

بررسی فعالیت آنتی‌فولینگ عصاره‌های خیار دریایی (*Stichopus herrmanni*) در آزمایشگاه و عملکرد آنها در پوشش‌های رزین اپوکسی در محیط دریا

مهرنوش دریا^۱، میر مسعود سجادی^{۲*}، مرتضی یوسف زادی^۳، ایمان سوری نژاد^۴، معروف زارعی^۴

*mmsajjadi@hotmail.com

- ۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
- ۲- گروه زیست دریا، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- ۳- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
- ۴- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹۸

چکیده

توسعه مواد آنتی‌فولینگ طبیعی و دوستدار محیط‌زیست یک جایگزین مناسب برای حل مشکل جهانی فولینگ دریایی محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر فعالیت ضدباکتریایی، ضد میکرو جلبکی، ضد بارناکل و آنتی‌فولینگی عصاره‌های غیرقطبی، نیمه‌قطبی و قطبی سه بخش مختلف بدن (دیواره بدن، لوله گوارش و درخت تنفسی) خیار دریایی *Stichopus herrmanni* بررسی گردید. سنجش فعالیت مهاری عصاره‌های آن‌هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی در آزمایشگاه بر علیه پنج سویه باکتری، دو گونه میکرو جلبک و لارو بارناکل آزمایش شد. جهت بررسی عملکرد آنتی‌فولینگی، عصاره‌ها به پوشش رزین اپوکسی اضافه شده و به مدت سه ماه در دریا جاگذاری شدند. براساس نتایج، عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن با کمترین غلظت مهاری (MIC) در مقابله با باکتری *S. aureus* (۰/۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و میکرو جلبک *I. galbana* (۰/۱۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین غلظت کشنده متوسط (LC₅₀) در مقابله با لارو بارناکل (۰/۰۶۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دارای بهترین عملکرد بازدارندگی در بین عصاره‌ها بود. در پایان دوره سه ماهه آزمایش، پنل پوشش دهی شده حاوی ۴٪ عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن دارای کمترین وزن نهایی (۱۸۹/۶۷±۵/۵۱ گرم) و کمترین درصد پوشش فولینگ (۷۴/۷۶٪) در بین همه پنل‌ها بود (P<۰/۰۵). با توجه به فعالیت آنتی‌فولینگی مناسب عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن *S. herrmanni*، استفاده از آن به عنوان جایگزین بالقوه طبیعی در رنگ‌های آنتی‌فولینگ قابل پیشنهاد است.

واژگان کلیدی: متابولیت‌های ثانویه، خیار دریایی، آنتی‌فولینگ، رزین اپوکسی

*نویسنده مسئول

مقدمه

فولینگ زیستی دریایی به معنی تجمع و رشد گروهی از میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران دریایی بر سطوح زیر آبی در دریاست (Xin *et al.*, 2017). موجودات فولینگ کننده شامل باکتری‌ها، جلبک‌ها، بارناکل‌ها و انواع متنوعی از گونه‌های آبی هستند. آنها به طور گسترده‌ای بر روی بدنه کشتی‌ها و ادوات آبی‌پرووری جمع شده و منجر به افزایش اصطکاک، کاهش سرعت و شناوری کشتی‌ها و بسته شدن چشمه تورها می‌شوند. فولینگ زیستی اثرات نامطلوب بسیاری بر صنایع دریایی گذاشته و سالانه میلیاردها دلار برای رفع این مشکل هزینه می‌شود (Schultz *et al.*, 2011). بنابراین، به منظور کنترل و کاهش اثرات فولینگ، ساخت انواع پوشش‌های آنتی‌فولینگ در حال توسعه یافتن است. از قدیمی‌ترین پوشش‌های آنتی‌فولینگ تجاری می‌توان به پوشش‌های بر پایه کاپلیمرهای خودساینده حاوی تری‌بوتیل‌تین (TBT) اشاره کرد که به دلیل مخرب بودن ترکیبات TBT برای محیط‌زیست دریا، سازمان بین‌المللی دریایی (IMO) از سال ۲۰۰۸ استفاده از آنها را ممنوع اعلام کرد (Lin *et al.*, 2009). سپس پوشش‌های آنتی‌فولینگ حاوی زیست‌کش‌هایی مانند مس جایگزین آنها شدند و تا سال‌های اخیر به صورت گسترده در صنایع دریایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (Edwards *et al.*, 2015). اما به دلیل اثبات مضرات این پوشش‌ها و تجمع مس در محیط دریا، هم اکنون محدودیت استفاده از رنگ‌های آنتی‌فولینگ حاوی مس نیز در بسیاری از کشورها آغاز شده است (Joshi *et al.*, 2015).

در سال‌های اخیر ترکیبات و روش‌های طبیعی، رویکرد جدیدی در تولید مواد آنتی‌فولینگ بوجود آورده است، زیرا در طبیعت جانوران زیادی در دریا زندگی می‌کنند که به طور چشمگیری از نشستن و حضور موجودات فولینگ روی بدن خود آزاد می‌مانند که دلیل آن به میکروتوپوگرافی سطح، مواد زیست‌فعال، ترشح موکوس و پوست‌اندازی نسبت داده می‌شود (Ralston & Swain, 2009). آبیان بسیاری بوسیله تولید مولکول‌های زیست‌فعال از خود دفاع می‌کنند. انسان‌ها با الهام گرفتن از این پدیده انواع ترکیبات طبیعی مانند ترپن‌ها، کمپتوتسین و... را از جلبک‌ها و بی‌مهرگان دریایی استخراج کرده‌اند (Wang *et al.*, 2017). ترکیبات طبیعی یک منبع امیدوارکننده برای مواد آنتی‌فولینگ هستند، زیرا از محیط‌زیست طبیعی گرفته شده‌اند. در نتیجه، با آن سازگارتر

بوده و فاقد آلودگی‌های زیست محیطی هستند (Xie *et al.*, 2019). خیارهای دریایی یکی از آبیانی هستند که در طبیعت عاری از فولینگ بوده و متابولیت‌های ثانویه‌ای را تولید می‌کنند که در واقع سلاح‌های شیمیایی آنها می‌باشد (Thakur *et al.*, 2005). بررسی‌های انجام شده در رابطه با خیارهای دریایی نشان می‌دهد که آنها دارای انواع مختلفی از ترکیبات زیست‌فعال با خواص بیولوژیک مانند خواص آنتی‌اکسیدانی (دبیا و همکاران، ۱۳۹۵)، ضدباکتریایی، ضد تومور، سائیتوتوکسیک و... هستند (Datta *et al.*, 2015).

