ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):435-440

Comparison of Essential Oils Toxicity of Satureja *Khuzistanica* and *Satureja Rechingeri* on Larvae of the Barnacle *Amphibalanus Amphitrite*

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Amirinezhad M.[1] *MSc*,
Yousefzadi M.*[1] *PhD*,
Arman M.[2] *PhD*,
Rahimzadeh M.[3] *PhD*

How to cite this article
Amirinezhad M, Yousefzadi M, Arman M, Rahimzadeh M. Comparison of Essential Oils Toxicity of Satureja Khuzistanica and Satureja Rechingeri on Larvae of the Barnacle Amphibalanus Amphitrite. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):435-440.

ABSTRACT

Aims Barnacles are benthos Crustacean with a calcareous place. In the state of puberty, they do not move and stick on their feet to the objects in the water. The life cycle of a typical barnacle includes two stages. The aim of this study was to compare essential oils toxicity of *Satureja khuzistanica* and *Satureja rechingeri* on larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*.

Materials & Methods In this experimental study, leaves of *S. khuzestanica* and *S. rechingeri* were collected. The extraction lasted 3 to 4 hours. Essential oil composition was detected by Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). In order to evaluate the toxicity, the effect of essential oils with 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, and 1.5μg/ml concentrations was investigated on larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*. For data analysis, one way ANOVA, SPSS 16 software, Probit analysis with 95% confidence interval, and Excel 2010 were used.

Findings Both *S. khuzestanica* and *S. rechingeri* had a high toxicity effect on larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*, which had a 100% lethal effect at 50μg/ml concentration and with increasing concentrations, more mortality was observed in the barnacle larval stages. *S. khuzestanica* with LC50 of 23.48μg/ml had a stronger effect on stage II nauplius. Stages 5 and 6 of barnacle larvae were also more susceptible than the rest of the stages.

Conclusion Both *S. rechingeri* and *S. khuzestanica* have a high toxicity effect on larvae of the barnacle *Amphibalanus amphitrite*.

Keywords Essential Oils; Toxicity; *Amphibalanus Amphitrite*

[1]Marine Biology Department, Marine Science & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran
[2]Biology Department, Pyam-e-Noor University, Tehran, Iran
[3]Biochemistry Department, Medicine Faculty, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, Iran

Correspondence
Address: University of Hormozgan, Minab Road, Bandar Abbas, Hormozgan Province, Iran
Phone: -
Fax: -
morteza110110@gmail.com

Article History
Received: May 04, 2016
Accepted: February 3, 2017
ePublished: September 22, 2018

CITATION LINKS

[1] Larval development and metamorphosis in Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica): Significance of food concentration, temperature and nucleic acids [2] Effects of dieldrin in seawater on the developmentof two species of crab larvae, Leptodius floridanus and Panopeus herbstii [3] Using barnacle larvae for evaluation of the toxicity of antifouling paints compounds [4] Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina [5] Chemical composition of essential oils in Zataria multiflora Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity [6] Terpenes from the red alga Sphaerococcus coronopifolius inhibit the settlement of barnacles [7] Recreating the seawater mixture composition of HOCs in toxicity tests with Artemia franciscana by passive dosing [8] The use of a brine shrimp (Artemia salina) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes [9] Allelopathic inhibition on red tide microalgae Skeletonema costatum by five macroalgal extracts [10] Toxic effects of copper on larval development of the barnacle Balanus amphitrite [11] Effects of algal diet on larval survival and growth of the barnacle Amphibalanus (=Balanus) improvises [12] Antifouling activity against barnacle cypris larvae: Do target species matter (Amphibalanus amphitrite versus Semibalanus balanoides)? [13] Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (Cuminum cyminum L.) fruits during stages of maturity

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

مقایسه سمیت اسانس‌های گیاهی *ساتوریا خوزستانیکا* و *ساتوریا رشینگری* روی لارو بارناکل گونه *آمفیبالانوس آمفیتریت*

مهدیه امیری‌نژاد MSc
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
مرتضی یوسف زادی* PhD
گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
میترا آرمان PhD
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
مهسا رحیم‌زاده PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، بندر عباس، ایران

