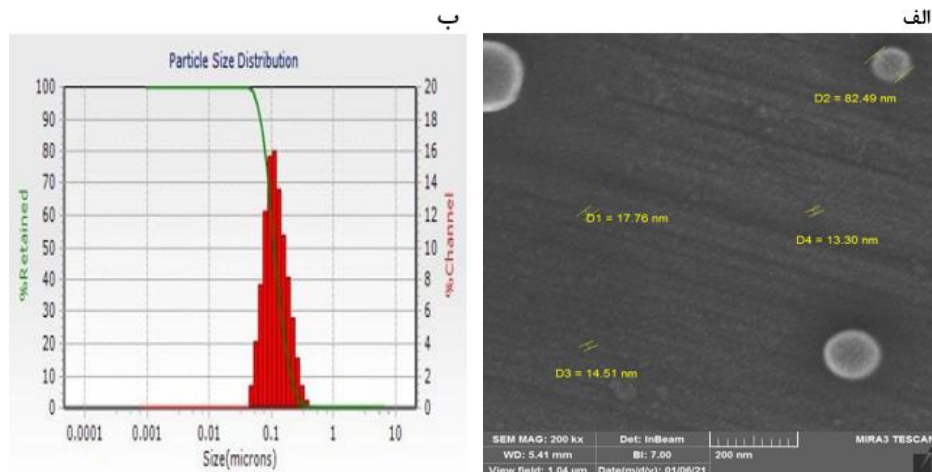
Actual Factor
A = 6



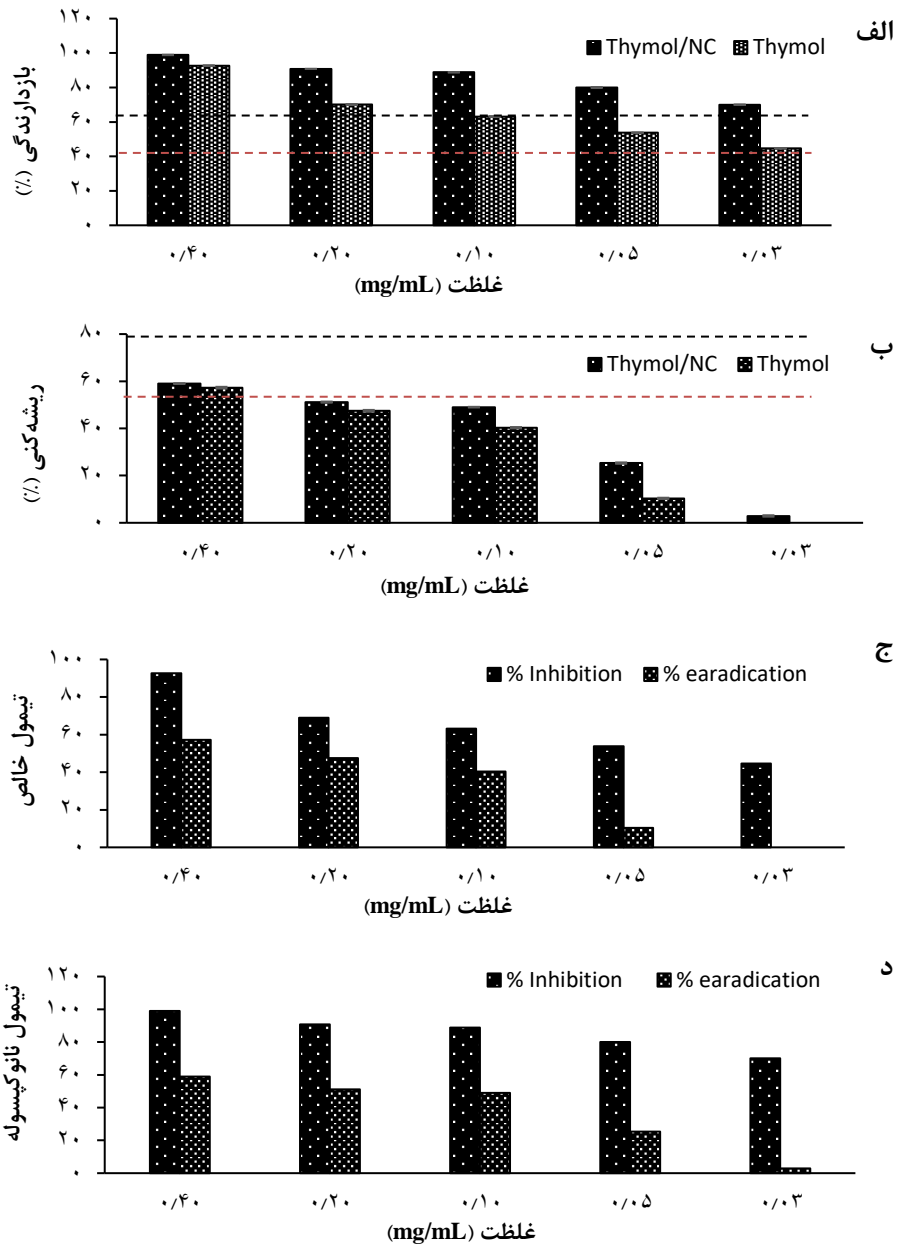
شکل ۲: نمودارهای سه بعدی برهم‌کنش مقدار غلظت تیمول (درصد، جرمی حجمی) و نسبت کاراگینان به ژلاتین (درصد) بر الف) اندازه نانوکپسول و ب) بازده کپسولی.

