

مقاله پژوهشی

ارزیابی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) به عنوان ماده طبیعی ضدچسبندگی موجودات مزاحم در رنگ اپوکسی برای کاربرد دریایی

محمد اسدی<sup>۱</sup>، احسان کامرانی<sup>۲</sup>، مرتضی یوسفزادی<sup>۳،۴\*</sup>، ایمان سوری نژاد<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: آذر ۹۸

تاریخ پذیرش: بهمن ۹۸

چکیده

نظر به تاثیرات منفی رنگ‌های سمی ضدچسبندگی موجودات مزاحم، تولید رنگ‌های غیرسمی به وسیله محصولات طبیعی و استفاده از آن‌ها در صنایع دریایی اهمیت زیادی دارد. مطالعه حاضر به بررسی خواص ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در فرمول رنگ اپوکسی می‌پردازد. فعالیت ضدچسبندگی زیستی اسانس با سنجش فعالیت‌های ضدباکتری، ضدریزجلبکی، ضدبارناکل و ضدآرتمیا ثابت شد. حداقل غلظت بازدارنده اسانس در باکتری‌های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به ترتیب ۰/۱۲۵ و ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در آزمایش ضدریزجلبک، اسانس آویشن باعث محدودیت رشد جلبک *Isochrysis galbana* به میزان ۵۰ درصد در غلظت  $52/19 \pm 17/67$  میلی‌گرم در لیتر شد. غلظت نیمه کشنده اسانس برای بارناکل و آرتمیا به ترتیب  $8/72 \pm 1/28$  و  $35/21 \pm 2/37$  میلی‌گرم در لیتر بود. به منظور بررسی عملکرد ضدچسبندگی زیستی، اسانس به نسبت‌های ۰ (شاهد)، ۱، ۲ و ۳ درصد به رنگ اضافه شد و پس از رنگ‌آمیزی روی صفحات فایبرگلاس به مدت سه ماه در محیط دریا قرار گرفت. در پایان ماه اول و دوم، پنل‌های حاوی ۳ درصد اسانس دارای کمترین وزن (به ترتیب  $78/81 \pm 22/2$  و  $178/44 \pm 65/58$  گرم) و کمترین درصد پوشش موجودات مزاحم (به ترتیب  $63/52 \pm 1/92$  و  $92/05 \pm 3/34$  درصد) بودند و با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند ( $P < 0/05$ ). بر اساس نتایج، فعالیت ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن شیرازی به میزان اسانس موجود در رنگ و میزان شستشوی آن‌ها در آب دریا بستگی دارد.

**واژگان کلیدی:** رنگ ضدچسبندگی زیستی، *Zataria multiflora* ترکیبات طبیعی، فعالیت زیستی.

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

۲- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

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

۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.

۵- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [morteza110110@gmail.com](mailto:morteza110110@gmail.com)

## مقدمه

سرعت طی چند روز تا هفته توسعه می‌یابند. نشست موجودات مزاحم در چندین مرحله به ترتیب: مرحله ۱) پوشش لیز نازک مولکول‌های آلی، مرحله ۲) کلونی اولیه: چسبیدن و رشد میکروارگانیزم‌های پیشگام (باکتری‌ها) و ایجاد لایه زنده، مرحله ۳) کلونی ثانویه: وجود این لایه میکروبی، مواد غذایی کافی را به منظور تثبیت گونه‌های چند سلولی (مانند اسپور جلبک) فراهم می‌کند و مرحله ۴) کلونی سطح سوم: جذب بیشتر ذرات و موجودات مانند لارو ماکروارگانیزم‌های دریایی (ماکروجلبک‌ها، اسفنج‌ها، مرجانیان (Cnidarians)، پرتاران، صدف‌ها، بارناکل‌ها، بربوزوا (Bryozoan) و تونیکات‌ها) است، انجام می‌شود (Qian et al., 2007).

نشست موجودات مزاحم سبب ایجاد هزینه‌های اقتصادی زیادی در آبرزی پروری، صنایع کشتی‌سازی و خطوط لوله زیر آب می‌شود (Willemsen, 2005; Schultz et al., 2011). بدین منظور پوشش‌های ضدچسبندگی زیستی برای جلوگیری از چسبیدن موجودات آبرزی توسعه یافتند. اولین تکنیک‌های پیشنهاد شده برای قایق‌های چوبی در گذشته قیر (Tar)، واکس (Wax)، فلزات

یکی از مشکلات عمده که امروزه صنایع دریایی با آن مواجه هستند مشکل نشست موجودات مزاحم (چسبندگی زیستی، Biofouling) روی سطوح است. برای رهایی از این مشکل صنایع دریایی سالانه حجم زیادی از مواد ضدچسبندگی زیستی (Antibiofouling) شیمیایی را استفاده می‌کنند که مضرات زیست‌محیطی زیادی ایجاد می‌کنند (Price and Morris, 2013).

نشست موجودات مزاحم یک مشکل برای تمام صنایع دریایی است و صنایع شیلاتی هم از این قاعده مستثنی نیستند. تورهای چند رشته‌ای که در صنعت پرورش ماهیان در قفس استفاده می‌شوند بستر ایده آل برای نشست موجودات مزاحم هستند به این دلیل که بافت تور زبر و سطح بزرگ آن است (Hodson and Burke, 1994; Edwards et al., 2015). موجودات مزاحم از طریق یک فرآیند اکولوژیکی شناخته شده بر روی سیستم‌های پرورش دریایی تجمع می‌کنند (Maki and Mitchell, 2002). این موجودات به دو دسته موجودات مزاحم چسبنده ریز (Microfouling) و موجودات مزاحم چسبنده درشت (Macrofouling) تقسیم می‌شوند که به

به (Sasikumar, 2014; Cuili et al., 2014) علت وجود خواص ضدباکتریایی و ضد میکروبی، عوامل ضدچسبندگی زیستی را می توان از منابع طبیعی از جمله گیاهان به دست آورد. این عصاره های طبیعی بهترین جایگزین برای رنگ های سنتی هستند و می تواند با استفاده از این مواد، ترکیب رنگ بدون فلز یا با پایه فلزی کم تر سمی تولید شود (Lim et al., 2006; Perez et al., 2006).

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) گیاهی معطر و از تیره نعناع است. سرشاخه های هوایی این گیاه حاوی اسانس روغنی (Essential Oil)، تانن ها، ساپونین ها و مواد ضد عفونی کننده است (زرگری، ۱۳۷۱). ترکیبات اسانس گیاه آویشن شیرازی از طریق کروماتوگرافی ستونی (CC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC) و کروماتوگرافی گازی (GC)، رزونانس مغناطیسی هسته ای (NMR) مایع متصل به طیف سنج جرمی (GLC/MS) مورد مطالعه قرار گرفته است و بیان شده است دو ماده فعال و مهم این گیاه، تیمول و کارواکرول هستند (Shafiee and Javidnia, 1997; Mohagheghzadeh et al., 2000; Ebrahimzadeh et al., 2003). در مطالعه ای ترکیبات شیمیایی اسانس آویشن کوهی مناطق

سنگین (سرب، Lead) و یا پوشش های سمی (بر پایه آرسنیک، Arsenic-based) بودند (WHOI, 1952). از سال ۱۹۷۰ به منظور کنترل چسبندگی موجودات مزاحم روی بدنه کشتی ها به طور گسترده ای از رنگ های ضدچسبندگی موجودات مزاحم حاوی تری بوتیل تین (Tributyltin: TBT) استفاده می شد. با وجود عملکرد بالای این رنگ ها، به دلیل اثرات مخرب زیست محیطی در سال ۲۰۰۸ ممنوع شدند و رنگ های ضدچسبندگی زیستی حاوی مس جایگزین آن ها شدند. استفاده گسترده از مس سبب تجمع مس و ترکیبات آن در محیط دریایی شد. محدودیت رنگ های ضدچسبندگی زیستی حاوی مس در بسیاری از کشورهای غربی آغاز شده است (Joshi et al., 2013). مس برای بسیاری از بی مهرگان دریایی به ویژه در مراحل لاروی (Beveridge, 2004)، ماکرو جلبک ها (Bond et al., 1999)، میکرو جلبک ها (Lim et al., 2006)، کلم ها (Clams) (Munari and Mistri, 2007) و ماهی ها بسیار سمی است. در طول دهه گذشته، توسعه و ساخت رنگ های دریایی غیرسمی یا سمیت متوسط و سازگار با محیط زیست یک چالش بزرگ برای پژوهشگران بوده است (Ananda and

ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن پرداخته شد.