باکتری‌ها و میکروجلبک‌ها جز موجودات اولیه و اصلی ایجاد کننده فولینگ محسوب می‌شوند که شرایط را برای چسبیدن و رشد موجودات فولینگ بزرگتر مهیا می‌کنند (Yang *et al.*, 2015). همچنین بارناکل‌ها از مهم‌ترین موجودات ماکروفولینگ محسوب می‌شوند که مشکلات جدی را برای صنایع دریایی بوجود می‌آورند. بنابراین، بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضد میکروجلبکی و ضدبارناکل ترکیباتی که به عنوان مواد آنتی‌فولینگ بالقوه مدنظر هستند، مهم‌ترین گام آزمایشگاهی در یافتن مواد آنتی‌فولینگ جدید است (Yang *et al.*, 2015). از سویی، بررسی عملکرد ماده مورد نظر در محیط دریا گامی اساسی در تایید یا رد خاصیت آنتی‌فولینگ ماده جدید محسوب می‌شود. بنابراین، در تحقیق حاضر ابتدا فعالیت ضد میکروبی، ضد میکروجلبکی و ضدبارناکل عصاره‌های قطبی، نیمه قطبی و غیر قطبی بخش‌های مختلف بدن (دیواره بدن، درخت تنفسی، لوله گوارش) خیار دریایی *Stichopus herrmanni* بر پنج سویه باکتری و دو گونه میکروجلبک و لارو بارناکل در آزمایشگاه بررسی شد. در ادامه عصاره‌های با بیشترین فعالیت مهاری جهت بررسی عملکرد آنتی‌فولینگ در دریا به صورت پوشش رزین اپوکسی روی پتل‌های فایبرگلاس آماده شدند و به مدت سه ماه در دریا مورد آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها**عصاره‌گیری و استخراج ترکیبات از خیار دریایی**

خیار دریایی *S. herrmanni* از عمق حدود ۱۰-۵ متر به کمک غواصی از سواحل شنی گلی جزیره هنگام در خلیج فارس جمع‌آوری شده و در آزمایشگاه به کمک کلید شناسایی، شناسایی و تایید شد (Purcell *et al.*, 2012). سپس بخش‌های مختلف بدن شامل دیواره بدن و پوست، لوله گوارش و درخت تنفسی جدا شده و به کمک دستگاه خشک‌کن به

سانتی‌گراد و هوادهی مداوم کشت داده شدند و تا زمان رسیدن به غلظت مناسب نگهداری شدند. ارزیابی خواص ضد میکروبیولوژیکی عصاره‌ها با تعیین MIC هر عصاره به روش رقت متوالی انجام شد (Suresh et al., 2016). عصاره‌ها در شش غلظت متوالی به ازای هر میکروبیولوژیکی (دوازده تیمار) به لوله‌های آزمایش حاوی میکروبیولوژیکی و محیط کشت اضافه و هر غلظت با شش تکرار انجام شد. غلظت میکروبیولوژیکی‌ها در ابتدا $10^5 \text{ cell.ml}^{-1} \times 1$ در نظر گرفته شد. آزمایش‌ها به مدت ۲۴ ساعت، در دمای 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد. جذب نوری بوسیله اسپکتروفوتومتر و بازماندگی بوسیله لام زیر میکروسکوپ ارزیابی شد. کمترین غلظت عصاره که مانع رشد و بازماندگی جلبک حداقل در چهار لوله از شش لوله آزمایش شد به عنوان MIC گزارش گردید (Suresh et al., 2016).

بررسی اثر سمیت عصاره‌ها بر لارو بارناکل

بارناکل *Amphibalanus amphitrite* بالغ چسبیده به سنگ‌ها از منطقه ساحلی بندرعباس تهیه شد. بارناکل‌ها تا زمان تولید لارو در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، شوری آب دریا با هوادهی نگهداری شده و با ناپلی آرتیمیا و میکروبیولوژیکی تغذیه شدند. پس از رهاسازی لارو با ایجاد نقطه نوری در یک طرف ظرف در تاریکی، لاروها به وسیله پیپت جمع آوری شدند. جهت بررسی سمیت عصاره‌ها بر لارو بارناکل، شش غلظت سریالی از هر عصاره به همراه ۱ میلی‌لیتر آب دریا به عنوان محیط کشت درون چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه تهیه شد. سپس درون هر چاهک ۲۰-۱۵ عدد لارو بارناکل اضافه شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده و زنده بررسی و شمارش شده و غلظت کشنده ۵۰٪ از نمونه‌ها (LC_{50}) برای هر عصاره برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Liu et al., 2018).