چکیده
اهداف: بارناکل‌ها سخت‌پوستانی کف‌زی هستند و جایگاهی آهکی دارند. آنها در حالت بلوغ ساکن بوده و با پایه‌ای خود را به اجسام داخل آب می‌چسبانند. چرخه زندگی بارناکل‌ها به‌طور معمول دو مرحله دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی سمیت اسانس‌های گیاهی *ساتوریا خوزستانیکا* (*Satureja khuzestanica*) و *ساتوریا رشینگری* (*S. rechingeri*) روی مراحل مختلف لاروی بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* (*Amphibalanus amphitrite*) بود.
مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی حاضر برگ گونه‌های *خوزستانیکا* و *رشینگری* جمع‌آوری شدند. اسانس‌گیری ۳ تا ۴ساعت طول کشید. شناسایی ترکیب اسانس با آنالیز کروماتوگرافی- طیف‌سنج جرمی (GC-MS) انجام شد. به‌منظور ارزیابی میزان سمیت، اثر اسانس‌های گیاهی با غلظت‌های ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵میکروگرم در میلی‌لیتر روی مراحل مختلف لارو کشتی چسب *آمفیبالانوس آمفیتریت* مورد بررسی قرار گرفتند. این تست براساس تعیین LC_{50} در یک دوره ۲۴ساعته روی پنج مرحله مختلف لاروی صورت گرفت. برای تحلیل داده‌ها آنالیز واریانس یک‌طرفه، نرم‌افزارهای SPSS 16، Probit analysis با بازه اطمینان ۹۵% و Excel 2010 استفاده شدند.
یافته‌ها: هر دو گونه رشینگری و خوزستانیکا اثر سمیت بالایی روی لارو بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* داشتند، به‌طوری که در غلظت ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰۰% اثر کشندگی داشتند و با افزایش غلظت، مرگ‌ومیر بیشتری در مراحل لاروی بارناکل مشاهده شد. *گونه* خوزستانیکا با LC_{50} برابر ۲۳/۴۸- میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر قوی‌تری روی مرحله ۲ ناپلیوسی داشت. همچنین مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل نشان دادند.
نتیجه‌گیری: هر دو گونه *ساتوریا رشینگری* و *ساتوریا خوزستانیکا* اثر سمیت بالایی روی لارو بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* دارند.
کلیدواژه‌ها: اسانس‌های گیاهی، سمیت، *آمفیبالانوس آمفیتریت*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۵
*نویسنده مسئول: morteza110110@gmail.com

مقدمه
بارناکل‌ها سخت‌پوستانی با جایگاهی آهکی هستند که در حالت بلوغ ساکن بوده و با پایه‌ای خود را به اجسام داخل آب می‌چسبانند. این جانوران در حالت بالغ تک‌پایه هستند، به این مفهوم که هر دو اندام تناسلی نر و ماده را دارند. چرخه زندگی بارناکل‌ها به‌طور معمول شامل دو مرحله لاروی با شنای آزاد و مرحله ثابت است. بدن بارناکل مشابه بدن همه سخت‌پوستان با یک اسکلت کیتینی پوشیده شده است. هنگامی که تخم‌ها از مرحله تکاملی جنینی خود عبور می‌کنند و سر از تخم بیرون می‌آورند، بارناکل‌ها به‌عنوان ناپلی شناگر وارد مرحله پلانکتونی می‌شوند. مرحله ناپلیوسی، اولین مرحله لاروی است که شش مرحله دارد و پس از عبور از این مراحل لاروی به‌وسیله دگردیسی قبل از استقرار به لارو دیگری موسوم به سیپریس تبدیل می‌شود و سپس به وسیله دگردیسی بعد از استقرار به‌صورت یک فرد جوان روی سطح مستقر می‌شود[1].
چرخه زندگی بسیاری از بی‌مهرگان دریایی یک دوره لاروی دارد که طی آن جانور بیشترین حساسیت را نسبت به استرس‌های محیطی نشان می‌دهد. دوره لاروی اغلب چندین مرحله دارد که در هر دوره اندازه، تحرک و همچنین میزان حساسیت آن در مقابل استرس‌های محیطی متفاوت است. میزان حساسیت لاروها در مراحل مختلف از همان گونه، در انجام تست‌های سمیت در بسیاری از مطالعات مقایسه می‌شود[2].
بارناکل‌ها در میان جانوران به‌دلیل تولیدمثل فراوان (به‌طوری که لارو آنها همیشه در دسترس است) موفق‌ترین فولینگ‌های بی‌مهره هستند[3]. اغلب گونه‌های بارناکل به‌آسانی شناسایی می‌شوند، همچنین پراکنش گسترده آنها اجازه مقایسه میان مناطق و زمان‌های مختلف را می‌دهد. به‌دلیل چرخه زندگی دریایی تیپیک و قابل شناسایی، داشتن مرحله لاروی پلانکتونی و ثابت‌بودن و انعکاس خوب شرایط محیطی توسط این جانوران، آنها به گونه‌های مناسبی به‌عنوان مدل‌های اکولوژیک و مانیتورکننده‌های زیستی در مطالعات مربوط به پایش اکوسیستم‌ها تبدیل شده‌اند.
این سخت‌پوستان هم از نظر اقتصادی و هم از نظر اکولوژیک حایز اهمیت هستند به‌طوری که از یک سو به‌عنوان گونه‌های بنیادی در چرخه غذایی مناطق بین جزر و مدی و از سوی دیگر به‌عنوان موجودات بیوفولینگ محسوب می‌شوند. در اکوسیستم‌های دریایی بارناکل‌ها از یک طرف انبوهی از لارو مورد تغذیه پلانکتون‌خوارها به‌ویژه نرم‌تنان را آزاد می‌کنند و همچنین مرحله بالغ آنها نیز مورد تغذیه ماهیان کف‌زی قرار می‌گیرند و از طرف دیگر حضور بارناکل‌ها در اکوسیستم برای ادامه سیکل زندگی بسیاری از جانداران دریایی ضروری است. با شناخت مراحل حساس بارناکل‌ها در پاسخ به تغییرات زیست‌محیطی در زیستگاه‌های جزر و مدی می‌توان آنها را به‌عنوان مدلی برای درک اثرات تغییرات آب و هوایی در توزیع گونه‌ها دانست[1].
جنس مرزه (ساتوریا) اغلب در مناطق مدیترانه‌ای پراکندگی دارد. این جنس در ایران ۱۵ گونه دارد که از میان آنها ۹ گونه به نام‌های *ساتوریا ادموندی* (*Satureja edmondi*)، *ساتوریا اینترمدیا* (*S. intermedia*)، *ساتوریا رشینگری* (*S. rechingeri*)، *ساتوریا بختیاریکا* (*S. bachtiarica*)، *ساتوریا کلاریکا* (*S. kallarica*)، *ساتوریا سهندیکا* (*S. sahendica*)، *ساتوریا آتروپاتانا* (*S. atropatana*)، *ساتوریا ایزوفیلا* (*S. isophylla*)، *ساتوریا خوزستانیکا* (*S. khuzestanica*) انحصاری کشور هستند. مرزه خوزستانی (*ساتوریا خوزستانیکا*) یکی از گونه‌های اندمیک حوزه جنوب ایران، گیاهی چندساله همراه با شاخه‌های متعدد، دارای ساقه‌هایی با ارتفاع حدود ۳۰سانتی‌متر، کرک‌های کوتاه، برگ‌های متعدد و میان‌گره‌های کوتاه به طول ۲ تا ۳میلی‌متر است. گیاهان معطر عمدتاً در مصارف غذایی، آرایشی و بهداشتی به کار می‌روند اما چنانچه طی آزمایش‌ها و تحقیقات علمی، خواص و اثرات دارویی نیز برای آنها ثابت شود در زمره گیاهان دارویی نیز قرار می‌گیرند. استفاده از گیاهان معطر به‌عنوان دم‌کردنی‌های گیاهی، ادویه و چاشنی‌های غذایی و همچنین منبع تهیه انواع اسانس‌ها و عصاره‌ها از دیرباز رایج و مرسوم بوده است. برخی از اسانس‌های گیاهی دارای خواص حشره‌کش، ضدآفات، ضدقارچ، ضدباکتری، ضدویروسی و بعضاً ضداکسیدان هستند[4].