نتایج مربوط به آزمون تعیین میزان درصد بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم توسط فرمول بهینه تیمول نانوکپسول و تیمول خالص در شکل ۴ آورده شده است. همان طور که از نتایج نمودارهای الف و ب در شکل ۴ مشخص است درصد بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم توسط تیمول نانوکپسوله شده در غلظت مشابه با تیمول خالص به طور قابل توجهی بیشتر بود و این به آن معنا است که تیمول نانوکپسوله شده در غلظت کمتری قادر به بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *Bacillus* بود.

بر اساس نتایج مشهود در شکل ۳، فرمول بهینه خروجی نرم‌افزار Design expert از نظر عملی و اجرا در آزمایشگاه نتایج مشابه را حاصل کرد. تصویر FE-SEM نانوکپسول تهیه شده، اندازه و توزیع اندازه نانوکپسول در شکل ۳ آورده شده است. تصویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشان داد که کپسول‌های تشکیل شده همگی کروی شکل واجد سطح صاف و دارای اندازه کمتر از ۱۲۰ نانومتر هستند. به علاوه، بر اساس نتایج به دست آمده به کمک دستگاه پراش دینامیکی نور، اندازه ذره ۱۱۲ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات ۱/۱ و بازده کپسولی ۹۱ درصد محاسبه شد.



شکل ۳: ریخت‌شناسی و توزیع تیمول نانوکپسوله بهینه. الف) تصویر FE-SEM. ب) نمودار توزیع حجم میانگین.



شکل ۴: اثر تیمول خالص و نانوکپسوله شده بر بیوفیلم باکتری *Bacillus sp.* (میانگین \pm انحراف معیار). الف) درصد بازدارندگی تشکیل بیوفیلم. ب) درصد ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلم. ج) مقایسه درصد بازدارندگی

و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلیم در مقابل تیمول خالص. د) مقایسه درصد بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلیم در مقابل تیمول نانوکپسوله.

نمودارهای ج و د در شکل ۴، نمایانگر اثرگذاری بیشتر تیمول خالص و نیز تیمول نانوکپسوله شده بر فرایند بازدارندگی تشکیل بیوفیلیم باکتری *Bacillus* است. همچنین میزان درصد بازدارندگی و ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلیم توسط باکتری *Bacillus* با کاهش غلظت ماده موثره نانوکپسول تیمول و نیز تیمول خالص سیر نزولی را نشان داد. نتایج مربوط به آزمون تعیین میزان کمترین غلظت بازدارندگی رشد و کشندگی باکتری *Bacillus* با استفاده از تیمار تیمول خالص و تیمول نانوکپسوله شده در جدول ۵ آورده شده است. همان طور که از نتایج مشهود است تیمار تیمول نانوکپسوله شده در غلظت کمتری در مقایسه با تیمول خالص به بازدارندگی رشد و نیز کشندگی باکتری رسید و اثرگذاری قوی‌تری را برجای گذاشت. همچنین ۷۰ درصد بازدارندگی تشکیل بیوفیلیم در غلظت ۰/۰۲۵ تیمول نانوکپسوله و در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تیمول خالص صورت گرفت. در صورتی که ۵۰ درصد ریشه‌کنی تشکیل بیوفیلیم برای تیمول نانوکپسوله و تیمول خالص به ترتیب در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رخ داد.