آزمایش فعالیت‌های ضدباکتریایی (Noor Suresh, 2015)، ضد ریز جلبکی (Idora et al., 2015) و ضد بارناکل ترکیباتی که به عنوان مواد ضدچسبندگی زیستی بالقوه مدنظر هستند، مهم‌ترین گام آزمایشگاهی در یافتن مواد ضدچسبندگی زیستی جدید است (Yang et al., 2015). همچنین آزمون آرتمیا یک روش کاربردی در ارزیابی غربالگری و جداسازی ترکیبات فعال زیستی است و در حدود ۳۰ سال است که از آرتمیا برای بررسی سمیت‌های کلی و سم‌شناسی محیطی استفاده می‌شود (Costello et al., 1993). در مطالعه حاضر ابتدا فعالیت ضد میکروبی (بر دو گونه باکتری)، مهارکنندگی رشد ریز جلبک و سمیت آن بر دو زئوپلانکتون آرتمیا و لارو بارناکل در محیط آزمایشگاه بررسی شد و در ادامه با توجه به نتایج بررسی آزمایشگاهی، غلظت اسانس آویشن در رنگ رزین اپوکسی تعیین شد و برای بررسی عملکرد ضدچسبندگی زیستی رنگ، قطعات فایبرگلاس با پوشش این رنگ ساخته شد و در محیط دریا مورد آزمون قرار گرفت.

مختلف با یکدیگر مقایسه شد و گزارش شد مهم‌ترین ترکیبات همه آن‌ها کارواکرول و تیمول بود و تفاوت در میزان این ترکیبات در بین جمعیت‌های مورد بررسی به علت تفاوت در عوامل اکولوژی و جغرافیایی بود (Mazooji et al., 2012). تیمول نوعی فنل است که در فرآورده‌های دارویی به عنوان ثابت کننده به کار می‌رود و دارای اثر ضد عفونی‌کنندگی است. کارواکرول که ترکیب اصلی اسانس آویشن را تشکیل می‌دهد، یک منوترین فنولی است که ایزومر تیمول است (Amanlou et al., 2005). اسید رزمارینیک یکی دیگر از مواد فعال موجود در اسانس این گیاه است که دارای اثرات ضدباکتری، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است (Osakabe et al., 2004).

با توجه به اثر ضدباکتریایی اسانس آویشن و این که باکتری‌ها اولین لایه زنده چسبندگی زیستی را ایجاد می‌کنند و شرایط لازم و مواد غذایی کافی را به منظور تثبیت گونه‌های چند سلولی مانند ریز جلبک‌ها و موجودات مزاحم چسبنده بزرگ فراهم می‌کنند (Qian et al., 2007)، در این مطالعه به بررسی اثرات

## مواد و روش‌ها

### تهیه اسانس

اسانس استاندارد آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) استفاده شده در این مطالعه از شرکت دانش بنیان زردبند تهران خریداری شد و در ظروف شیشه‌ای تیره و در بسته بدون قرارگیری در معرض نور و هوای آزاد، به آزمایشگاه شیلات دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان منتقل شد.

### آماده کردن اسانس‌ها

با توجه به این که اسانس آویشن در محیط‌های کشت نامحلول است، به یک حلال بدون داشتن اثرات ضد میکروبی که اسانس را در خود حل کند نیاز است. از این رو، از ماده دی‌متیل سولفواکسید (DMSO) به عنوان حلال استفاده شد (CLSI, 2017).

### بررسی فعالیت ضدباکتریایی

در این آزمایش از دو سویه باکتری *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* استفاده شد. برای هر باکتری یک سری ۱۱ تایی از لوله‌های آزمایش استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت مایع مولر هینتون از ۱ تا ۱۱ شماره‌گذاری شد و به ترتیب از لوله شماره ۱ تا ۱۱ غلظت‌های ۰/۵۰۰، ۰/۲۵۰، ۰/۱۲۵،

۰/۰۶۲، ۰/۰۳۱، ۰/۰۱۵، ۰/۰۰۷، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در لیتر، شاهد (بدون اسانس آویشن) و شاهد DMSO (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تهیه شد و برای هر باکتری در سه تکرار انجام شد (CLSI, 2017). باکتری‌ها که قبلاً کشت مایع داده شده بودند، با غلظت مشخص به لوله‌های حاوی محیط کشت و عصاره اضافه شدند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. 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 در میلی‌لیتر گزارش شد (CLSI, 2017).

اثر مهارکنندگی اسانس آویشن بر رشد ریزجلبک

به طور کلی در این مطالعه آزمون‌های سم‌شناسی حاد به مدت ۷۲ ساعت و بر اساس رهنمود استاندارد شماره ۲۰۱ سازمان توسعه و همکاری اقتصادی انجام شد (OECD, 2011). با توجه به این که محیط‌های کشت و شرایط کشت جلبک در استاندارد یاد شده برای جلبک‌های آب شیرین طراحی شده است، در مطالعه حاضر برای کشت جلبک دریایی

در ۶ تکرار انجام شد. نرخ رشد ( $\mu$ ) و درصد بازدارندگی متوسط رشد ویژه ( $Ir$ ) از رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد (Yang et al., 2015).

رابطه ۱:

$$\mu = (\ln N_2 - \ln N_1) / (t_2 - t_1)$$

$N_1$ : جذب نوری (OD) در آغاز فاز رشد ریزجلبک؛  
 $N_2$ : جذب نوری در پایان فاز رشد ریزجلبک؛  
 $t_2 - t_1$ : فاصله زمانی بین آغاز و پایان آزمایش (روز).

رابطه ۲:

$$Ir (\%) = [(\mu_c - \mu_t) / \mu_c] \times 100$$

$\mu_c$ : مقدار متوسط نرخ رشد ویژه در گروه شاهد؛  
 $\mu_t$ : مقدار متوسط نرخ رشد ویژه در هر یک از گروه‌های در معرض اسانس آویشن شیرازی بعد از ۷۲ ساعت.

مقادیر غلظت‌های بازدارنده ( $IC$ ) و غلظت بازدارنده میانی ( $IC_{50}$ ) نیز بر اساس درصد بازدارندگی متوسط رشد ویژه در غلظت‌های مختلف و با استفاده از نرم‌افزار پروبیت (EPA Probit Analysis) نسخه ۱/۵ (منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا) محاسبه شد (OECD, 2011).

بررسی اثر سمیت اسانس بر لارو بارناکل

بارناکل بالغ *Amphibalanus amphitrite*

در زمان بیشینه جزر از سواحل بندرعباس جمع‌آوری و به همراه آب دریا به آزمایشگاه

*Isochrysis galbana* این استاندارد با توجه به روش استاندارد موجود برای کشت جلبک‌های آب شور تعدیل شد. ذخیره اولیه ریزجلبک *I. galbana* از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان در بندرعباس تهیه شد. ریزجلبک مورد نظر در محیط کشت F/2 با روشنایی  $1000 \pm 50$  لوکس، تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۷-۲۵ ppt و pH ۷-۸ کشت شد (Banerjee et al., 2011).