آماده‌سازی پوشش آنتی‌فولینگ و تیمارهای آزمایشی (پنل‌ها)

به منظور تهیه پوشش‌های حاوی مواد آنتی‌فولینگی مستخرج از خیار دریایی، رزین اپوکسی EP-400 به همراه سخت‌کننده (هاردنر) اختصاصی EP-100 از شرکت پارس پامچال تهیه شد. برای تهیه پوشش‌های آنتی‌فولینگ، عصاره‌های خیار دریایی در

روش انجماد خشک و در نهایت آسیاب و همگن شدند. عصاره‌گیری برای هر بخش بدن به صورت متوالی توسط آن‌هگزان، اتیل‌استات و متانول به مدت ۴۸ ساعت و در تاریکی انجام شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن حلال و عصاره از ماده جامد باقی‌مانده جدا شده و با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شد. شایان ذکر است که بازده عصاره‌های متانولی برای اندام‌های دیواره بدن، لوله گوارش و درخت تنفسی بترتیب برابر با ۳۴/۶، ۳۶ و ۱۱/۵ درصد محاسبه شد. همچنین بازده عصاره‌های اتیل‌استاتی برای اندام‌های دیواره بدن، لوله گوارش و درخت تنفسی بترتیب ۴/۵، ۵ و ۱/۱ درصد و بازده عصاره‌های آن‌هگزانی دیواره بدن، لوله گوارش و درخت تنفسی بترتیب ۷، ۱۰/۴ و ۱ درصد محاسبه شد.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش براث

در انجام آزمایش‌ها از پنج سویه باکتری گرم منفی/مثبت بیماری‌زا شامل *Micrococcus*، *Staphylococcus aureus*، *Juteus*، *Vibrio harveyi*، *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* استفاده شد. بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها به روش رقت متوالی انجام شد (Vanden Berghe & Vlietinck, 1991). شش رقت از هر عصاره (در دامنه ۲-۰/۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در محیط کشت مایع مولر هیلتون براث به ازای هر سویه باکتریایی درون لوله‌های آزمایش تهیه شد. هر غلظت برای هر باکتری در سه تکرار تهیه شد. سپس باکتری‌ها که قبلاً کشت مایع داده شده بودند، با غلظت مشخص به لوله‌های حاوی محیط کشت و عصاره اضافه شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از آن کدورت لوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت. کمترین غلظتی از عصاره که رشد باکتری در آن صورت نگرفته بود به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

بررسی اثر عصاره‌ها بر بازدارندگی میکروبیولوژیکی‌ها

استوک خالص میکروبیولوژیکی‌های *Chlorella vulgaris* و *Isochrysis galbana* از آزمایشگاه کشت جلبک دانشگاه هرمزگان تهیه شد. میکروبیولوژیکی‌ها با استفاده از محیط کشت F_2 گیلارد و آب دریا با شوری مناسب در دمای 27 ± 1 درجه

نسبت‌های وزنی مشخص (جدول ۱) در حلال حل شده و به رزین اپوکسی اضافه شده و به کمک گرمکن-همزن مغناطیسی (هیتراستیرر) کاملاً همزده شد تا یکنواخت و همگن گردد و در نهایت هاردنر به مخلوط اضافه شد. نسبت ترکیب رزین اپوکسی با هاردنر طبق دستور درج شده از طرف شرکت سازنده به صورت ۷۸:۲۲ در نظر گرفته شد. جهت آماده‌سازی پنل‌ها، ورقه فایبرگلاس با ضخامت ۱ mm در ابعاد ۱۰×۱۰ برش داده شد. ورقه‌های برش داده شده با پوشش‌های آماده شده، به روش

غوطه‌وری (دیپ) رنگ‌آمیزی شدند. پنل‌ها برای هر نوع پوشش در سه تکرار تهیه شدند. پنل‌ها در فرم ثابت شده و به مدت سه ماه در عمق ۲ متری از سطح دریا به کمک بویه‌های شناورسازی در نزدیکی بندر گرز در خلیج فارس قرار داده شدند. پنل‌ها در ابتدا و انتهای دوره توزین شده و به کمک غواصی ماهانه از آنها عکس تهیه شد (Soliman et al., 2014).

جدول ۱: طراحی پنل‌های آزمایشی برای بررسی فعالیت ضدفولینگی عصاره‌های خیار دریایی *S. herrmanni*

Table 1: The experimental panels designed for antifouling activity of sea cucumber *S. herrmanni* extracts.

پنل‌ها	نوع و توضیحات	درصد ماده موثره
بدون پوشش	ورقه فایبرگلاس بدون پوشش‌دهی و عصاره	-
کنترل	ورقه فایبرگلاس با پوشش بدون عصاره	-
آنتی‌فولینگ ۱	ورقه فایبرگلاس با پوشش رزین اپوکسی به همراه عصاره اتیل‌استاتی از دیواره بدن خیار دریایی	۴٪ عصاره
آنتی‌فولینگ ۲	ورقه فایبرگلاس با پوشش رزین اپوکسی به همراه عصاره اتیل‌استاتی از دیواره بدن خیار دریایی	۲٪ عصاره
آنتی‌فولینگ ۳	ورقه فایبرگلاس با پوشش رزین اپوکسی به همراه عصاره متانولی از دیواره بدن خیار دریایی	۲٪ عصاره

آنالیز آماری

تعیین درصد پوشش فولینگ و بررسی عکس پنل‌ها با نرم افزار CPCe 4.1 انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های وزنی فولینگ توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way-ANOVA) انجام شد و مقایسه میانگین به کمک آزمون دانکن و با نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ صورت گرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ تعیین گردید. محاسبه (LC₅₀) با نرم افزار Probit انجام شد. برای ثبت دادها و رسم نمودار نیز از نرم افزار Microsoft Excel 2017 استفاده شد.

نتایج

فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های خیار دریایی

نتایج نشان داد که در بین نه عصاره مورد مطالعه، عصاره اتیل‌استات دیواره بدن دارای بهترین عملکرد بازدارندگی و کمترین MIC به میزان ۰/۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری *S. aureus* بود. در بین پنج سویه باکتری مورد مطالعه باکتری *S. aureus* حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره‌ها بود.

بهترین MIC ثبت شده برای باکتری‌های *M. luteus*، *harvi* و *E. coli* برابر با ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مقابله با باکتری گرم‌منفی *K. pneumoniae* از نه عصاره، در دامنه غلظت‌های مورد بررسی این تحقیق (۲-۰/۰۶۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تنها برای یک عصاره MIC ثبت شد (جدول ۲).