هدف مطالعه حاضر بررسی سمیت اسانس‌های گیاهی گونه‌های *ساتوریا خوزستانیکا* و *ساتوریا رشینگری* روی مراحل مختلف لاروی بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* (*Amphibalanus amphitrite*) بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر برگ گیاهان *ساتوریا خوزستانیکا* و *ساتوریا رشینگری* جمع‌آوری و سپس در سایه و دمای مناسب خشک شدند. گیاه با دستگاه آسیاب به شکل پودری تبدیل شد (البته نه در حدی که باعث بیرون‌آمدن اسانس شود). همچنین در این مرحله گیاه نباید به‌مدت طولانی در معرض هوای محیط قرار گیرد. در ادامه ۵۰گرم از پودر خشک گیاه درون بالن مربوط به دستگاه کلونجر ریخته و حجم بالن توسط آب مقطر به یک‌لیتر رسانده شد. جریان آب سرد را باز و مقداری آب مقطر از انشعاب بالا ریخته شد تا لوله جانبی کاملاً پر شود و سپس هیتر روشن شد. اسانس‌گیری ۳ تا ۴ساعت طول کشید. اسانس جمع‌آوری‌شده در ظروف تیره و شیشه‌ای، در دمای ۴°C تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری شدند[5].

شناسایی ترکیب اسانس: برای آنالیز کروماتوگرافی- طیف‌سنج جرمی (GC-MS) از دستگاه Thermoquest-Finnigan Trace GC-MS مجهز به ستون DB-1 به طول ۶۰متر، قطر ۰/۲۵میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵میکرومتر استفاده شد. دمای آون از ۶۰°C تا ۲۵۰°C با سرعت ۴°C بر دقیقه افزایش یافت. از گاز هلیم با سرعت ۱/۱میلی‌لیتر بر دقیقه و انرژی یونیزاسیون ۷۰الکترون‌ولت در طیف‌سنج جرمی جفت‌شده با گاز- کروماتوگرافی استفاده شد.

نمونه‌برداری بارناکل: زمانی که آب دریا بیشترین جزر را داشت بارناکل‌های بالغ گونه *آمفیبالانوس آمفیتریت* چسبیده به قلوه‌سنگ‌ها از سواحل بندرعباس جمع‌آوری و به‌همراه آب دریا به آزمایشگاه زیست‌شناسی منتقل شدند.