اثر مهارکنندگی اسانس آویشن بر رشد ریزجلبک *I. galbana* در لوله آزمایش ( $16 \times 100$  میلی‌متر) بررسی شد. هر لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر محیط کشت F/2 همراه با ریزجلبک با تراکم سلولی  $1.04 \times 10^4$  سلول در میلی‌لیتر بود که در معرض ۹ غلظت اسانس آویشن (۰، ۳/۹، ۷/۸۱، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفتند. برای محاسبه تراکم، هر ۲۴ ساعت تعداد سلول‌ها با لام هموسیتومتر شمارش شد و همچنین جذب نوری هر لوله در طول موج ۶۸۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil Instruments, Aquarius CE 7200، انگلستان) خوانده شد. رشد ریزجلبک در مدت ۳ روز مورد بررسی قرار گرفت و تمام آزمایش

دمای ۲۹-۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در مجاورت نور تخم‌گشایی شد. بعد از خروج از تخم، تعداد ۱۰ ناپلی آرتیمیا به پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت سلول که از قبل حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب دریا بودند، اضافه شد و در معرض غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس آویشن قرار گرفت. تعداد مرگ و میر ناپلی آرتیمیا در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بعد از قرار گرفتن در مجاورت اسانس با ذره‌بین شمارش شد و مورد بررسی قرار گرفت (Hisem et al., 2011). این آزمایش در حضور شاهد مثبت (حاوی حلال‌ها) و شاهد منفی (حاوی آب دریا) و با ۳ تکرار برای هر غلظت صورت پذیرفت (Mongelli et al., 1996).

#### بررسی رنگ ضدچسبندگی موجودات مزاحم حاوی اسانس آویشن در محیط دریا

به منظور تهیه پوشش ضدچسبندگی موجودات مزاحم، از پایه رنگ رزین اپوکسی (EP-400، پارس پامچال، ایران) و سخت‌کننده مخصوص آن (E-100، پارس پامچال، ایران) استفاده شد. به منظور ساخت رنگ ضدچسبندگی موجودات مزاحم، به نسبت‌های ۳، ۲ و ۱ درصد وزن نهایی رنگ (مجموع وزن

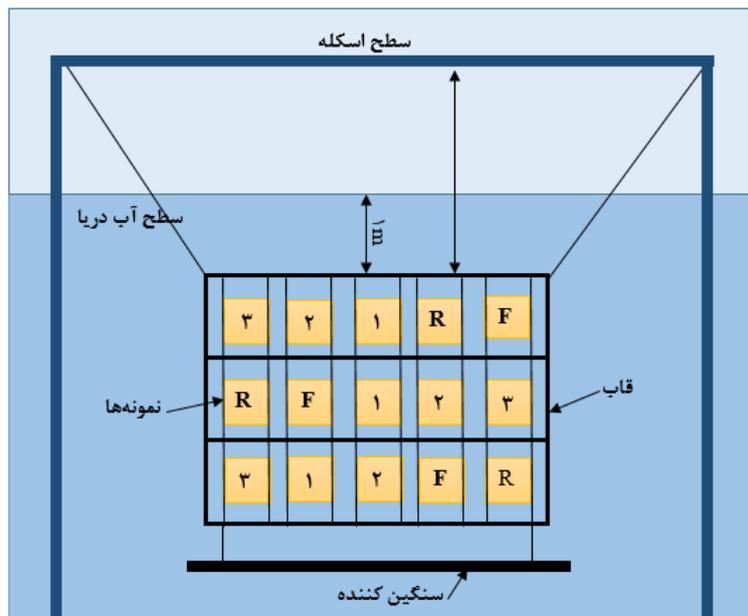
پلانکتون دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان منتقل شد. بارناکل‌های جدا شده در ظرف‌هایی حاوی ۲ لیتر آب دریا با شوری ۳۵ppt، دمای  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد همراه با هوادهی تا زمان تولید لارو نگهداری شدند و در این فاصله با ریز جلبک تغذیه شدند (Piazza et al., 2011). پس از این که بارناکل‌ها شروع به رهاسازی لارو کردند، با توجه به نورگرایی مثبت آن‌ها با ایجاد نور متمرکز، لاروهای جذب شده به سوی نور به وسیله پیپت جمع‌آوری شدند. برای بررسی سمیت عصاره‌ها بر لارو بارناکل، تعداد ۱۰ ناپلی لارو به پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت سلول که از قبل حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آب دریا بودند اضافه شدند و در معرض غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس آویشن قرار گرفتند. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده و زنده بررسی و شمارش شدند و غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50}$ ) اسانس آویشن برحسب میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد (Liu et al., 2018).

بررسی اثر سمیت اسانس بر ناپلی آرتیمیا  
سیست آرتیمیا *Artemia franciscana* در  
ظروف مخروطی در شوری ۳۰ppt، pH ۷/۲-۹

شامل قطعات فایبرگلاس با پوشش رزین اپوکسی فاقد اسانس (R) و قطعات فایبرگلاس فاقد هر گونه پوشش (رنگ نشده (F)) بود (Noor Idora et al., 2015).

قطعات فایبرگلاس روی یک قاب از جنس لوله پلی اتیلن نصب شد و برای بررسی اثر ضدچسبندگی موجودات مزاحم به بندر شهید حقانی بندرعباس منتقل و روی اسکله شناور شماره ۱۱ با طناب (شکل ۱) به مدت ۳ ماه متصل شد.

رزین اپوکسی و سخت کننده) به آن اسانس آویشن افزوده شد و با هموژنایزر (D-160، Dragon Lab، چین) کاملاً مخلوط شد (نسبت سخت کننده به رزین اپوکسی با توجه به توصیه شرکت سازنده ۲۲ به ۷۸ درصد بود). سپس از رنگ‌های ساخته شده برای پوشش قطعات فایبرگلاس با ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی متر و ضخامت ۱ میلی‌متر استفاده شد. این مطالعه در ۵ تیمار و هر کدام در ۳ تکرار صورت پذیرفت که شامل ۳ تیمار آزمایش (قطعات فایبرگلاس با پوشش ۱، ۲ و ۳ درصد اسانس آویشن) و ۲ تیمار شاهد



شکل ۱: طراحی آزمایش ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن شیرازی در محیط دریا



۱۶ انجام شد. مقادیر غلظت‌های کشنده (LC) و غلظت نیمه کشنده (LC<sub>50</sub>) با استفاده از نسخه ۱/۵ نرم‌افزار پروبیت (EPA Probit Analysis)، منتشر شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست امریکا) محاسبه شد.

### نتایج

#### فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی

نتایج نشان داد که در بین دو سویه باکتری مورد بررسی، اسانس آویشن حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC) پایین‌تری را بر باکتری *Staphylococcus aureus* (۰/۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به باکتری *Escherichia coli* (۰/۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نشان داد.