فعالیت ضد میکروجلبکی عصاره‌های خیار دریایی

نتایج نشان داد که هر ۹ عصاره دارای خاصیت ضد میکروجلبکی بر گونه *I. galbana* می‌باشند (جدول ۳). عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن، دارای بیشترین فعالیت ضد میکروجلبکی در مقابل گونه *I. galbana* با MIC=۰/۱۲۵ mg/ml بود. همچنین عصاره متانولی دیواره بدن با MIC=۰/۲۵۰ mg/ml اثر ضد میکروجلبکی مناسبی در مقابل *I. galbana* از خود نشان داد. از نه عصاره، شش عصاره در مقابل گونه *C. vulgaris* فعالیت ضد میکروجلبکی از خود نشان دادند. بیشترین اثر ضد میکروجلبکی بر گونه *C. vulgaris*، متعلق به عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن با MIC=۰/۵۰۰ mg/ml بود.

جدول ۲: کمترین غلظت بازدارنده (MIC) عصاره‌های خیار دریایی *S. herrmanni* علیه باکتری‌های آزمایشی (میلی گرم بر میلی لیتر).

Table 2: Minimum inhibitory concentration (MIC) of sea cucumber *S. herrmanni* extracts against test bacteria (mg/ml).

<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. harvi</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	باکتری	
					نمونه	
-	۲	۲	۲	۱	دیواره بدن	ان‌هگزان
-	-	۲	-	۲	لوله گوارش	
-	-	-	-	-	درخت تنفسی	
۲	۱	۱	۱	۰/۵۰۰	دیواره بدن	اتیل‌استات
-	-	۲	۲	۲	لوله گوارش	
-	-	۲	-	۲	درخت تنفسی	
-	۲	۱	۲	۱	دیواره بدن	متانول
-	-	۲	-	۲	لوله گوارش	
-	-	-	-	-	درخت تنفسی	

جدول ۳: کمترین غلظت بازدارنده (MIC) عصاره‌های خیار دریایی *S. herrmanni* علیه جلبک‌های آزمایشی (میلی گرم بر میلی لیتر).

Table 3: Minimum inhibitory concentration (MIC) of sea cucumber *S. herrmanni* extracts against test algae (mg/ml).

<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	میکرو جلبک	
		عصاره	
۲	۱	دیواره بدن	ان‌هگزانی
۲	۱	لوله گوارش	
-	۲	درخت تنفسی	
۰/۵۰۰	۰/۱۲۵	دیواره بدن	اتیل‌استات
۲	۰/۵۰۰	لوله گوارش	
-	۱	درخت تنفسی	
۱	۰/۲۵۰	دیواره بدن	متانول
۲	۱	لوله گوارش	
-	۲	درخت تنفسی	

عملکرد آنتی‌فولینگ عصاره خیار دریایی در محیط دریا نتایج حاصل از بررسی عملکرد آنتی‌فولینگ عصاره‌ها بر پایه وزن نهایی موجودات فولینگ کننده بر پنل‌ها در محیط دریا در جدول ۵ ارائه شده است. بر اساس این نتایج وزن نهایی پنل بدون پوشش و پنل کنترل با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P > 0.05$) در حالیکه با سایر پنل‌های آزمایشی ۱، ۲ و ۳ تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان دادند ($P < 0.05$). در پایان دوره آزمایش، وزن نهایی پنل آنتی‌فولینگ ۱ به صورت معنی‌داری از سایر پنل‌ها کمتر بود ($P < 0.05$).

فعالیت سمیت سلولی عصاره‌های خیار دریایی بر ضد لارو بارناکل

بر اساس نتایج بیشترین فعالیت سمیت سلولی (سایتوتوکسیک) متعلق به عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن به میزان 0.061 و $LC_{50} = 0.073$ و پس از آن نیز عصاره متانولی دیواره بدن با 0.073 و $LC_{50} = 0.1$ در جایگاه دوم قرار دارد که با LC_{50} کمتر از 0.1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای خاصیت سمیت سلولی مناسب بر علیه لارو بارناکل هستند. عصاره ان‌هگزانی درخت تنفسی با بزرگترین مقدار LC_{50} ، دارای کمترین خاصیت سمیت سلولی در بین نه عصاره بر علیه لارو بارناکل است (جدول ۴).

جدول ۴: غلظت کشنده (LC_{50}) عصاره‌های خیار دریایی *S. hermanni* علیه لارو بارناکل (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

Table 4: Lethal concentration (LC_{50}) of extracts from sea cucumber *S. hermanni* against barnacle larvae (mg/ml).

عصاره	LC_{50}
دیواره بدن	۰/۲۱۱
لوله گوارش	۰/۲۹۶
درخت تنفسی	۰/۳۶۱
دیواره بدن	۰/۰۶۱
لوله گوارش	۰/۱۱۷
درخت تنفسی	۰/۱۴۸
دیواره بدن	۰/۰۷۳
لوله گوارش	۰/۱۷۹
درخت تنفسی	۰/۲۴۶

جدول ۵: نتایج عملکرد آنتی‌فولینگ عصاره‌های خیار دریایی در پایان دوره آزمایش (میانگین \pm انحراف از معیار)

Table 5: Antifouling performance results of sea cucumber extracts at the end of test period (mean \pm S.D).

پنل	شاخص	پنل بدون پوشش	پنل کنترل	پنل آنتی‌فولینگ ۱	پنل آنتی‌فولینگ ۲	پنل آنتی‌فولینگ ۳
وزن اولیه پنل (گرم)		۱۲/۳۳ \pm ۱/۵۳ ^a	۱۳/۶۶ \pm ۱/۵۳ ^a	۱۲/۶۷ \pm ۱/۵۳ ^a	۱۳/۳۳ \pm ۱/۵۳ ^a	۱۲/۶۷ \pm ۲/۰۸ ^a
وزن نهایی پنل (گرم)		۲۷۸/۶۷ \pm ۹/۶۱ ^d	۲۷۰/۶۷ \pm ۱۱/۰۶ ^{cd}	۱۸۹/۶۷ \pm ۵/۵۱ ^a	۲۲۲/۰۰ \pm ۵/۰۰ ^b	۲۶۰/۳۳ \pm ۱۰/۰۶ ^c

* میانگین‌ها و انحراف معیار (mean \pm S.D) با حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری در تیمارها (پنل‌ها) می‌باشد ($P < 0.05$).