نگه‌داری در شرایط آزمایشگاه: بارناکل *آمفیبالانوس آمفی‌تریت* پس از انتقال به آزمایشگاه و حذف سایر گونه‌های بیوفولینگی، به‌خوبی با آب معمولی تمیز شدند. سپس بارناکل‌های جداشده در ظرف‌هایی حاوی ۲لیتر آب دریا با دمای ۲۷°C و با شوری ۳۵ppt نگه‌داری و توسط پمپ اکسیژن هوادهی شدند. روزانه بارناکل‌های به‌سنگ‌چسبیده به‌وسیله آرتمیا تغذیه شدند[6].

کشت آرتمیا به‌منظور تغذیه بارناکل بالغ و تست سمیت: برای تغذیه بارناکل‌های بالغ و بررسی اثر سمیت اسانس‌های گیاهی ناپلیوس آرتمیای تازه‌تفریخ‌شده به کار رفت. برای کشت ابتدا سیست آرتمیا وزن شد (به‌ازای هر لیتر آب دریا با شوری ۳۵ppt به ۲گرم آرتمیا نیاز است). برای کشت از یک ظرف قیفی‌شکل استفاده شد. این ظرف قیفی‌شکل حاوی آب دریا با شوری ۳۵ppt و دمای ۳۰°C با شرایطی مانند دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی بود[7]. شایان ذکر است که یک سنگ هوا در ته ظرف قیفی‌شکل قرار داده شده تا ضمن فراهم‌کردن اکسیژن کافی داخل ظرف، آب را نیز به جریان انداخته تا از رسوب سیست‌ها در ته ظرف جلوگیری شود. در این شرایط سیست‌ها حدود ۲۴ساعت بعد تفریخ شدند[8].

کشت فیتوپلانکتون برای تغذیه لارو بارناکل: از فیتوپلانکتون‌های *کائتوسروس کالسیترانس* (*Chaetoceros calcitrans*)، *کلیتیرس میولری* (*Callitris muelleri*)، *تتراسلمیس سئوسیکا* (*Tetraselmis suecica*) و *کلرلا ولگاریس* (*Chlorella vulgaris*)، برای تغذیه لارو بارناکل استفاده شد. ابتدا آب دریا با شوری ۳۵ppt تهیه و فیلتر شد. فیتوپلانکتون‌های کشت‌شده در دمای ۲۶°C دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی نگه‌داری شدند. شایان ذکر است که برای کشت فیتوپلانکتون از محیط کشت f2 تغییریافته استفاده شد (جدول ۱) [9].

جدول ۱) ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت f2

نام ترکیب	مقدار مورد استفاده (میلی‌گرم بر لیتر)
سدیم‌نیترات ($NaNO_3$)	۷۵
مونوسدیم‌فسفات.۲آبه ($NaH_2PO_4.2H_2O$)	۵
سدیم‌سیلیکات.۹آبه ($Na_2SiO_3.9H_2O$)	۳۶/۴
Na_2EDTA	۲۰
منگنزIIکلراید.۴آبه ($MnCl_2.4H_2O$)	۱۸/۰
ویتامین B1	۱/۰
آهنIIIکلرید.۶آبه ($FeCl_3.6H_2O$)	۱۶/۳
مسIIسولفات.۴آبه ($CuSO_4.5H_2O$)	۰/۱
سولفات‌روی ($ZnSO_4.7H_2O$)	۰/۲۳
کوبالتIIکلراید.۶آبه ($CoCl_2.6H_2O$)	۰/۰۱۲
سدیم‌مولیبدات.۲آبه ($Na_2MoO_4.2H_2O$)	۰/۰۷
ویتامین B12	۵/۰

پرورش انبوه لارو به‌منظور تست سمیت در مراحل مختلف لاروی: با ایجاد یک نقطه نوری مشخص در یک سوی ظرف حاوی بارناکل‌ها در محیط نسبتاً تاریک، لاروهای بارناکل‌ها با استفاده از پیپت پاستور پلاستیکی جمع‌آوری و به ظروف کشت لارو انتقال یافتند. لاروهای جمع‌آوری‌شده در مرحله دوم ناپلیوسی بودند. محیط کشت لاروها حاوی آب دریا با شوری ۳۵ppt بود. محیط کشت لاروها حاوی فیتوپلانکتون‌های *تتراسلمیس سئوسیکا* و *چائتوسروز کالسیترانس* با غلظت 2×10^6 سلول در میلی‌لیتر برای تغذیه آنها بود. ظروف محیط کشت لاروی به مکانی با ۲۷°C و دوره نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی انتقال داده شد[10] و هر ۲۴ساعت یک‌بار وضعیت لاروهای بارناکل از نظر مرگ‌ومیر، زمان و درصد رسیدن لاروها به مرحله بعد مورد ارزیابی قرار گرفتند[11].