#### اثر مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی بر

##### رشد ریزجلبک

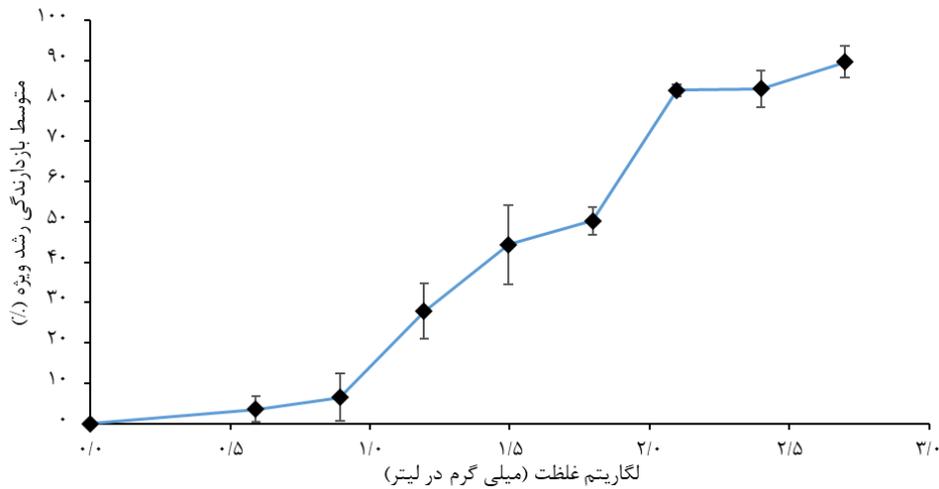
شکل ۲ اثرات غلظت‌های مختلف اسانس آویشن در مدت ۷۲ ساعت برای تراکم زی‌توده ریزجلبک *Isochrysis galbana* نشان داده شده است. بر این اساس، بیشترین میزان تراکم زی‌توده بعد از ۷۲ ساعت در گروه شاهد (۲۵/۲۳۵×۱۰<sup>۴</sup> سلول در هر میلی‌لیتر) بود که بیش از ۲۳/۲۸۸ برابر نسبت به زمان شروع آزمایش افزایش یافت. در مقابل در گروه‌هایی که

قاب هر ۳۰ روز یک بار از آب بیرون آورده شد و هر قطعه فایبرگلاس از آن جدا شده و وزن آن اندازه‌گیری و از آن برای بررسی درصد پوشش عکس‌برداری شد. بر اساس میزان نشست موجودات روی سطح قطعات فایبرگلاس و اختلاف رنگ آن‌ها (موجودات دارای رنگ تیره بودند) با قطعات (دارای رنگ روشن بودند)، ابتدا عکس‌ها به سیاه و سفید تبدیل شد و بر اساس پیکسل و با نرم‌افزار ImageJ میزان سطوح با رنگ روشن (عدم پوشش) و تیره (پوشش یافته) محاسبه و میانگین آن به درصد بیان شد (Rasband, 2011; Braithwaite et al., 2007).

### تحلیل آماری

بررسی عکس قطعات فایبرگلاس و تعیین درصد پوشش موجودات چسبنده مزاحم با نرم‌افزار ImageJ 1.44p انجام شد. ثبت داده، محاسبه میانگین و رسم نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel 2016 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های وزنی و درصد پوشش موجودات چسبنده مزاحم توسط آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی (Tukey) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0/05$ ) در نرم‌افزار SPSS نسخه





شکل ۳: درصد بازدارندگی رشد ویژه ریزجلبک *Isochrysis galbana* پس از ۷۲ ساعت رویارویی با غلظت‌های مختلف اسانس آویشن (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

جدول ۳ بیان شده است. با توجه به داده‌های آزمون‌های ابتدائی و اصلی، مقادیر بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت (NOEC) و کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت (LOEC) در لارو بارناکل به ترتیب ۱/۲۵ و ۲/۵۰ و در لارو ناپلی آرتمیا *A. franciscana* به ترتیب ۲۰ و ۱۲/۵۰ میلی‌گرم در لیتر برآورد شد.

#### فعالیت ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن شیرازی در محیط دریا

در جدول ۴ نتایج اثر ضدچسبندگی موجودات مزاحم اسانس آویشن بر اساس وزن موجودات چسبنده مزاحم قرار گرفته روی

بر اساس بررسی داده‌های مربوط به درصد بازدارندگی رشد ویژه در غلظت‌های مختلف اسانس آویشن برای جلبک *I. galbana* با استفاده از نرم‌افزار پروبیت (جدول ۱) بعد از ۷۲ ساعت، غلظت بازدارنده میانی ( $IC_{50}$ )  $52/186 \pm 17/67$  میلی‌گرم در لیتر برآورد شد.

#### اثر سمیت اسانس آویشن شیرازی بر لارو بارناکل و ناپلی آرتمیا

نتایج مربوط به مقادیر غلظت‌های کشنده (LC) ۲۴ ساعته اسانس آویشن و حدود اطمینان مربوط به هر یک از آن‌ها در بارناکل *A. amphitrite* در جدول ۲ و در آرتمیا در

قطعات فایبرگلاس در محیط دریا به مدت ۳ ماه نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، کمترین وزن در هر ۳ ماه مربوط به تیمار آویشن ۳ درصد بود که در ماه‌های اول  $78/81 \pm 2/22$  (گرم) و دوم  $178/44 \pm 6/58$  (گرم) با تیمارهای شاهد بدون اسانس آویشن (ماه اول  $195/01 \pm 3/31$  گرم و ماه دوم  $93/86 \pm 1/55$  گرم) و رنگ نشده (ماه اول  $93/04 \pm 1/72$  و ماه دوم  $196/59 \pm 1/35$  گرم) تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/05$ ). بین تیمارهای آویشن با یکدیگر تفاوت معنی‌داری در ماه اول و دوم مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). تیمارهای ۱ و ۲ درصد آویشن در ماه‌های اول و دوم با وجود این که بعد از آویشن ۳ درصد وزن کمتری را در بین تیمارها نشان دادند ولی تفاوت آن‌ها با تیمارهای دیگر معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). نتایج وزن در ماه سوم بین تیمارها هیچ تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ( $P > 0/05$ ).

جدول ۱: مقادیر غلظت‌های بازدارنده (IC) ۷۲ ساعته اسانس آویشن و حدود اطمینان مربوط به هر یک از آن‌ها در ریزجلیک *Isochrysis galbana*

حدود اطمینان ۹۵ درصد (میلی‌گرم در لیتر)		غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت بازدارنده
حد بالا	حد پایین		
۳/۲۱۵	۰/۴۵۸	۱/۵۲۲	IC <sub>1</sub>
۷/۴۷۲	۱/۷۴۵	۴/۲۳۴	IC <sub>5</sub>
۱۱/۸۱۳	۳/۵۳۱	۷/۳۰۷	IC <sub>10</sub>
۱۶/۱۹۰	۵/۶۴۹	۱۰/۵۶۱	IC <sub>15</sub>
۷۰/۸۱۶	۳۵/۶۵۲	۵۲/۱۸۶	IC <sub>50</sub>
۴۵۵/۶۷۶	۱۵۲/۹۵۸	۲۳۷/۵۷۸	IC <sub>85</sub>
۷۳۰/۰۷۸	۲۰۹/۳۰۸	۳۴۳/۳۶۱	IC <sub>90</sub>
۱۴۷۹/۷۹۰	۳۳۰/۴۳۶	۵۹۲/۵۶۴	IC <sub>95</sub>
۵۶۴۸/۰۲۲	۷۶۷/۰۲۸	۱۶۴۸/۹۹۴	IC <sub>99</sub>

جدول ۲: مقادیر غلظت‌های کشنده (LC) ۲۴ ساعته اسانس آویشن و حدود اطمینان مربوط به هر یک از آن‌ها در لارو بارناکل *Amphibalanus amphitrite*

حدود اطمینان ۹۵ درصد (میلی‌گرم در لیتر)		غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت بازدارنده
حد بالا	حد پایین		
۴/۵۷۲	۲/۱۴۶	۳/۴۷۷	LC <sub>1</sub>
۵/۶۷۱	۳/۱۲۲	۴/۵۵۱	LC <sub>5</sub>
۶/۳۷۵	۳/۸۰۵	۵/۲۵۴	LC <sub>10</sub>
۶/۹۰۶	۴/۳۴۳	۵/۷۸۹	LC <sub>15</sub>
۹/۹۳۹	۷/۴۰۷	۸/۷۲۰	LC <sub>50</sub>
۱۵/۷۲۸	۱۱/۴۸۹	۱۳/۱۳۶	LC <sub>85</sub>
۱۷/۸۰۳	۱۲/۵۵۲	۱۴/۴۷۳	LC <sub>90</sub>
۲۱/۵۲۱	۱۴/۲۲۴	۱۶/۷۰۹	LC <sub>95</sub>
۳۱/۰۵۸	۱۷/۷۸۷	۲۱/۸۷۴	LC <sub>99</sub>