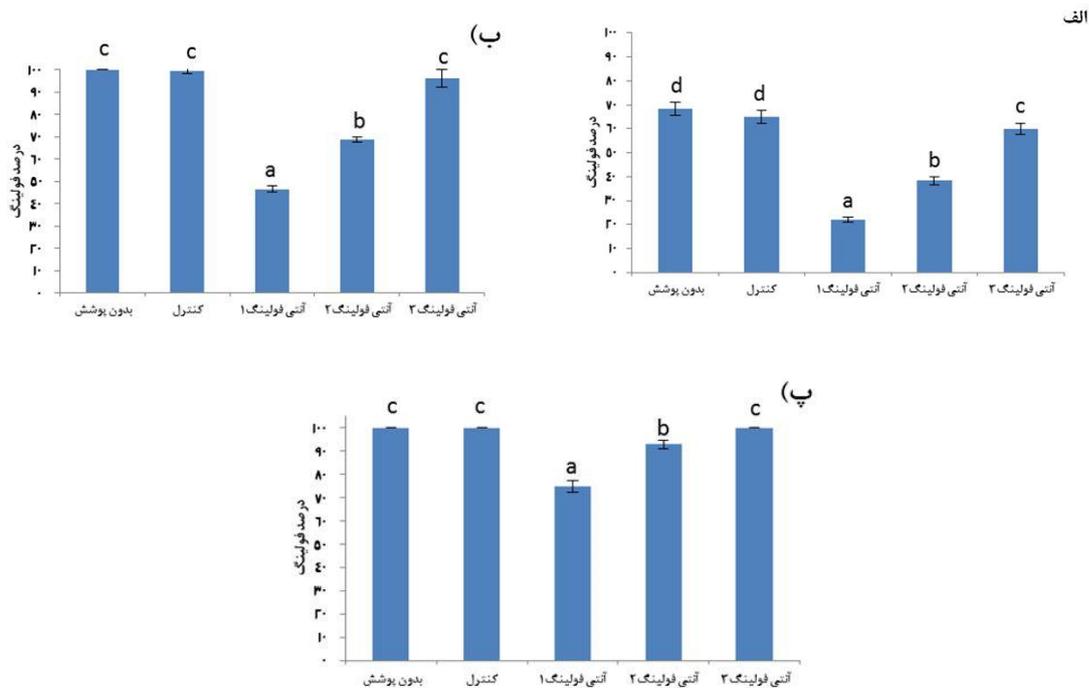
شکل ۱ فولینگ تجمع کرده بر سطح پنل‌های آزمایشی را در پایان دوره سه ماهه نشان می‌دهد. بررسی نتایج درصد پوشش فولینگ ایجاد شده در طول دوره بر سطح پنل‌ها نشان داد که پس از پایان ماه اول درصد پوشش فولینگ پنل کنترل و بدون پوشش تفاوت معنی‌داری باهم نداشته ($P > 0.05$) اما با پنل‌های آنتی‌فولینگ ۱، ۲ و ۳ تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$). در پایان ماه دوم و سوم پنل کنترل و بدون پوشش علاوه بر اینکه باهم تفاوت معنی‌داری ندارند ($P > 0.05$) با پنل آنتی‌فولینگ ۳ نیز تفاوت معنی‌دار نداشتند ($P > 0.05$). در پایان هر سه ماه اول، دوم و سوم پنل آنتی‌فولینگ ۱ دارای کمترین درصد پوشش (بترتیب ۲۲/۲۳٪، ۴۶/۵۶٪ و ۷۴/۷۶٪) بود و با سایر پنل‌ها تفاوت معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۲).

شکل ۱ فولینگ تجمع کرده بر سطح پنل‌های آزمایشی را در پایان دوره سه ماهه نشان می‌دهد. بررسی نتایج درصد پوشش فولینگ ایجاد شده در طول دوره بر سطح پنل‌ها نشان داد که پس از پایان ماه اول درصد پوشش فولینگ پنل کنترل و بدون پوشش تفاوت معنی‌داری باهم نداشته ($P > 0.05$) اما با پنل‌های آنتی‌فولینگ ۱، ۲ و ۳ تفاوت معنی‌دار دارند ($P < 0.05$).



شکل ۱: فولینگ تجمع کرده بر پنل‌ها در پایان دوره آزمایش. آ: پنل بدون پوشش، ب: پنل کنترل، پ: پنل آنتی‌فولینگ ۱، ت: پنل آنتی‌فولینگ ۲، ث: پنل آنتی‌فولینگ ۳.

Figure 1: Fouling settled on panels at the end of test period. A: uncoated panel, B: control panel, C: antifouling panel 1, D: antifouling panel 2, E: antifouling panel 3.



شکل ۲: مقایسه درصد پوشش فولینگ ایجاد شده روی پنل‌ها پس از یک ماه (الف)، دو ماه (ب)، سه ماه (پ) غوطه‌وری در دریا

Figure 2: Fouling percentage cover on panels after one, two and three months immersion in the sea.