تست سمیت: به‌منظور بررسی سمیت اسانس‌ها ابتدا ۲۰۰میکرولیتر از هر اسانس گیاهی وزن و حجم آن توسط حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به ۱۰۰۰میلی‌لیتر رسانده شد، سپس در پلیت‌های ۲۴خانه‌ای از هر استوک ۶ غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. در ادامه به هر چاهک یک‌میلی‌لیتر آب دریای اتوکلاوشده با شوری ۳۵ppt ریخته، سپس درون هر چاهک ۱۰ عدد لارو بارناکل با استفاده از لوپ و توسط پیپت‌پاستور اضافه شد. بعد از ۲۴ساعت پلیت زیر لوپ برده شد و تعداد مرده‌ها و زنده‌ها بررسی شدند.

لاروی که شنا نمی‌کند مرده محسوب می‌شود[12]. هر غلظت با سه بار تکرار انجام شد. به‌دلیل سمی‌بودن حلال دی‌متیل‌سولفواکساید (DMSO) در هر پلیت یک ستون به‌عنوان کنترل و یک ستون نیز حاوی آب دریا و لارو بارناکل به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در نتیجه با این روند، درصد مرگ‌ومیر در هر غلظت اندازه‌گیری و در نهایت نیز LC_{50} (غلظتی از اسانس است که در آن ۵۰% جمعیت کشته می‌شود) محاسبه شد.

تمامی آنالیزهای آماری انجام‌شده توسط نرم‌افزار آماری SPSS 16 صورت پذیرفت. به‌منظور مقایسه درصد کشندگی اسانس در غلظت‌های متفاوت، همچنین مقایسه مراحل مختلف لاروی برای تعیین میزان حساسیت مورد مطالعه هر دوره از آزمایش از آنالیز

واریانس یک‌طرفه استفاده شد. برای محاسبه LC_{50} اسانس‌ها از برنامه probit analysis با بازه اطمینان ۹۵% (یکی از برنامه‌های تحت SPSS) استفاده شد و در نهایت نمودارها به‌وسیله نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۰ رشم شدند.

یافته‌ها

در بررسی ترکیب شیمیایی اسانس مرزه خوزستانی از بین ترکیبات شناسایی‌شده کارواکرول به میزان ۹۴/۱% بیشترین مقدار از حجم اسانس را به خود اختصاص داد. در مورد *ساتوریا رشینگری* نیز ترکیب شیمیایی کارواکرول با ۸۰/۳% بیشترین مقدار از حجم ۱۵ ترکیب شناسایی‌شده را در بر گرفت (جدول ۲).

جدول ۲) نوع و میزان ترکیبات اسانس (درصد) گونه *سچورجا رشینگری* و مرزه خوزستانی

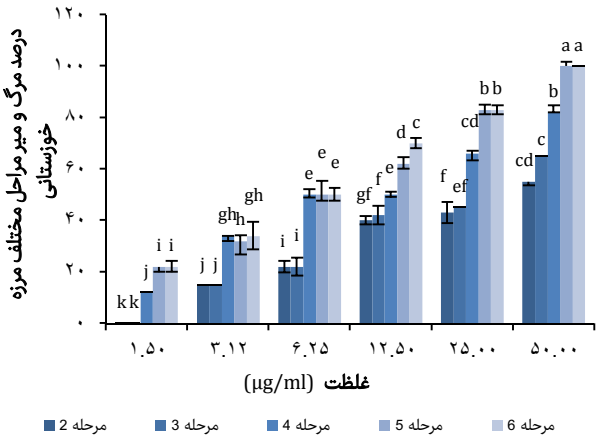
ترکیب	*سچورجا خوزستانیکا*	*سچورجا رشینگری*
آلفا-توجن (α-Thujene)	۰/۱۱	۱/۵
آلفا-پینن (α-Pinene)	۰/۲	–
بتا-پینن (β-Pinene)	۰/۲	۰/۵
بتا-میرسن (β-Mycerene)	–	–
پارا-سیمن (p-Cymene)	۰/۳	۲/۹
۱،۸-سینئول (1,8-Cineole)	–	–
گاما-تربینن (γ-Terpinen)	۰/۲	۲/۱
کارواکرول متیل‌اتر	–	۰/۱
تیمول	۰/۸	۰/۳
کارواکرول	۹٤/۱۱	۸۰/۳
بتا-کاریوفیلن (β-Caryophyllene)	–	۰/۳
آلفا-هومولن (α-Humulene)	۰/۳	–
میرسن	–	۰/۸
آلفا-تربینن (α-Terpinene)	۰/۲	–
لیمونن	۰/۹	۰/٦
تریپن-٤-أل (Terpin-4-ol)	۰/۱	۱/۵
آلفا-تربینول (α-Terpinol)	۰/۲	–
بتا-بیسابولن (β-Bisabolene)	۰/۱	۱/٤
لینالول	–	۱/۲
سیس-سابینن هیدرات	–	۰/۹
بورنول	–	۰/۱
جمع کل	۹۸/۵۲	۹۴/۵

آنالیز آماری اثر سمیت غلظت‌های اسانس گونه مرزه خوزستانی بر مراحل مختلف لاروی بارناکل اختلاف معنی‌داری نشان داد. مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل داشتند و همچنین مرحله ۲ لارو بارناکل مقاوم‌ترین حالت را نسبت به سمیت اسانس مرزه خوزستانی نشان داد.