بحث

یکی از اهداف این پژوهش بررسی اثر دو پلیمر ژلاتین (بار سطحی مثبت) و کاراگینان (بار سطحی منفی) بر پایداری فیزیکی تیمول نانوکپسوله شده است.

جدول ۵: نتایج مربوط به اثر تیمول خالص و نانوکپسوله شده بر تشکیل بیوفیلیم باکتری *Bacillus sp.*

ریشه‌کنی		بازدارندگی		MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	آزمایش‌های زیستی
۵۰٪ (mg/mL)	۷۰٪ (mg/mL)	۵۰٪ (mg/mL)	۷۰٪ (mg/mL)			
۰/۲	>۰/۴	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۲	۰/۲	تیمول نانوکپسوله
۰/۴	>۰/۴	۰/۰۵	۰/۲	۰/۴	۰/۳	تیمول خالص

MIC: کمترین غلظت بازدارندگی رشد باکتری؛ MBC: کمترین غلظت کشندگی باکتری.

در مطالعه حاضر امولسیون تهیه شده بدون پلی ساکارید آنیونی کاراگینان (نانوامولسیون ژلاتین/تیمول) حالت شفاف و رقیقی نشان داد که به راحتی نور از آن رد می‌شد. افزودن کاراگینان باعث افزایش کدورت و اندازه ذرات سیستم شد. نقش کاراگینان در سیستم قابل توجه بود، زیرا نمونه فاقد کاراگینان هنگامی که برای مدت کوتاهی (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) به حال سکون قرار می‌گرفت، ته‌نشینی و دوفاز شدن پدید می‌آمد، که موید عدم توانایی توپین ۸۰ به تنهایی در تثبیت ژلاتین است. افزودن کاراگینان با بار منفی منجر به تثبیت الکترواستاتیکی و فضایی با دفع ذرات پروتئینی مجاور و جلوگیری از تجمع می‌شود (Sun et al., 2020). نتایج به دست آمده در مطالعه

در مطالعه حاضر امولسیون تهیه شده بدون پلی ساکارید آنیونی کاراگینان (نانوامولسیون ژلاتین/تیمول) حالت شفاف و رقیقی نشان داد که به راحتی نور از آن رد می‌شد. افزودن کاراگینان باعث افزایش کدورت و اندازه ذرات سیستم شد. نقش کاراگینان در سیستم قابل توجه بود، زیرا نمونه فاقد کاراگینان هنگامی که برای مدت کوتاهی (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) به حال سکون قرار می‌گرفت، ته‌نشینی و دوفاز شدن پدید می‌آمد، که موید عدم توانایی توپین ۸۰ به تنهایی در تثبیت ژلاتین است. افزودن کاراگینان با بار منفی منجر به تثبیت الکترواستاتیکی و فضایی با دفع ذرات پروتئینی مجاور و جلوگیری از تجمع می‌شود (Sun et al., 2020). نتایج به دست آمده در مطالعه

در مطالعه حاضر امولسیون تهیه شده بدون پلی ساکارید آنیونی کاراگینان (نانوامولسیون ژلاتین/تیمول) حالت شفاف و رقیقی نشان داد که به راحتی نور از آن رد می‌شد. افزودن کاراگینان باعث افزایش کدورت و اندازه ذرات سیستم شد. نقش کاراگینان در سیستم قابل توجه بود، زیرا نمونه فاقد کاراگینان هنگامی که برای مدت کوتاهی (۳۰ تا ۶۰ دقیقه) به حال سکون قرار می‌گرفت، ته‌نشینی و دوفاز شدن پدید می‌آمد، که موید عدم توانایی توپین ۸۰ به تنهایی در تثبیت ژلاتین است. افزودن کاراگینان با بار منفی منجر به تثبیت الکترواستاتیکی و فضایی با دفع ذرات پروتئینی مجاور و جلوگیری از تجمع می‌شود (Sun et al., 2020). نتایج به دست آمده در مطالعه

بر اساس نتایج ارائه شده در راستای آزمون آماری اثر متغیر pH بر میزان بازده کپسولی و نیز اندازه ذره، اثر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴). در حالی که بر پایداری فیزیکی سیستم پس از گذشت سکون حداکثر تا ۷۲ ساعت اثرات قابل مشاهده‌ای دیده شد. برای بررسی بهتر اثر pH بر روی سیستم تیمول نانوکپسوله شده در شبکه پلیمری ژلاتین- کاراگینان، نانوسیستم‌ها پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت تحت pHهای مختلف مورد آزمایش قرار