بحث

در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتریایی، ضد میکروجلبکی، ضدبارناکل و آنتی‌فولینگ ۹ عصاره خیاردریایی *S. herrmanni* که از لحاظ قطبیت متابولیت‌های مستخرج و اندام‌های بدن با هم تفاوت داشتند مورد آزمایش قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از سنجش فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضد میکروجلبکی و ضد بارناکل در آزمایشگاه، بیشترین فعالیت بازدارندگی و کشندگی در بین عصاره‌ها متعلق به عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن بود. در سنجش فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌ها بیشترین فعالیت ضدباکتریایی متعلق به عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن در مقابله با باکتری *S. aureus* به میزان $MIC=0/500 \text{ mg/ml}$ محاسبه شد و این میزان با نتایج مطالعه‌ای که سالاری و همکاران (۱۳۹۷) بر فعالیت ضد باکتریایی ترکیبات *S. herrmanni* انجام دادند، مطابقت داشت. همچنین در مطالعه حاضر از بین پنج سویه باکتری مورد مطالعه باکتری *K. pneumoniae* بیشترین مقاومت را در برابر عصاره‌ها از خود نشان دادند. همسو با نتایج حاضر Mashjoor و Yousefzadi (۲۰۱۷) نیز در مطالعه‌ای *K. pneumoniae* را به عنوان مقاوم‌ترین باکتری در مقابله با عصاره‌های متانولی و اتیل‌استاتی سه گونه خیار دریایی دانستند.

در مطالعه حاضر بیشترین فعالیت ضد میکروجلبکی متعلق به عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن در مقابل *I. galbana* بود. اگرچه هر ۹ عصاره در برابر این میکروجلبک فعالیت مهاری از خود نشان دادند. همسو با مطالعه حاضر، Suresh و همکاران (۲۰۱۶) نیز فعالیت بالای مهاری عصاره نیمه قطبی *Padina tetrastromatica* در مقابله با سه گونه میکروجلبک مورد مطالعه را گزارش کردند و اسیدهای چرب و متابولیت‌های چربی مستخرج را مسئول فعالیت ضد میکروجلبکی و ضد فولینگ دانستند.

در تحقیق حاضر هر ۹ عصاره خیار دریایی در مقابله با لارو بارناکل فعالیت سمیت سلولی مناسب از خود نشان دادند و دو عصاره اتیل‌استاتی و متانولی دیواره بدن با LC_{50} کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بالاترین سمیت را در بین عصاره‌ها داشتند. در همین راستا Liu و همکاران (۲۰۱۸) عملکرد آنتی‌فولینگ ۴ ترکیبات کارتنوئیدی مستخرج از گیاه *Nerium oleander* را زمانی که LC_{50} کمتر از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر داشتند، مناسب ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که هر ۴ ترکیب فعالیت مهاری مناسبی علیه لارو بارناکل نشان دادند

در حالیکه Kitano و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت ضدبارناکل ترکیب تهیه شده از سیترونلول را زمانی که مقدار LC_{50} آن کمتر از ۷۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود، مناسب توصیف کردند. بر اساس نتایج در مقایسه کلی فعالیت مهاری عصاره‌ها با قطبیت متفاوت، عصاره‌های اتیل‌استاتی (بخصوص عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن) فعالیت مهاری بسیار بالاتری نسبت به عصاره‌های آن‌هگزانی و متانولی از خود نشان دادند. دلیل فعالیت بالای مهاری عصاره‌های اتیل‌استاتی را باید حضور عمده ترکیبات با خاصیت مهاری در این عصاره‌ها دانست. مشخص شده است که عصاره‌گیری با حلال اتیل‌استات منجر به استخراج ترکیبات با قطبیت کم تا متوسط و عمدتاً متابولیت‌های چربی و ترپنوئیدها می‌شود (Saltan & Bahadr, 2012). از سویی، اکثر ترکیبات با خاصیت ضدباکتری و سمیت سلولی شناخته شده در بی‌مهرگان آبری اسیده‌های چرب، متابولیت‌های چربی و ترپن‌هایی مانند تری ترپنوئیدها و ساپونین‌ها هستند (Datta et al., 2015). این ترکیبات عمدتاً ترکیباتی با قطبیت کم تا متوسط بوده و حلال اصلی جهت استخراج آنها سیستم‌های حلالی با قطبیت کم تا متوسط مانند پترولیوم‌اتر، هگزان-اتیل‌استات و اتیل‌استات می‌باشد (Saltan & Bahadr, 2012). بنابراین، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در مطالعه حاضر ترکیباتی مانند متابولیت‌های چربی و ترپنوئیدها می‌توانند مسئول فعالیت بالای ضدباکتریایی، ضد میکروجلبکی و سمیت سلولی عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن باشند. تحقیقات متعددی متابولیت‌های چربی و ترپنوئیدهای مستخرج از خیارهای دریایی و سایر موجودات آبری به وسیله حلال‌های عمدتاً نیمه قطبی را دلیل اصلی فعالیت‌های ضد باکتریایی، سیتوتوکسیک، ضد میکروجلبکی و آنتی‌فولینگ آنها دانسته‌اند (Li et al., 2013; Mert Ozupek & Cavas, 2017; Suresh et al., 2016). همکاران (۲۰۱۶) اثرات مهاری و آنتی‌فولینگ قوی عصاره با قطبیت کم تا متوسط جلبک پادینا را به اسیده‌های چرب و متابولیت‌های چربی موجود در عصاره نسبت دادند. نتایج مطالعه Bers و همکاران (۲۰۰۶) بر ۶ عصاره ماسل آبی (*Mytilus edulis*)، نشان داد که از بین ۶ عصاره مورد مطالعه، عصاره‌های با قطبیت کم تا متوسط دارای بیشترین فعالیت آنتی‌فولینگ بودند. در مطالعه دیگری Xin و همکاران (۲۰۱۷) دلیل فعالیت آنتی‌دیپاتومه‌ای و آنتی‌فولینگ فاز دی‌کلرومتانی جدا شده از عصاره‌گیری باکتری *Bacillus spumilus* با اتیل‌استات ۹۵٪ -

اما در مقایسه با عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن فعالیت بسیار کمتری داشت. بنابر نتایج تحقیق حاضر، عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن خیار دریایی *S. hermanni* می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب جهت تهیه رنگ‌ها و پوشش‌های آنتی‌فولینگ دوستدار محیط زیست و جایگزین مناسب رنگ‌های مضر کنونی، مورد توجه و تحقیقات گسترده‌تر قرار گیرد.