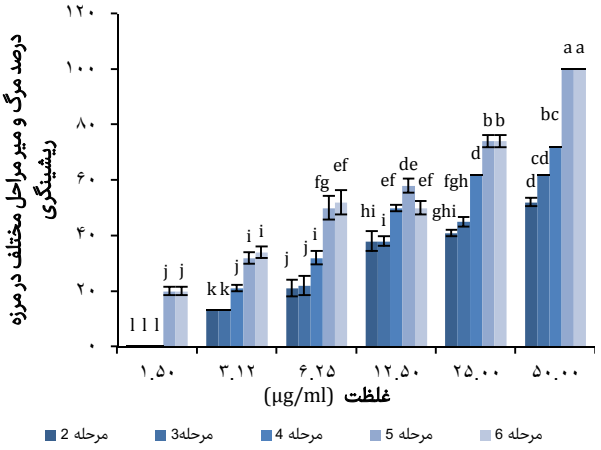
اسانس گیاه مرزه خوزستانی در غلظت‌های مختلف سمیت متفاوتی نشان داد و با افزایش غلظت اسانس سمیت آن نیز افزایش یافت، به‌طوری که در غلظت ۱/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین صفر (در مراحل ۲ و۳ لاروی) تا ۲۲ (در مراحل ۴ و ۵ لاروی) کمترین سمیت را نشان داد و در غلظت ۵۰میکرو گرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین ۵۵ (در مرحله ۲ لاروی) تا ۱۰۰% (در مراحل ۵ و ۶ لاروی) بالاترین میزان سمیت را داشت (نمودار ۱).

اسانس مرزه گونه *ریشینگری* در غلظت‌های مختلف سمیت متفاوتی داشت، به‌طوری که در غلظت ۱/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین صفر (در مراحل ۲، ۳ و ۴ لاروی) تا ۲۰ (در مراحل ۴ و ۵ لاروی) کمترین سمیت را نشان داد و در غلظت ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین ۵۲ (در مرحله ۲ لاروی) تا ۱۰۰% (در مراحل ۵ و ۶ لاروی) بالاترین میزان سمیت را داشت (نمودار ۲).

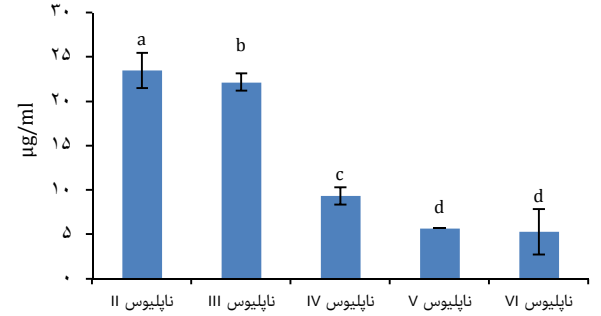
اختلاف معنی‌داری در LC_{50} بین مراحل مختلف لاروی بارناکل گونه *آمفیبالانوس آمفی‌تریت* وجود داشت، اما بین مراحل ۵ و ۶ ناپلیوسی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p \leq ۰/۰۵$؛ نمودارهای ۳ و ۴).



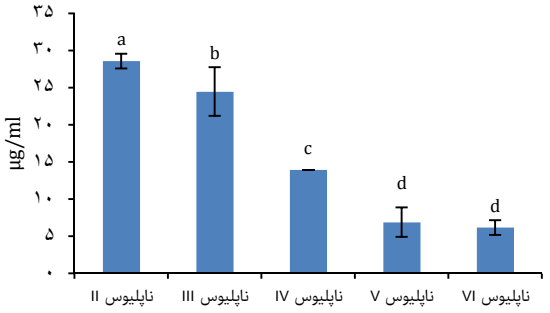
نمودار ۱) مقایسه مربوط به اثرات غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه خوزستانی بر مراحل مختلف لاروی بارناکل و مقایسه مراحل ناپلیوسی با یکدیگر (آنتنک‌ها نشانه انحراف‌معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت اسانس است)



نمودار ۲) مقایسه مربوط به اثرات غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه *ریشینگری* بر مراحل مختلف لاروی بارناکل و مقایسه مراحل ناپلیوسی با یکدیگر (آنتنک‌ها نشانه انحراف‌معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت اسانس است)



نمودار ۳) مقایسه LC_{50} بین مراحل مختلف ناپلیوسی در گیاه مرزه خوزستانی (آنتنک‌ها نشانه انحراف‌معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گونه‌های متفاوت گیاه است)



نمودار ۴) مقایسه LC_{50} بین مراحل مختلف ناپلیوسی در گیاه مرزه *ریشینگری* (آنتنک‌ها نشانه انحراف‌معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین گونه‌های متفاوت گیاه است)