بر اساس نتایج ارائه شده در راستای آزمون آماری اثر متغیر pH بر میزان بازده کپسولی و نیز اندازه ذره، اثر معنی‌داری مشاهده نشد (جدول‌های ۳ و ۴). در حالی که بر پایداری فیزیکی سیستم پس از گذشت سکون حداکثر تا ۷۲ ساعت اثرات قابل مشاهده‌ای دیده شد. برای بررسی بهتر اثر pH بر روی سیستم تیمول نانوکپسوله شده در شبکه پلیمری ژلاتین- کاراگینان، نانوسیستم‌ها پس از ۲۴ تا ۷۲ ساعت تحت pHهای مختلف مورد آزمایش قرار

برای آماده‌سازی نمونه SEM باعث ایجاد تجمع و نیز گزارش اندازه‌های متنوع‌تری در یک سیستم شود (Patel et al., 2010). علاوه بر این، رسوب الکترواستاتیکی بین کاراگینان و ژلاتین می‌تواند منجر به تجمع نانوذرات پیچیده شود.

توانایی غربالگری ترکیبات ایمن و دوست‌دار محیط زیست با خاصیت ضدبیوفیلمی بالقوه به عنوان اولین مرحله از پیشگیری فرایند چسبندگی زیستی در برابر میکروارگانیسم‌ها، شانس کشف سرنخ‌هایی را برای توسعه بیشتر افزایش می‌دهد. به دلیل ماهیت مقاومت عفونت‌های مرتبط با بیوفیلیم، مطالعات بسیاری فعالیت تیمول را در برابر سلول‌های باکتریایی و قارچی بی‌حرکت و متصل به سطوح مورد بررسی قرار داده‌اند. Braga و همکاران (۲۰۰۸) مشاهده کردند که تیمار *Candida albicans* توسط تیمول (پس از ۶ ساعت انکوبه) ۴۵/۱ درصد از بیوفیلیم بالغ تولید شده را کاهش داد. همچنین Dalleau و همکاران (۲۰۰۸) عنوان کردند که تیمول (همچنین کارواکرول و ژرانیول) بیشترین تاثیر را در کاهش (۸۰ درصد از مهار توده بیوفیلیم) توسعه بیوفیلیم تولید شده توسط *C. albicans* داشت. در مطالعه Kang و همکاران (۲۰۱۸)، میزان ۷۰ درصد

گرفتند، زیرا اثر pH روی این سیستم‌ها ممکن است شامل یونیزاسیون باشد که روندی کند و آهسته دارد. در غلظت‌های پایین کاراگینان اثر pH محسوس نبود، در حالی که با توجه به تاثیر pH بر حالت یونی سیستم، هر چه میزان کاراگینان در سیستم بیشتر شد، تاثیر pH نیز بیشتر شد. به طور کلی pH زیر ۵، باعث کاهش بار سطحی منفی کاراگینان شده که این پدیده منجر به ناپایداری شد و آنگاه که pH بین ۶ و ۷ تنظیم شد پایداری چشمگیری پدید آمد. نتایج برخی مطالعات تاییدی بر یافته‌های حاضر است (Hu et al., 2015; Sun et al., 2020).

میزان بازده کپسولی داروها شاخص مهمی برای ارزیابی عملکرد بارگیری داروها است. با توجه به محدودیت فضا و اندازه ذرات، افزودن بیش از حد دارو باعث افزایش سرعت بارگذاری نمی‌شود و ممکن است منجر به ناپایداری کل نانوسیستم شود. ابعاد نشان داده شده در شکل ۳ تا حدودی با ابعاد اندازه‌گیری شده با استفاده از دستگاه پراش دینامیکی نور متفاوت است. این تفاوت به دلیل تفاوت ذاتی در تشخیص اندازه ذرات بین دستگاه پراش دینامیکی نور و میکروسکوپ الکترونی است و آرایش فشرده ذرات به دلیل جاذبه‌های آگریز بین ذرات است که می‌تواند به راحتی در طول خشک کردن

دخیل در ساخت پروتئین‌های غشای خارجی را مشاهده کردند. تیمول همچنین مسیر متابولیک سیترات را مختل می‌کند که در نهایت بر ساخت ATP تاثیر می‌گذارد (Di Pasqua et al., 2010).