منابع

دیبا، گ.، جمیلی، ش. و رمضانی، ا.، ۱۳۹۵. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی خیار دریایی *Holothuria parva* در دو حالت خشک (آبدهی شده) و تازه. مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۴): ۷۷-۸۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110300

سالاری، ز.، سوری نژاد، ا.، ناظمی، م. و یوسف زادی، م.، ۱۳۹۷. بررسی فعالیت ضد باکتریایی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی گونه *(Stichopus hermanni)* جمع آوری شده از خلیج فارس. مجله علمی شیلات ایران، ۲۷(۱): ۶۹-۵۹. DOI: 10.22092/ISFJ.2018.116406

Bers, A.V., D'Souza, F., Klijnstra, J.W., Willemssen, P.R. and Wahl, M., 2006. Chemical defence in mussels: Antifouling effect of crude extracts of the periostracum of the blue mussel *Mytilus edulis*. *Biofouling*, 22: 251–259. DOI: 10.1080/08927010600901112

Datta, D., Nath Talapatra, S. and Swarnakar, S., 2015. Bioactive Compounds from Marine Invertebrates for Potential Medicines – An Overview. *International Letters of Natural Sciences*, 34: 42–61. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.34.42

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. *Aquacultur Reserch*, 46: 2225–2235. DOI: 10.1111/are.12380.

استون ۵٪ را اسیدهای چرب مستخرج به واسطه این عصاره‌گیری دانستند. همچنین نتایج مطالعه Feng و همکاران (۲۰۰۹) بر فعالیت آنتی‌فولینگ عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی، اتانولی و آبی ۶ گونه گیاهی مختلف نشان داد که عمده‌تاً فعالیت آنتی‌فولینگ عصاره‌های اتیل‌استاتی در مقایسه با سایر عصاره‌ها بیشتر بوده است.

بررسی عملکرد آنتی‌فولینگ عصاره‌ها به صورت پوشش رزین اپوکسی در قالب پنل در محیط دریا نشان داد که وزن نهایی و درصد پوشش فولینگ ایجاد شده بر سطح پنل‌ها نتایج نسبتاً مشابهی داشته‌اند و در پایان دوره سه ماهه آزمایش پنل با پوشش رزین اپوکسی حاوی ۴٪ عصاره اتیل‌استاتی دیواره بدن (پنل آنتی‌فولینگ ۱) بهترین عملکرد آنتی‌فولینگ را از نظر درصد پوشش و وزن نهایی موجودات فولینگ کننده از خود نشان داد ($P < 0.05$). پس از آن پنل آنتی‌فولینگ ۲ که دارای ۲٪ عصاره اتیل‌استات دیواره بدن بود، در رتبه دوم قرار دارد. پنل‌های کنترل و بدون پوشش، با بیشترین وزن نهایی و درصد پوشش، بیشترین فولینگ تجمع شده را در سطح داشتند. در مطالعه‌ای که Soliman و همکاران (۲۰۱۴) بر خواص آنتی‌فولینگ عصاره موکوس پوسته و تخمدان دو گونه بادکنک ماهی انجام دادند، در پایان دوره شش هفته‌ای آزمایش درصد پوشش فولینگ بر پنل کنترل (بدون ماده آنتی‌فولینگ) و پنل بدون پوشش نسبتاً یکسان بوده اما به صورت معنی‌داری از پنل با پوشش حاوی عصاره موکوس بیشتر بودند. همچنین عصاره موکوس و پوسته دارای خاصیت آنتی‌فولینگ بیشتری نسبت به تخمدان بوده است. در مطالعه‌ای که Rajan و همکاران (۲۰۱۶) بر خاصیت آنتی‌فولینگ عصاره جلبک گلاسیلاریا اضافه شده به پوشش اپوکسی انجام دادند، در پایان دوره ۱۲ ماهه آزمایش مشخص شد که پنل استیل رنگ شده با عصاره (با وزن فولینگ به میزان ۰/۶ کیلوگرم بر متر مربع) نسبت به پنل استیل رنگ شده بدون عصاره (با وزن فولینگ ۱ کیلوگرم بر متر مربع) به صورت موثر از نشستن موجودات فولینگ جلوگیری کرده است.

به طور کلی، در مطالعه حاضر نتایج بخش پنل رزین اپوکسی در محیط دریا با نتایج بخش آزمایشگاهی هماهنگ بوده و تایید کننده آن بود. عصاره اتیل‌استات دیواره بدن خیار دریایی عملکرد آنتی‌فولینگ بسیار مناسبی در تست‌های آزمایشگاهی و در محیط دریا داشت در حالیکه عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی اگرچه تا حدودی خواص آنتی‌فولینگ از خود نشان داد،