میزان مرگ‌ومیر در غلظت‌های مختلف از ۱/۵ تا ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس با افزایش غلظت، افزایش یافت ($p\leq۰/۰۵$). در غلظت ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر، مرحله ۲ لاروی در دو گونه گیاهی مرزه *خوزستانیکا* و *ریشینگری* بالای ۵۰% مرگ‌ومیر مشاهده شد. در غلظت‌های کمتر از ۳میکروگرم در میلی‌لیتر نیز درصد مرگ‌ومیر پایین‌تر از ۲۰% بود. اسانس گیاه مرزه خوزستانی در غلظت ۵۰میکروگرم در میلی‌لیتر با ۶۵% کشندگی در مرحله ۳ ناپلیوسی بیشترین درصد مرگ‌ومیر، همچنین مرحله ۴ لارو بارناکل در غلظت ۵۰ و ۱/۵میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب با ۸۰ و ۱۰% کشندگی، تفاوت معنی‌داری را نسبت به گونه گیاهی دیگر در این مرحله لاروی نشان داد.

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی سمیت اسانس‌های گیاهی گونه‌های *ساتوریا خوزستانیکا* و *ساتوریا رشینگری* روی مراحل مختلف لاروی بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* بود.

نوع گیاه و نوع موجود تحت مطالعه در غلظت به‌کاربرده‌شده برای کشتن ۵۰% از موجودات متفاوت است که به‌دلیل ترکیبات متفاوت هر اسانس است. در مطالعه حاضر ارزیابی آزمون سمیت برای گیاهان جنس ساتوریا این واقعیت را بازگو می‌کند که هر دو گونه *ریشینگری* و *خوزستانیکا* اثر سمیت بالایی داشتند، به‌ویژه گونه *خوزستانیکا* که LC_{50} برابر ۲۳/۴۸-میکروگرم بر میلی‌لیتر بر مرحله ۲ ناپلیوسی داشت، اثر قوی‌تری از خود نشان داد. اثرات سمیت آنها بیشتر مربوط به کارواکرول بود.

کارواکرول مایع است و بوئی شبیه به تیمول دارد. وزن مخصوص آن در گرمای ۲۵°C برابر ۰/۹۷۵۱ است و در گرمای صفر درجه سانتی‌گراد منجمد می‌شود. عملاً در آب غیرمحلول است ولی در مقادیر زیاد در الکل و اتر حل می‌شود. کارواکرول اثر ضدعفونی‌کننده دارد و در سنتز برخی از مواد آلی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

در مطالعه حاضر سمیت غلظت‌های اسانس بر مراحل مختلف لاروی بارناکل اختلاف معنی‌داری نشان داد.

میزان LC_{50} برابر ۶/۲۰- میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۶ ناپلیوسی، میزان LC_{50} برابر با ۲۸/۶۴- میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۲ لاروی در اسانس گونه *ریشینگری*، میزان LC_{50} برابر با ۵/۳۱- میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۶ ناپلیوسی و میزان LC_{50} برابر با ۲۳/۴۸- میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۲ لاروی از اسانس گونه *خوزستانیکا* نشان دادند که مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل و همچنین مرحله ۲ لارو بارناکل مقاوم‌ترین حالت را نسبت به سمیت اسانس هر دو گونه داشتند. در مطالعه حاضر با مشاهده LC_{50} در مراحل مختلف لاروی بارناکل مشخص شد با پیش‌روی مراحل رشدونمو لاروی به سمت جلو مقدار LC_{50} کمتر داشتند و در غلظت‌های پایین‌تر باعث مرگ ۵۰% لاروها شد.

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های گیاهی بر حسب منطقه جغرافیایی رویش، سن گیاه در هنگام تهیه اسانس، شرایط محیطی و فصلی، نوع کشت، زمان برداشت، روش خشک‌کردن و استخراج اسانس، اسانس‌گیری اندام‌های مختلف، مرحله رشد و در نهایت تفاوت ژنتیکی گیاه می‌تواند[13]. ترکیبات عمده گونه‌های جنس مرزه از مونوترپن‌های فنلی مثل تیمول و کارواکرول است که اغلب به‌همراه گاماترپین، پاراسمین و لینالول وجود دارند، این گروه از ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی دارند. مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه *رشینگری* شامل کارواکرول بیش از ۹۰%، پاراسیمن، گاما-ترپینن، لیمونن، ۱ و ۸ سینئول، اوژنول، میرسن و آلفاتوژن هستند. کارواکرول به‌عنوان ترکیب اصلی سازنده اسانس در همه مراحل تکوینی محسوب می‌شود، به همین جهت فعالیت بیولوژیکی قابل توجهی دارد.