در یک مطالعه Raei و همکاران (۲۰۱۷) اثرات کارواکرول و تیمول را بر تشکیل بیوفیلم و فعالیت ضد میکروبی در برابر انواع مختلف باکتری‌های گرم منفی باسیلی تولید کننده کارباپنماز (Carbapenemase) مورد بررسی قرار دادند. آنها مقاومت ضد میکروبی را با روش رقت آگار و اثر ضد بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت و رنگ آمیزی با کریستال ویولت بررسی کرده و مشاهده کردند که تیمول و کارواکرول اثرات ضد باکتریایی به ترتیب از ۲۰۰ تا ۱۶۰۰ و ۶۲ تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر دارند، و اثر ضد بیوفیلمی را نیز به ترتیب از ۱۲۵ تا ۵۰۰ و ۴۰۰ تا ۱۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش کردند. این یافته نشان می‌دهد که کارواکرول و تیمول می‌توانند در کنترل عفونت‌های باکتریایی گرم منفی تولید کننده کارباپنماز استفاده شوند و پتانسیل تولید داروهای گیاهی برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها را دارند. علاوه بر این، اثرات ضد بیوفیلمی آنها نشان داد که کارواکرول و تیمول از

بازدارندگی تشکیل بیوفیلم باکتری *Bacillus cereus* توسط اسانس آویشن در غلظت ۳۷۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که تیمول در اسانس آویشن کمتر از ۱۵ درصد گزارش شد. در حالی که، در مطالعه پیش رو بیش از ۷۰ درصد بازدارندگی در تشکیل بیوفیلم توسط باکتری دریایی *Bacillus sp.* پس از ۲۰ ساعت انکوبه، طی تیمار تیمول خالص و تیمول کپسوله شده به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رخ داد. دلیل این کاهش غلظت می‌تواند به علت خلوص تیمول در مطالعه حاضر باشد.

بدیهی است که برهمکنش تیمول بر نفوذ پذیری غشای باکتری تاثیر می‌گذارد که به نوبه خود باعث از بین رفتن پتانسیل غشا، نشت یون K^+ ، ATP و کربوکسی فلورسین می‌شود. علاوه بر این، تیمول با پروتئین‌های متصل به غشا یا پری پلاسمیک از طریق برهمکنش‌های آب‌دوست و آبگریز تعامل دارد (Bannister et al., 2019; Jafri et al., 2019). Di Pasqua و همکاران (۲۰۱۰) تعامل تیمول با پروتئین‌های غشایی را مورد مطالعه قرار دادند. آنها *Salmonella enterica* را در معرض غلظت کشنده تیمول قرار دادند و تجمع پروتئین‌های غشای بیرونی با ساختار تخریب شده و ژن‌های

تیمول خالص به دست آمد. در این راستا احتمالاً تخریب و تبخیر تیمول آزاد در محیط کشت در گذر زمان نسبت به تیمول نانوکپسوله شده رخ داده است (Wattanasatcha et al., 2012). همچنین همان طور که قبلاً اشاره شد، ترکیبات موثر نانوکپسوله شده در زمینه دارورسانی بسیار مورد استقبال قرار دارند چرا که این حالت منجر به بهبود حلالیت داروهای نامحلول در آب که بخوبی جذب نمی‌شوند، می‌شود. به علاوه، با کاهش اندازه ذرات دارو قابلیت دسترسی زیستی به طرز شایانی بهبود می‌یابد (Rassu et al., 2014).

در مجموع، بر اساس اطلاعات موجود، توسعه بیوفیلیم توسط میکروارگانیسم‌ها به عنوان اولین مرحله از تشکیل پدیده بیوفولینگ منجر به ایجاد مشکلات بسیاری در صنایع و سازه‌های دریایی مغروق می‌شود. با توجه به اثرات مخرب زیست محیطی ترکیبات شیمیایی ضدفولینگ، مطالعات آزمایشگاهی مختلف روی اسانس‌ها و ترکیبات فعال آنها در کنترل بیوفیلیم امیدوار کننده است. اسانس‌های مختلف نحوه عملکرد مشترک خود را در برابر بیوفیلیم نشان داده‌اند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نقش ترکیبات فعالی چون تیمول نانوکپسوله شده در شبکه پلیمری ژلاتین-کاراگینان در کنترل بیوفیلیم

تشکیل بیوفیلیم سوبیه‌های تولیدکننده کارباپنماز جلوگیری می‌کنند (Raei et al., 2017). در مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی و ضدبیوفیلیمی تیمول در برابر باکتری دریایی *Bacillus sp.* به ترتیب ۳۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به دست آمد که در محدوده مطالعه Raei و همکارانش (۲۰۱۷) است.