جدول ۳: مقادیر غلظت‌های کشنده (LC) ۲۴ ساعته اسانس آویشن و حدود اطمینان مربوط به هر یک از آن‌ها در لارو ناپلی آرتمیا *Artemia franciscana*

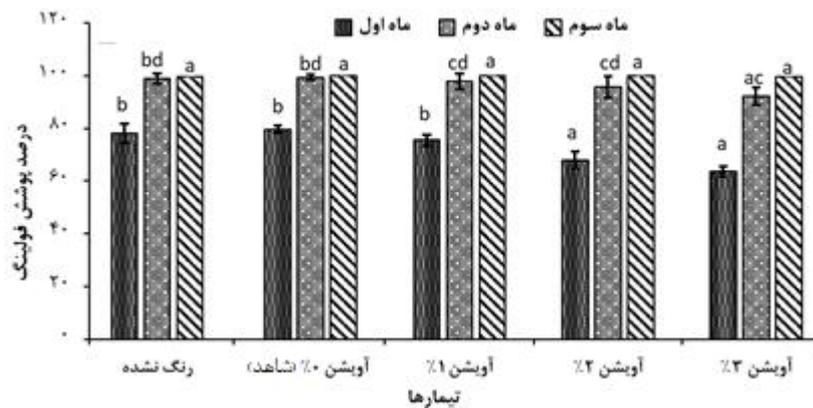
حدود اطمینان ۹۵ درصد (میلی‌گرم در لیتر)		غلظت (میلی‌گرم در لیتر)	غلظت بازدارنده
حد بالا	حد پایین		
۲۱/۷۱۶	۱۵/۱۵۴	۱۸/۸۵۵	LC <sub>1</sub>
۲۵/۲۹۸	۱۹/۱۴۴	۲۲/۶۴۰	LC <sub>5</sub>
۲۷/۴۷۵	۲۱/۶۵۹	۲۴/۹۵۹	LC <sub>10</sub>
۲۹/۰۷۲	۲۳/۵۲۲	۲۶/۶۵۸	LC <sub>15</sub>
۳۷/۵۱۵	۳۲/۸۰۷	۳۵/۲۱۰	LC <sub>50</sub>
۵۱/۱۴۹	۴۳/۳۰۶	۴۶/۵۰۷	LC <sub>85</sub>
۵۵/۴۲۷	۴۵/۹۲۵	۴۹/۶۷۲	LC <sub>90</sub>
۶۲/۵۷۵	۴۹/۹۸۵	۵۴/۷۶۱	LC <sub>95</sub>
۷۸/۸۸۵	۵۸/۳۵۰	۶۵/۷۵۴	LC <sub>99</sub>

جدول ۴: مقایسه تغییرات وزن موجودات مزاحم چسبنده در تیمارهای شاهد و رنگ طبیعی ضدچسبندگی زیستی اپوکسی حاوی اسانس آویشن بعد از قرارگیری در محیط دریا (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد)

تیمار	رنگ نشده	آویشن ۰ درصد (شاهد)	آویشن ۳ درصد	آویشن ۲ درصد	آویشن ۱ درصد
وزن اولیه	۱۳/۱۷ $\pm$ ۱/۲۴ <sup>a</sup>	۱۳/۶۳ $\pm$ ۱/۸۹ <sup>a</sup>	۱۳/۲۵ $\pm$ ۱/۵۹ <sup>a</sup>	۱۳/۴۳ $\pm$ ۲/۳۱ <sup>a</sup>	۱۳/۰۳ $\pm$ ۰/۷۱ <sup>a</sup>
ماه اول	۹۳/۰۴ $\pm$ ۱/۷۲ <sup>b</sup>	۹۳/۸۶ $\pm$ ۱/۵۵ <sup>b</sup>	۷۸/۸۱ $\pm$ ۲/۲۳ <sup>a</sup>	۸۱/۱۱ $\pm$ ۰/۳۲ <sup>ab</sup>	۹۰/۵ $\pm$ ۶/۶۶ <sup>ab</sup>
ماه دوم	۱۹۶/۵۹ $\pm$ ۱/۳۵ <sup>b</sup>	۱۹۵/۰۱ $\pm$ ۳/۳۱ <sup>b</sup>	۱۷۸/۴۴ $\pm$ ۶/۵۸ <sup>a</sup>	۱۸۵/۵۱ $\pm$ ۴/۷۱ <sup>ab</sup>	۱۸۶/۲۲ $\pm$ ۶/۱۷ <sup>ab</sup>
ماه سوم	۲۶۰/۹۱ $\pm$ ۱/۹۴ <sup>a</sup>	۲۶۱/۸۱ $\pm$ ۲/۹۴ <sup>a</sup>	۲۵۸/۸۷ $\pm$ ۷/۹۳ <sup>a</sup>	۲۶۰/۹۵ $\pm$ ۵/۵۱ <sup>a</sup>	۲۶۲/۵۱ $\pm$ ۶/۷۴ <sup>a</sup>

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در بین تیمارها است ( $P < 0.05$ ).

شکل ۴ نتایج محاسبه درصد موجودات چسبنده مزاحم نشسته بر روی تیمارهای آزمایشی در دوره سه ماهه در محیط دریا را نشان می‌دهد. این نتایج نشان داد که پس از پایان ماه اول درصد پوشش موجودات



شکل ۴: درصد پوشش موجودات چسبنده مزاحم ایجاد شده روی فایبرگلاس‌های پوشش داده شده با رنگ اپوکسی بدون اسانس آویشن (شاهد) و حاوی ۱، ۲ و ۳ درصد اسانس آویشن (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد). حروف متفاوت روی ستون‌های هم شکل نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین آن‌ها است ( $P < 0.05$ ).

درصد) و تیمول (۱۷/۲۳ درصد) (شهسوار و همکاران، ۱۳۸۷). اگرچه تاکنون اسانس گیاهان دارویی چون آویشن شیرازی به عنوان مواد ضد میکروبی، ضد درد، ضد التهاب و آنتی اکسیدان مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است و حتی پژوهش‌هایی درباره اثرات سمیت سلولی اسانس‌های این گیاهان بر مبنای مدل سیتوتوکسیک آرتیمیا (بارانی و همکاران، ۱۳۹۲) و نیز رده‌های سلولی سرطانی انسانی (Yousefzadi et al., 2013) انجام شده است، اما در ارتباط با تاثیر طبیعی ضدچسبندگی زیستی اسانس این گیاه اطلاعاتی وجود ندارد. از این رو یافتن حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC) روی دو سویه باکتری، غلظت بازدارنده میانی (IC<sub>50</sub>) ریزجلبک *I. galbana* غلظت نیمه کشنده (LC<sub>50</sub>) لاروهای بارناکل *A. amphitrite* و آرتیمیا *A. franciscana* به عنوان آزمایش‌های استاندارد تعیین طبیعی ضدچسبندگی زیستی در آزمایشگاه و بررسی وزن زنده و میزان پوشش موجودات نشست کرده روی قطعات فایبرگلاس تیمار شده با رنگ رزین اپوکسی حاوی اسانس آویشن در محیط دریا، برای تعیین فعالیت طبیعی ضدچسبندگی زیستی این اسانس انجام شد.