- Feng, D.Q., Ke, C.H., Lu, C.Y. and Li, S.J., 2009.** Herbal plants as a promising source of natural antifoulants: Evidence from barnacle settlement inhibition. *Biofouling*, 25: 181–190. DOI: 10.1080/08927010802669210
- Joshi, M., Mukherjee, A., Misra, S. and Ramesh, U., 2015.** Need of Natural Biocides in Antifouling Paints for Prevention of Marine Pollution. *International Journal of Innovative Research and Development*, 4: 43–49.
- Kitano, Y., Akima, C., Yoshimura, E. and Nogata, Y., 2011.** Anti-barnacle activity of novel simple alkyl isocyanides derived from citronellol. *Biofouling*, 27: 201–205. DOI: 10.1080/08927014.2011.553282
- Li, Y.X., Wu, H.X., Xu, Y., Shao, C.L., Wang, C.Y. and Qian, P.Y., 2013.** Antifouling Activity of Secondary Metabolites Isolated from Chinese Marine Organisms. *Marine Biotechnology*, 15: 552–558. DOI: 10.1007/s10126-013-9502-7
- 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: 502–510. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2008.04.013
- Liu, H., Chen, S.Y., Guo, J.Y., Su, P., Qiu, Y.K., Ke, C.H. and Feng, D.Q., 2018.** Effective natural antifouling compounds from the plant *Nerium oleander* and testing. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 127: 170–177. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.11.022
- Mashjoor, S. and Yousefzadi, M., 2017.** Holothurians antifungal and antibacterial activity to human pathogens in the Persian Gulf. *Journal of Medical Mycology*, 27: 46–56. DOI: 10.1016/j.mycmed.2016.08.008
- Mert Ozupek, N. and Cavas, L., 2017.** Triterpene glycosides associated antifouling activity from *Holothuria tubulosa* and *H. polii*. *Regional Studies in Marine Science*, 13: 32–41. DOI: 10.1016/j.rsma.2017.04.003
- Purcell, S., Samyn, Y. and Conand, C., 2012.** Commercially important sea cucumbers of the world. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6. FAO, Rome. 155 p.
- Rajan, R., Selvaraj, M., Palraj, S. and Subramanian, G., 2016.** Studies on the anticorrosive and antifouling properties of the *Gracilaria edulis* extract incorporated epoxy paint in the Gulf of Mannar Coast, Mandapam, India. *Progress in Organic Coatings*, 90: 448–454. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2015.11.008
- Ralston, E. and Swain, G., 2009.** Bioinspiration - The solution for biofouling control?. *Bioinspiration and Biomimetics*, 4: 015007. DOI: 10.1088/1748-3182/4/1/015007
- Saltan, G. and Bahadr, Ö., 2012.** Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids, in: *Chromatography and Its Applications*. In Tech, pp. 13–50. DOI: 10.5772/36680
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R. and Hertel, W.M., 2011.** Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, 27: 87–98. DOI: 10.1080/08927014.2010.542809
- Soliman, Y.A., Mohamed, A.S. and NaserGomaa, M., 2014.** Antifouling activity of crude extracts isolated from two Red Sea puffer fishes. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 40: 1–7. DOI: 10.1016/j.ejar.2014.01.002
- Suresh, M., Iyapparaj, P. and Anantharaman, P., 2016.** Antifouling Activity of Lipidic Metabolites Derived from *Padina tetrastratica*. *Applied Biochemistry and*

- Biotechnology*, 179: 805–818. DOI: 10.1007/s12010-016-2032-9
- Thakur, N.L., Thakur, A.N. and Müller, W.E.G., 2005.** Marine natural products in drug discovery. *Natural Product Radiance*, 4: 471–477.
- Vanden Berghe, D.A. and Vlietinck, A.J., 1991.** Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, in: Dey, P., Harbone, J.. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*. Academic press, London, pp. 47–69.
- Wang, J., Su, P., Gu, Q., Li, W.D., Guo, J.L., Qiao, W., Feng, D.Q. and Tang, S.A., 2017.** Antifouling activity against bryozoan and barnacle by cembrane diterpenes from the soft coral *Sinularia flexibilis*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 120: 97–103. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.02.013
- Xie, Q., Pan, J., Ma, C. and Zhang, G., 2019.** Dynamic surface antifouling: mechanism and systems. *Soft Matter*, 15: 1087–1107. DOI: 10.1039/C8SM01853G
- Xin, X., Huang, G., Zhou, X., Sun, W., Jin, C., Jiang, W. and Zhao, S., 2017.** Potential antifouling compounds with antidiatom adhesion activities from the sponge-associated bacteria, *Bacillus pumilus*. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 31: 1028–1043. DOI: 10.1080/01694243.2016.1242219
- Yang, C., Sun, W., Liu, S. and Xia, C., 2015.** Comparative effects of indole derivatives as antifouling agents on the growth of two marine diatom species. *Chemistry and Ecology*, 31: 299–307. DOI: 10.1080/02757540.2015.1022536

Antifouling activity of sea cucumber (*Stichopus herrmanni*) extracts in laboratory and its performance in resin epoxy coats in the sea environment

Darya M.¹; Sajjadi M.M.^{1*}; Yousefzadi M.²; Sourinejad I.³; Zarei M.⁴

*mmsajjadi@hotmail.com

1- Department of Fisheries, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

2- Department of Marine Biology University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

3- Department of Fisheries, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

4- Department Of Chemistry, University Of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

Abstract

Development of natural and environmentally friendly antifouling agents is a suitable alternative to solve the global marine fouling problem. In the current study, antibacterial, anti-micro algal, anti-barnacle and antifouling activity of non-polar, semi-polar and polar extracts from three parts of the sea cucumber, *Stichopus herrmanni*, body (i.e. body wall, digestive tract and respiratory tree) were studied. The inhibitory activity assay of n-hexan, ethyl acetate and methanol extracts were evaluated against five bacterial strains, two microalgae species and barnacle larvae. In order to investigate the antifouling performance, the extracts were added to a resin epoxy coats and exposed in the sea water for the duration of three months. Based on Results, the ethyl acetate extract of the body wall with the lowest MIC against *S. aureus* (0.500 mg/ml) and *I. galbana* (0.125 mg/ml), and the lowest LC₅₀ against barnacle larvae (0.061 mg/ml), showed the best inhibitory activity. After three months treatment, the coated panels containing 4% extract of ethyl acetate from body wall had the lowest final weight (189.67 ± 5.51 g) and lowest fouling cover percentage (74.76%) among all the panels ($P < 0.05$). Regarding the high antifouling activity of ethyl acetate extract from the body wall of the sea cucumber *S. herrmanni*, it is recommended as a potential natural alternative for the antifouling coats.

Keywords: Secondary Metabolites, Sea Cucumber, Antifouling, Resin epoxy

*Corresponding author