Wattanasatcha و همکاران (۲۰۱۲) اثر ضد میکروبی تیمول، کارواکرول، یوژنول و سیترونال را بر باکتری‌های *Escherichia*، *Staphylococcus aureus* و *coli* و *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد که تیمول واجد بیشترین اثرگذاری بر بازدارندگی و کشندگی این میکروارگانیسم‌ها بود. همچنین کپسوله کردن تیمول در ذرات اتیل و متیل سلولز با سطح بارگذاری ۴۳/۵۳ درصد، نه تنها نسبت به تیمول خالص میزان غلظت کمتری در MIC و MBC ارائه داد، بلکه در مقایسه با متیل پارابن به عنوان نگهدارنده در محصولات آرایشی-بهداشتی نیز اثر ضدباکتری بهتری را نشان داد (Wattanasatcha et al., 2012). در مطالعه حاضر نیز اثر ضد میکروبی و ضدبیوفیلیمی تیمول نانوکپسوله شده در شبکه پلیمری ژلاتین-کاراگینان به مراتب بهتر از

تولید شده از باکتری دریایی *Bacillus sp.* از طریق ایجاد حلالیت مناسب، اندازه کوچک و پایداری با بهره‌گیری از فناوری نانو، بسیار شایان توجه است. همچنین می‌توان در مطالعات تکمیلی از این گونه ترکیبات در رنگ‌های ضدفولینگ به منظور جایگزینی با ترکیبات سمی به علت ایمنی و دوستدار محیط زیست بودن آنها بهره جست.

منابع

- Bannister J., Sievers M., Bush F. and Bloecher N. 2019.** Biofouling in marine aquaculture: A review of recent research and developments. *Biofouling*, 35(6): 631–648. doi: 10.1080/08927014.2019.1640214
- Braga P.C., Culici M., Alfieri M. and Dal Sasso M. 2008.** Thymol inhibits *Candida albicans* biofilm formation and mature biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 472–477. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.12.013
- Da Silva Carvalho A.G., Da Costa Machado M.T., Barros H.D.D. F.Q., Cazarin C.B.B., Junior M.R.M. and Hubinger M.D. 2019.** Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, 345: 283–291. doi: 10.1016/j.powtec.2019.01.016
- Dalleau S., Cateau E., Berges T., Berjeaud J.M. and Imbert C. 2008.** In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31: 572–576. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.01.028
- Di Pasqua R., Mamone G., Ferranti P., Ercolini D. and Mauriello G. 2010.** Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. *Proteomics*, 10(5): 1040–1049. doi: 10.1002/pmic.200900568
- Ghaderi L., Aliahmadi A., Ebrahimi S.N. and Rafati H. 2021.** Effective inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by *Satureja khuzistanica* essential oil nanoemulsion. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61: 1–8 (102260). doi: 10.1016/j.jddst.2020.102260
- Gilsenan P. and Ross-Murphy S. 2000.** Rheological characterization of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14: 191–195. doi: 10.1016/S0268-005X(99)00050-8
- Holdt S.L. and Kraan S. 2011.** Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 23: 543–597. doi: 10.1007/s10811-010-9632-5
- Hsieh W.C., Chang C.P. and Gao Y.L. 2006.** Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments. *Colloids and Surfaces*, 53: 209–214. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.09.008
- Hu K., Huang X., Gao Y., Huang X., Xiao H. and McClements D.J. 2015.** Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: Synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin

- nanoparticles. *Food Chemistry*, 182: 275–281. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.03.009
- Jafri H., Ansari F.A. and Ahmad I. 2019.** Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. P: 203–236. In: Ahmad Khan M.S., Ahmad I. and Chattopadhyay D. (Eds.). *New Look to Phytomedicine*. Academic Press, USA. doi: 10.1016/B978-0-12-814619-4.00009-4
- Kang J., Liu L., Wu X., Sun Y. and Liu Z. 2018.** Effect of thyme essential oil against *Bacillus cereus* planktonic growth and biofilm formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102: 10209–10218. doi: 10.1007/s00253-018-9401-y
- Ludensky M. 1998.** An automated system for biocide testing on biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(2): 109–115. doi: 10.1038/sj.jim.2900487
- Mak W., Hamid N., Liu T., Lu J. and White W. 2013.** Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 95(1): 606–614. doi: 10.1016/j.carbpol.2013.02.047
- Patel A., Hu Y., Tiwari J.K. and Velikov K.P. 2010.** Synthesis and characterization of zein–curcumin colloidal particles. *Soft Matter*, 6: 6192–6199. doi: 10.1039/C0SM00800A
- Raei P., Pournalak T., Memar M.Y., Alizadeh N., Aghamali M., Zeinalzadeh E., Asgharzadeh M. and Kafil H. 2017.** Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. *Cellular and Molecular Biology*, 63(5): 108–112. doi: 10.14715/cmb/2017.63.5.20
- Rajitha Z., Nancharaiah Y.V. and Venugopalan V.P. 2020.** Insight into bacterial biofilm-barnacle larvae interactions for environmentally benign antifouling strategies. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 149: 1–12 (104937). doi: 10.1016/j.ibiod.2020.104937
- Rassu G., Nieddu M., Bosi P., Trevisi P., Colombo M., Priori D., Manconi P., Giunchedi P., Gavini E. and Boatto G. 2014.** Encapsulation and modified-release of thymol from oral microparticles as adjuvant or substitute to current medications. *Phytomedicine*, 21(21): 1627–1632. doi: 10.1016/j.phymed.2014.07.017
- Sun X., Pan C., Ying Z., Yu D., Duan X., Huang F., Ling J. and Ouyang X.K. 2020.** Stabilization of zein nanoparticles with k-carrageenan and tween 80 for encapsulation of curcumin. *International Journal of Biological*

Macromolecules, 146: 549–559.
doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.053

Tian Z., Lei Z., Chen X. and Chen Y. 2020. Evaluation of laser cleaning for defouling of marine biofilm contamination on aluminum alloys. *Applied Surface Science*, 499: 1–12 (144060). doi: 10.1016/j.apsusc.2019.144060

Wattanasatcha A., Rengpipat S. and Wanichwecharungruang S. 2012. Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434: 360–365. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.017

Zarei Jeliani Z., Sohrabipour J., Soltani M., Rabiei R. and Yousefzadi M. 2021. Seasonal variations in growth and phytochemical compounds of cultivated red alga, *Hypnea flagelliformis*, in southern coastlines of Iran. *Journal of Applied Phycology*, 33: 2459–2470. doi: 10.1007/s10811-021-02429-9

ZoBell C.E. 1941. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *Journal of Marine Research*, 4: 41–75.



Research Paper

Optimization of thymol nanoencapsulation in gelatin and carrageenan polymer network and investigation of anti-biofilm effect against marine bacteria *Bacillus* sp.

Zahra Zarei Jeliani¹, Morteza Yousefzadi^{2*}, Samad Nejad Ebrahimi³,
Adnan Shahdadi⁴

DOI: 10.22124/japb.2023.22800.1477

Received: August 2022

Accepted: February 2023

Abstract

Thymol is the main monoterpene phenol occurring in essential oils. The aim of this study was to encapsulate thymol, in natural polymers gelatin and carrageenan. In order to achieve the optimization of encapsulated thymol, the CCD method of the experiment design software was used. As a result, based on the analysis, it was found that the optimal conditions suggested by Design Expert 13 software were as follows: pH 6, thymol concentration 0.4% (W/V) and the ratio of carrageenan to gelatin =1, which in this case, the encapsulation efficiency, nanocapsule size and polydispersity index were obtained 91%, 112 nm, and 1.1, respectively. The encapsulated thymol gave lower minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) values than the unencapsulated thymol against *Bacillus* sp. strain. In addition, encapsulated thymol had 70% inhibition and eradication of biofilm in lower concentrations. In general, the results showed an improvement in antibacterial and antibiofilm activity for nanoencapsulated thymol against marine bacteria *Bacillus* sp. This formulation could be proposed as an alternative or adjuvant for controlling biofilm in marine bacteria in the first stage of the biofouling phenomenon.

Key words: *Thymol, Biopolymer, Capsulation, Design Expert, Biofilm.*

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

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

3- Associate Professor in Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

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

*Corresponding Author: morteza110110@gmail.com