درصد پوشش موجودات چسبنده مزاحم در تیمارهای شاهد بدون اسانس و رنگ نشده با تیمارهای رنگ طبیعی ضد موجودات چسبنده مزاحم حاوی ۲ و ۳ درصد اسانس آویشن (به ترتیب ۶۸/۳±۰۱/۱۰ و ۶۳/۵۲±۱/۹۲ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/05$ )، ولی با تیمار رنگ طبیعی ضدچسبندگی زیستی ۱ درصد اسانس آویشن (۷۵/۴۲±۲/۱۲ درصد) تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند ( $P > 0/05$ ). در ماه دوم فقط تیمار رنگ طبیعی ضدچسبندگی زیستی حاوی ۳ درصد اسانس آویشن (۹۲/۰۵±۳/۳۴ درصد) با تیمارهای دیگر تفاوت معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ) و تفاوت بین دیگر تیمارها معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). در ماه سوم هیچ کدام از تیمارها تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند ( $P > 0/05$ ).

## بحث

اسانس‌ها ترکیبات فرار طبیعی و پیچیده‌ای هستند که توسط گیاهان معطر به عنوان متابولیت ثانویه تولید می‌شوند. تجزیه اسانس آویشن شیرازی با GC/MS منجر به شناسایی ترکیبات عمده تشکیل دهنده آن شده است. در آویشن شیرازی این ترکیبات عبارت هستند از کارواکرول (۲۶/۰۸ درصد)، پاراسیمین (۲۰/۳۴

## فعالیت ضدباکتریایی اسانس آویشن

نتایج بررسی حداقل غلظت مهار کننده رشد اسانس آویشن روی دو سویه باکتری *Staphylococcus aureus* (۰/۱۲۵ میلی گرم در میلی لیتر) و *Escherichia coli* (۰/۲۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) در این مطالعه حاکی از اثر مهارکنندگی این اسانس روی این دو باکتری بود. بیان شده است که نسبت ترکیبات اصلی اسانس آویشن شیرازی در مناطق مختلف متفاوت است (Zarezadeh et al., 2013) و (Najafpour Navaie and Mirza, 2014) اثر ضدباکتریایی اسانس آویشن شیرازی مربوط به دو ترکیب اصلی این اسانس یعنی تیمول و کارواکرول است (Kim et al., 1995). همچنین در بررسی دیگری روی پنج سویه باکتری، اثرات ضدباکتریایی کارواکرول گزارش شده است (Obaidat et al., 2011). کارواکرول به دلیل طبیعت هیدروفوبی، با دو لایه لیپیدی غشای سیتوپلاسمی برهم کنش می کند و سبب تخریب غشا و نشت مواد سلولی مانند یون ها، آدنوزین تری فسفات (ATP) و اسید نوکلئیک می شود (Trombetta et al., 2005). به عبارت دیگر اثر کشندگی و ضدباکتریایی کارواکرول شبیه ترکیبات فنلی دیگر است و منجر به مرگ باکتری می شود (Ultee et al., 2002).

## اثر مهارکنندگی اسانس آویشن شیرازی بر رشد ریزجلبک

رهنمود استاندارد شماره ۲۰۱ «سازمان توسعه و همکاری اقتصادی» بیان می دارد که در آزمون های سم شناسی حاد بر روی جلبک های تک سلولی، تعداد سلول ها در گروه شاهد طی ۷۲ ساعت باید حداقل ۱۶ برابر افزایش یابد (OECD, 2011). بر این اساس، افزایش نزدیک به ۲۳ برابری زیتوده جلبکی در پژوهش حاضر نشان می دهد کشت در شرایط استاندارد انجام شده است و سلول های جلبکی نیز از توانایی کافی برای رشد و تکثیر برخوردار بوده اند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه، اسانس آویشن حتی در کمترین غلظت مورد آزمون نیز باعث ایجاد سمیت در ریزجلبک دریایی *I. galbana* شد و در واقع حضور این اسانس در محیط کشت جلبک یاد شده مانع تقسیم سلولی و افزایش عادی تعداد سلول ها شد. همچنین بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش هرچه بیشتر غلظت اسانس آویشن در محیط کشت، کاهش رشد جلبک ها نیز بیشتر قابل مشاهده بود که نشان می دهد تاثیر این اسانس بر ریزجلبک مورد مطالعه وابسته به غلظت است. از طرفی با گذشت زمان، اختلاف رشد جلبک های گروه شاهد با گروه های تحت



فعال زیستی است و از آرتمیا برای بررسی سمیت‌های کلی و سم‌شناسی محیطی استفاده می‌شود (Costello et al., 1993). بر اساس پروتکل‌های موجود چنانچه  $LC_{50}$  یک گیاه پایین‌تر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش شود، گیاه سمی محسوب می‌شود (Silva et al., 2007). نتایج پژوهش حاضر نشان داد مقادیر بیشترین غلظت فاقد اثر سمیت (NOEC)، کمترین غلظت ایجاد کننده سمیت (LOEC) و غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50}$ ) در لارو آرتمیا *A. franciscana* (جدول ۳) به ترتیب ۲۰، ۱۲/۵۰ و ۳۵/۲۱۰ میلی‌گرم در لیتر و در لارو بارناکل *A. amphitrite* (جدول ۲) به ترتیب ۱/۲۵، ۲/۵۰ و ۸/۷۲۰ میلی‌گرم در لیتر برآورد شد. بنابراین آویشن شیرازی اثر سمیت قوی روی لارو بارناکل *A. amphitrite* و لارو ناپلیوس آرتمیا *A. franciscana* داشته است که با نتایج مشجور و همکاران (۱۳۹۴) که به بررسی اثرات سمیت عصاره آویشن شیرازی روی *Artemia salina* پرداختند و  $LC_{50}$  عصاره متانولی آویشن شیرازی را کوچک‌تر از ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند، مطابقت داشت. در تایید نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای غلظت نیمه کشنده ( $LC_{50}$ ) اسانس آویشن شیرازی طی مدت زمان ۹۶ ساعت برای بچه

تیمار اسانس بیشتر قابل مشاهده بود که نشان دهنده تاثیر وابسته به زمان اسانس آویشن بر جلبک است.

مطالعات نشان داده است که اثر سمیت حاد اسانس آویشن در آبزیان در نتیجه وجود دو ترکیب تیمول و کارواکرول است (Amanlou et al., 2005). کارواکرول نه تنها باعث مهار جمعیت میکروبی می‌شود بلکه با افزایش نفوذپذیری غشای قارچ‌ها، آن‌ها را نسبت به مواد دیگر ضدقارچی حساس و آسیب‌پذیر می‌کند (Helander et al., 1998). در دو مطالعه متفاوت اثر کارواکرول بر قارچ *Candida albicans* بررسی شد و تاثیر ضدقارچی بسیار خوب این ماده بر روی این قارچ گزارش شد (Obaidat et al., 2011; Vardar-; Unlu et al., 2010). ممکن است علت سمیت، کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد جلبک *I. galbana* در حضور اسانس آویشن نیز به علت افزایش نفوذپذیری غشای جلبک در اثر کارواکرول باشد.

#### اثر سمیت اسانس آویشن بر لارو بارناکل و ناپلی آرتمیا

آزمون سمیت آرتمیا یک روش کاربردی در ارزیابی غربالگری و جداسازی ترکیبات

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی، ۱۳/۶ میلی‌گرم در لیتر گزارش شد که پس از آنالیز شیمیایی اسانس آویشن شیرازی به روش GLC/MS مشخص شد بیشترین مواد تشکیل دهنده آویشن شیرازی فلاونوئیدها عمدتاً تیمول به میزان ۳۹ درصد و کارواکرول ۳۶ درصد بود و دلیل مسمویت ماهیان را این دو ترکیب بیان کردند (شریف روحانی و همکاران، ۱۳۹۰).