برخی از گونه‌های بارناکل مانند *آمفیبالانوس آمفی‌تریت* را می‌توان در شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری کرد. تمام مراحل لاروی در زمان کوتاه ۴ تا ۱۱ روز قابل انجام است و از تمامی مراحل می‌توان در تست‌های سمیت و مقایسه حساسیت مراحل مختلف لاروی و همچنین در ارزیابی زیستی به‌عنوان یک مدل مطالعاتی استفاده کرد. از آنجایی که تعداد بیشتری ناپلیوس ۲ در دسترس است و بارناکل‌های بالغ تعداد انبوهی ناپلیوس ۲ زنده تولید می‌کنند، همچنین دسترسی سریع در مدت‌زمان کوتاه برای رسیدن به آن، این مرحله برای انجام تست سمیت بیشتر استفاده می‌شود. از طرفی با انجام کشت انبوه و مرگ‌ومیر تعداد زیادی از ناپلیوس‌ها در حین رشدونمو و رسیدن به مراحل بعدی تحت شرایط آزمایشگاهی از تعداد لاروها کاسته شد و به‌دلیل بزرگ‌شدن و نشست لاروها به کف و کمترشدن پاسخ مراحل بالاتر به نورگرایی، انجام تست سمیت مشکل‌تر شده به همین علت بیشتر از مرحله ۲ ناپلیوسی برای انجام تست‌های سمیت استفاده می‌شود. از طرفی این روغن‌های ضروری به‌دلیل فراربودن، به‌راحتی در آب در عرض چند روز پس از کاربرد بخار شده و نهایتاً تاثیر آن بر اکوسیستم آبی به حداقل می‌رسد. بنابراین می‌توان برای کاربردهای زیاد به‌دلیل داشتن خواص بسیار زیاد در دوزهای مشخص از آنها استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

هر دو گونه *ساتوریا رشینگری* و *ساتوریا خوزستانیکا* اثر سمیت بالایی روی لارو بارناکل *آمفیبالانوس آمفیتریت* دارند، به‌طوری که در غلظت ۵۰میکروگرم بر میلی‌لیتر ۱۰۰% اثر کشندگی نشان می‌دهند و با افزایش غلظت، مرگ‌ومیر بیشتری در مراحل لاروی بارناکل مشاهده می‌شود. *گونه ساتوریا خوزستانیکا* با LC_{50} برابر ۲۳/۴۸- میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر قوی‌تری بر مرحله ۲ ناپلیوسی دارد و مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل نشان می‌دهند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.
سهم نویسندگان: مهدیه امیری‌نژاد (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵%)؛ مرتضی یوسف‌زادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)؛ میترا آرمان

(نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ مهسا رحیم‌زاده (نویسنده چهارم) پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۵%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان یافت نشد.

منابع

1- Anil AC, Desai D, Khandeparker L. Larval development and metamorphosis in Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica): Significance of food concentration, temperature and nucleic acids. J Exp Mar Biol Ecol. 2001;263(2):125-41.

2- Epifanio CE. Effects of dieldrin in seawater on the developmentof two species of crab larvae, Leptodius floridanus and Panopeus herbstii. Mar Biol. 1971;11(4):356-62.

3- Koryakova M. Using barnacle larvae for evaluation of the toxicity of antifouling paints compounds. Russ J Mar Biol. 1993;19:212-6.

4- Olmedo RH, Asensio CM, Grosso NR. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. Ind Crops Prod. 2015;69:21-8.

5- Saei Dehkordi SS, Tajik H, Moradi M, Khalighi Sigaroodi F. Chemical composition of essential oils in Zataria multiflora Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. Food Chem Toxicol. 2010;48(6):1562-7.

6- Piazza V, Roussis V, Garaventa F, Greco G, Smyrniotopoulos V, Vagias C, et al. Terpenes from the red alga Sphaerococcus coronopifolius inhibit the settlement of barnacles. Mar Biotechnol (NY). 2011;13(4):764-72.

7- Rojo-Nieto E, Smith KE, Perales JA, Mayer P. Recreating the seawater mixture composition of HOCs in toxicity tests with Artemia franciscana by passive dosing. Aquat Toxicol. 2012;120-121:27-34.

8- Caldwell GS, Bentley MG, Olive PJ. The use of a brine shrimp (Artemia salina) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. Toxicon. 2003;42(3):301-6.

9- An Z, Wang Z, Li F, Tian Z, Hu H. Allelopathic inhibition on red tide microalgae Skeletonema costatum by five macroalgal extracts. Front Environ Sci Eng China. 2008;2(3):297-305.

10- Qiu JW, Thiyagarajan V, Cheung S, Qian PY. Toxic effects of copper on larval development of the barnacle Balanus amphitrite. Mar Pollut Bull. 2005;51(8-12):688-93.

11- Nasrolahi A, Sari AR, Saifabadi SJ, Malek M. Effects of algal diet on larval survival and growth of the barnacle Amphibalanus (=Balanus) improvises. J Mar Biol Assoc UK. 2007;87(5):1227-33.

12- Maréchal JP, Hellio C. Antifouling activity against barnacle cypris larvae: Do target species matter (Amphibalanus amphitrite versus Semibalanus balanoides)?. Int Biodeterior Biodegrad Soc. 2011;65(1):92-101.

13- Moghaddam M, Khaleghi Miran SN, Ghasemi Pirbalouti A, Mehdizadeh L, Ghaderi Y. Variation in essential oil composition and antioxidant activity of cumin (Cuminum cyminum L.) fruits during stages of maturity. Ind Crops Prod. 2015;70:163-9.