#### فعالیت ضدچسبندگی زیستی اسانس آویشن در محیط دریا

در مطالعات بسیاری تاثیر ترکیبات فنلی بر عدم چسبندگی موجودات مزاحم مورد بررسی قرار گرفته است. طی مطالعات صورت گرفته توسط Dambolena و همکاران (۲۰۱۲) بر روی تاثیر ترکیبات فنلی تیمول بر عدم چسبندگی موجودات مزاحم مشخص شد که این ترکیب به طور موثری موجب عدم چسبندگی لارو ناپلیوس بارناکل می‌شود. در مطالعه‌ای Perez و همکاران (۲۰۱۴) ترکیبات فنلی را به عنوان یک ماده طبیعی ضدچسبندگی موجودات مزاحم مورد بررسی قرار دادند و نتایج این مطالعه نشان داد که تیمول مانع از چسبندگی لارو ناپلیوس بارناکل در محیط

آزمایشگاهی می‌شود. در پژوهش حاضر (جدول ۴) کمترین وزن قطعات فایبرگلاس در هر سه ماه مربوط به تیمار آویشن ۳ درصد بود که در ماه اول و دوم با تیمارهای بدون اسانس آویشن (شاهد) و رنگ نشده تفاوت معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). فعالیت بازدارندگی عصاره‌های طبیعی به گروه‌های عاملی موجود در آنها مانند گروه هیدروکسیل، کربونیل، فسفوریل و غیره بستگی دارد. پژوهشگران معتقد هستند که پیوندهای مولکولی مانند O-H در فعالیت بازدارندگی تمامی عصاره‌ها شرکت دارند. بنابراین، عصاره‌های حاوی این پیوند می‌توانند به عنوان یک ضدبیوفیلم قوی فعالیت کنند (Dahms and Dobretsov, 2017). در مطالعه حاضر نیز آویشن شیرازی دارای خاصیت ضدچسبندگی موجودات مزاحم بسیار قوی بود که ممکن است به دلیل گروه هیدروکسیل موجود در این اسانس باشد.

در چندین مطالعه بیان شده است که خاصیت ضدچسبندگی موجودات مزاحم رنگ‌ها در آب با گذشت زمان و شسته شدن مواد ضدچسبندگی زیستی از آنها کاهش می‌یابد (Thomas and Brooks, 2010; Fitridge et al., 2012; Noor Idora, 2015). در پژوهش حاضر نیز مقایسه بین فعالیت

بررسی قرار گرفت و این ماده در هر دو آزمایش خاصیت ضدچسبندگی زیستی قوی از خود نشان داد. هم راستا بودن نتایج هر دو بخش پژوهش نشان داد که سنجش‌های درون آزمایشگاهی گامی موثر در پیدا کردن مواد ضدچسبندگی زیستی بالقوه است. به طور کلی با در نظر گرفتن نتایج این مطالعه می‌توان بیان نمود مواد طبیعی مانند اسانس آویشن شیرازی قابلیت استفاده در پوشش‌های ضدچسبندگی زیستی را به عنوان جایگزین مواد شیمیایی دارند.

ضدچسبندگی موجودات مزاحم تیمارها در سه ماه نشان داد که با گذشت زمان تفاوت تیمارهای آویشن با تیمارهای شاهد کاهش یافت که احتمال دارد به دلیل شسته شدن عامل ضدچسبندگی زیستی با گذشت زمان باشد. با توجه به اثرات مخرب زیست‌محیطی ترکیبات سمی شیمیایی، برای مقابله با چسبندگی زیستی در دریا باید از مواد طبیعی و غیرسمی به عنوان جایگزین استفاده شود. در این مطالعه خاصیت ضدچسبندگی زیستی ترکیب طبیعی اسانس آویشن شیرازی در دو بخش درون آزمایشگاهی و محیط دریا مورد

## منابع

- زرگری ع. ۱۳۷۱. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۷ص.
- بارانی م.، یوسفزادی م. و هادیان ج. ۱۳۹۲. استفاده از *Artemia salina* به عنوان مدل، جهت تعیین اثرات سیتوتوکسیک اسانس‌های گیاهی. همایش ملی علوم جانوران آبی، دانشگاه گیلان، رشت. ص: ۸۴۶-۸۴۹.
- شریف روحانی م.، حقیقی م. و عصاییان ح. ۱۳۹۰. غلظت نیمه کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۰(۲): ۸۹-۹۶.
- شهبسواری ن.، برزگر م.، سحری م. ع. ۱۳۸۷. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و زیره کوهی (*Bunium persicum*) در روغن سویا. هجدهمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی، مشهد. ص: ۵-۱.
- مشجور س.، اذان ز.، کاظمیان ا. و بی‌نیاز م. ۱۳۹۴. ارزیابی اثرات سمیت سلولی عصاره‌های گیاهان دارویی آویشن و مرزه بر ناپلئوس *Artemia salina* مجله بوم‌شناسی آبزیان، ۵(۳): ۱۴۵-۱۵۰.
- Amanlou M., Dadkhah F., Salehnia A., Farsam H. and Dehpour A.R. 2005.** An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 8(1): 102-106.
- Ananda K.S. and Sasikumar A. 2014.** Studies on novel silicone/phosphorus/sulphur containing nano-hybrid epoxy anticorrosive and antifouling coatings. Progress in Organic Coatings, 68(3): 189-200.
- Banerjee S., Hew W.E., Khatoon H., Shariff M. and Yusoff F.M. 2011.** Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. African Journal of Biotechnology, 10(8): 1375-1383.
- Beveridge M. 2004.** Cage Aquaculture. Blackwell Publishing Ltd., UK. 368P.
- Bond P.R., Brown M.T., Moate R.M., Gledhill M., Hill S.J. and Nimmo M. 1999.** Arrested development in *Fucus spiralis* (Phaeophyceae) germlings exposed to copper. European Journal of Phycology, 34: 513-521.

- Braithwaite R.A., Carrascosa M.C.C. and McEvoy L.A. 2007.** Biofouling of salmon cage netting and the efficacy of a typical copper-based antifoulant. *Aquaculture*, 262: 219–226.
- CLSI. 2017.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M100). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. 282P.
- Costello M.J., Fretwell K. and Read P. 1993.** Toxicity of sewage sludge to *Crangon crangon* and *Artemia salina*, with reference to other marine Crustacea. *Aquatic Living Resources*, 6(4): 351–356.
- Cuili J., Jingjing Q., Li M., Ke F. and Xiao Jian Z. 2014.** Antifouling activities of anti-histamine compounds against the barnacle *Amphibalanus (=Balanus) amphitrite*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 452: 47–53.
- Dahms H.U. and Dobretsov S. 2017.** Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, 15(9): 1–16 (265).
- Dambolena J.S., Lopez A., Jose M. and Zygadlo J.A. 2012.** Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. *Food Control*, 28(1): 163–170.
- Ebrahimzadeh H., Yamini Y., Sefidkon F., Chalooosi M. and Pourmortazavi S.M. 2003.** Chemical composition of the essential oil and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of *Zataria multiflora* Bioss. *Food Chemistry*, 83: 357–361.
- Edwards C.D., Pawluk K.A. and Cross S.F. 2015.** The effectiveness of several commercial antifouling patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis. *Aquaculture Research*, 46: 2225–2235.
- Fitridge I., Dempster T., Guenther J. and De Nys R. 2012.** The impact and control of biofouling in marine aquaculture: A review. *Biofouling*, 28: 649–669.
- Helander I.M., Alakomi H.L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I. and Smid E.J. 1998.** Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(9): 3590–3595.
- Hisem D., Hrouzek P., Tomek P., Tomsickova J., Zapomelova E., Skacelova K., Lukesova A. and Kopecky J. 2011.** Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon*, 57(1): 76–83.

- Hodson S.L. and Burke C.M. 1994.** Microfouling of salmon- cage netting: A preliminary investigation. *Biofouling*, 8: 93–105.
- Joshi M., Mukherjee A., Misral S.C. and Ramesh U.S. 2013.** Natural biocides in antifouling paints. *Technical Innovation in Shipbuilding*, 12(13): 1–11.
- Kim J.M., Marshall M.R., Cornell J.A., Preston J.F. and Well C.I. 1995.** Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and fish cube. *Journal of Food Science*, 60(6): 1346–1368.
- Lim C.Y., Yoo Y.H., Sidhartan M., Ma C.W., Bang I.C., Kim J.M., Lee K.S., Park N.S. and Shin H.W. 2006.** Effects of copper (I) oxide on growth and biochemical compositions of two marine microalgae. *Journal of Environmental Biology*, 27(3): 461–466.
- 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.
- Maki J.C. and Mitchell R. 2002.** Biofouling in the marine environment. P: 610–619. In: Bitton G. (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons, USA.
- Mazooji A., Salimpur F., Danaei M., Akhoondi Darzikolaei S. and Shirmohammadi K. 2012.** Comparative study of the essential oil chemical composition of *Thymus kotschyanus* Boiss. and Hohen. var *kotschyanus* from Iran. *Annals of Biological Research*, 3(3): 1443–1451.
- Mohagheghzadeh A., Shams-Ardekani M. and Ghannadi A. 2000.** Volatile constituents of allus and flower-bearing tops of *Zataria multiflora* Bioss (Lamiaceae), *Flavour Fragr Journal*, 15: 373–376.
- Mongelli E., Martino V. and Coussio J. 1996.** Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *International Journal of Pharmacognosy*, 34: 249–54.
- Munari C. and Mistri M. 2007.** Effect of copper on the scope for growth of clams (*Tapes philippinarum*) from a farming area in the Northern Adriatic Sea. *Marine Environmental Research*, 64: 347–357.
- Najafpour Navaie M. and Mirza M. 2014.** Chemical composition of the essence extracted from the flowered shoot of *Zataria multiflora* Bioss. in four different provinces. *Eco-phytochemical*

- Journal of Medicinal Plants, 2(4): 43–49.
- Noor Idora M.S., Ferry M., Wan Nik W.B. and Jasnizat S. 2015.** Evaluation of tannin from *Rhizophora apiculata* as natural antifouling agents in epoxy paint for marine application. *Organic Coatings*, 81: 125–131.
- Obaidat R.M., Bader A., Al-Rajab W., Abu Sheikha G. and Obaidat A.A. 2011.** Preparation of mucoadhesive oral patches containing tetracycline hydrochloride and carvacrol for treatment of local mouth bacterial infections and candidiasis. *Scientia Pharmaceutica*, 79(1): 197–212.
- OECD. 2011.** Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test, Test No. 201. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, France. 25P.
- Osakabe N., Yasuda A., Natsume M. and Yoshikawa T. 2004.** Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two stage skin model. *Carcinogenesis*, 25: 549–557.
- Perez M., Blustein G., Garcia M., Del Amo B. and Stupak M. 2006.** Cupric tannate: A low copper content antifouling pigment. *Progress in Organic Coatings Journal*, 55: 311–315.
- Perez M., Garcia M., Sanchez M., Stupak M., Mazzuca M., Palermo J.A. and Blustein G. 2014.** Effect of secochiliolide acid isolated from the Patagonian shrub *Nardophyllum bryoides* as active component in antifouling paints. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 89: 37–44.
- Piazza V., Roussis V., Garaventa F., Greco G., Smyrniotopoulos V., Vagias C. and Faimali M. 2011.** Terpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* inhibit the settlement of barnacles. *Marine Biotechnology*, 13: 764–772.
- Price C.S. and Morris Jr J.A. 2013.** Marine cage culture and the environment: Twenty-first century science informing a sustainable industry. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) Technical Memorandum. National Centers for Coastal Ocean Science 164, USA. 158P.
- Qian P.Y., Lau S.C., Dahms H.U., Dobretsov S. and Harder T. 2007.** Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: Implications for antifouling and aquaculture, *Journal of Biotechnology*, 9(4): 399–410.
- Rasband W.S. 2011.** ImageJ. US. National Institutes of Health,

- Bethesda, USA. From <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Schultz M.P., Bendick J.A., Holm E.R. and Hertel W.M. 2011.** Economic impact of biofouling on a naval ship. *Biofouling*, 27: 87–98.
- Shafiee A. and Javidnia K. 1997.** Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. *Planta Medicina*, 63: 371–372.
- Silva T.M., Nascimento R.J., Batista M.B., Agra M.F. and Camara C.A. 2007.** Brine shrimp bioassay of some species of solanum from northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Farmacogn*, 17(21): 35–38.
- Suresh M., Iyapparaj P. and Anantharaman P. 2016.** Antifouling activity of lipidic metabolites derived from *Padina tetrastromatica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5): 805–818.
- Thomas K.V. and Brooks S. 2010.** The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. *Biofouling*, 26: 73–88.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. and Bisignano G. 2005.** Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 49(6): 2474–2478.
- Ultee A., Bennik M.H.J. and Moezelaar R. 2002.** The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1561–1568.
- Vardar-Unlu G., Yagmuroglu A. and Unlu M. 2010.** Evaluation of in vitro activity of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Natural Product Research*, 24(12): 1189–1193.
- WHOI (Woods Hole Oceanographic Institution). 1952.** Marine fouling and its prevention. The Naval Institute Press, USA. 118P.
- Willemsen P.R. 2005.** Biofouling in European aquaculture: Is there an easy solution? *European Aquaculture Society Special Publication*, 35: 82–87.
- 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(4): 299–307.
- Yousefzadi M., Riahi-Madvar A., Hadian J., Rezaee F., Rafiee R. and Biniiaz M. 2013.** Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *Immunotoxicology*, 11: 50–55.
- Zarezadeh A., Mirhossaini A. and Arabzadeh M. 2013.** Comparison on quality and quantity in essential



oils of six species of *Thymus* L. in  
Yazd province. Eco-phytochemical

Journal of Medicinal Plants, 1(2):  
39-49.



Research Paper

**Evaluation of essential oil from *Zataria multiflora* as natural antibiofouling agents in epoxy paint for marine application**

Mohammad Asadi<sup>1</sup>, Ehsan Kamrani<sup>2</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>3,4\*</sup>, Iman Sourinejad<sup>5</sup>

Received: December 2019

Accepted: February 2020

**Abstract**

Regarding the negative impacts of using toxic antifouling paints to solve the problem of biofouling, the development of non-toxic paints from natural products and their application in marine industries has gain importance. In the present study, the antifouling properties of *Zataria multiflora* essential oil in antifouling epoxy paint were investigated. Antibiofouling activity of essential oil was proved by antibacterial, antimicrobial, antibarnacle and antiartemia activities. The minimum inhibitory concentration was 0.125 and 0.250 mg/L against two bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively. According to antimicrobial adherence assay, essential oil had inhibited the average specific growth rate of *Isochrysis galbana* with effective concentration of 52.186±17.67mg/L and LC<sub>50</sub> was 8.720±1.28 and 35.210±2.37mg/L against antibarnacle and antiartemia, respectively. The essential oil was added to epoxy paint and coated on the fiberglass panel exposed to seawater for three months. At the end of the first and second months, the coated panels containing 3% essential oil had the lowest weight (78.81±22.2 and 178.44±6.58 g, respectively) and lowest fouling cover percentage (63.52±1.92% and 92.05±3.34%, respectively) (P<0.05). Results showed that the effectiveness of antifouling activity of *Z. multiflora* essential oil depends on the amount of essential oil in the paint and its wash rate in seawater.

**Key words:** *Antibiofouling Paint, Zataria multiflora, Natural Compound, Biological Activity.*

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

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

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

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

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

\*Corresponding Author: [morteza110110@gmail.com](mailto:morteza110110@gmail.com)