

مقاله پژوهشی

استفاده از ترکیبات زیست‌فعال خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) در پوشش  
رزین اپوکسی با هدف تهیه پوشش‌های آنتی‌فولینگ دوستدار محیط زیست

مهرنوش دریا،<sup>۱</sup> میر مسعود سجادی<sup>۲\*</sup>، مرتضی یوسف‌زادی<sup>۳،۴</sup>، ایمان سوری‌نژاد<sup>۵</sup>، معروف زارعی<sup>۶</sup>

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷

تاریخ پذیرش: تیر ۹۸

چکیده

استفاده از مواد آنتی‌فولینگ طبیعی یک رویکرد جدید و مناسب برای حل مشکل جهانی فولینگ زیستی به شمار می‌آید. در مطالعه حاضر، فعالیت ضد میکروبیولوژی و آنتی‌فولینگ عصاره‌های ان‌هگزانی، متانولی و اتیل استاتی چهار اندام خیار دریایی *Holothuria leucospilota* شامل دیواره بدن، گناد، لوله گوارش و درخت تنفسی بررسی شد. فعالیت ضد میکروبیولوژی عصاره‌ها بر دو میکروبیولوژی *Chlorella vulgaris* و *Isochrysis galbana* با هدف تعیین کمترین غلظت بازدارندگی (MIC) آزمایش شد. سپس بهترین عصاره‌ها برای بررسی فعالیت آنتی‌فولینگ در محیط دریا در قالب پوشش رزین اپوکسی روی پنل‌های فایبرگلاس (۱۰×۱۰ سانتی‌متری) رنگ‌آمیزی شد و به مدت سه ماه در خلیج فارس (بندر گرز) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عصاره اتیل استاتی دیواره بدن با کمترین MIC به میزان ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مقابل میکروبیولوژی *I. galbana* دارای بهترین عملکرد بازدارندگی بود. در پایان دوره سه ماهه آزمایش در دریا، پنل رنگ شده با رزین اپوکسی همراه با ۴ درصد عصاره اتیل استاتی دیواره بدن دارای کمترین وزن نهایی به میزان ۸/۳۲ ± ۱۲۳/۳۳ گرم و همچنین کمترین درصد پوشش فولینگ به میزان ۵۷/۸ درصد در مقایسه با سایر پنل‌های رزین اپوکسی با غلظت‌های مختلف عصاره بود (P < ۰/۰۵). با توجه به فعالیت بالای آنتی‌فولینگ عصاره اتیل استاتی دیواره بدن *H. leucospilota* استفاده از آن به عنوان جایگزین بالقوه ترکیبات آنتی‌فولینگ سمی در رنگ‌های آنتی-فولینگ قابل پیشنهاد است.

واژگان کلیدی: فایبرگلاس، متابولیت ثانویه، فولینگ زیستی، میکروبیولوژی.

- ۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
- ۲- استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
- ۳- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۴- دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران.
- ۵- دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۶- دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

\* نویسنده مسئول: [mmsajjadi@hotmail.com](mailto:mmsajjadi@hotmail.com)

## مقدمه

هر سطح شناور و یا ثابت در آب دریا، مورد تهاجم، تجمع و زندگی موجودات مزاحم و چسبنده آبی قرار می‌گیرد که به این پدیده فولینگ زیستی (Biofouling) گفته می‌شود (Xin et al., 2017). موجودات فولینگ کننده شامل انواع متنوعی از گونه‌ها مانند باکتری‌ها، دیاتومه‌ها و جلبک‌ها هستند و از پروتوزوئیدها تا مهره‌داران را در بر می‌گیرد (Berglin et al., 2001). آن‌ها به طور گسترده‌ای روی سطوح و بدنه کشتی‌ها جمع شده، منجر به افزایش اصطکاک سطحی بدنه، کاهش سرعت و افزایش مصرف سوخت در کشتی‌ها می‌شوند (Schultz et al., 2011). همچنین با تجمع و رشد بر تورها، قفس‌های پرورش ماهی و ادوات آبی پروری در دریا موجب سنگین شدن قفس‌ها و کاهش شناوری آن‌ها، کوچک و بسته شدن چشمه تورها و پایین آمدن میزان بهره‌وری از ادوات آبی پروری می‌شوند (De Nys and

Guenther, 2009). پدیده نامطلوب فولینگ زیستی، سبب ایجاد هزینه‌های اقتصادی زیادی در آبی پروری دریایی، صنایع کشتی‌سازی و خطوط لوله‌ای زیر آب می‌شود و دولت‌ها و صنایع سالانه میلیاردها دلار برای رفع این مشکل هزینه می‌کنند (Schultz et al., 2011). فولینگ زیستی به طور خاص در صنعت پرورش ماهی در قفس محسوب می‌شود که هم گونه‌های پرورشی و هم ساختار پرورش را تحت تاثیر قرار می‌دهد و هزینه‌های مستقیم و غیرمستقیم بسیاری را به این صنعت تحمیل می‌کند. برآورد هزینه‌های مستقیم اقتصادی ناشی از کنترل فولینگ زیستی در صنایع آبی پروری دریایی با یک تخمین حداقلی نشان می‌دهد که این مسئله حدود ۵ تا ۱۰ درصد از هزینه‌های تولیدات را به خود اختصاص می‌دهد. این هزینه‌ها در سطح جهانی معادل یک و نیم تا سه میلیارد دلار آمریکا در سال تخمین زده شده است (Fitridge et al., 2012). بنابراین به منظور کنترل اثرات مخرب فولینگ زیستی و جلوگیری از چسبیدن موجودات آبی به سطوح، ساخت انواع پوشش‌های آنتی‌فولینگ در حال توسعه یافتن است.

اولین تکنیک‌های پیشنهاد شده برای قایق‌های چوبی در گذشته قیر، واکس، فلزات سنگین (سرب) و یا پوشش‌های سمی (همراه با آرسنیک) بودند. در گام‌های بعدی به طور گسترده‌ای از رنگ‌های آنتی‌فولینگ حاوی تری‌بوتیل‌تین (TBT) استفاده شد. اما به دلیل

مشکل هزینه می‌کنند (Schultz et al., 2011). پدیده نامطلوب فولینگ زیستی، سبب ایجاد هزینه‌های اقتصادی زیادی در آبی پروری دریایی، صنایع کشتی‌سازی و خطوط لوله‌ای زیر آب می‌شود و دولت‌ها و صنایع سالانه میلیاردها دلار برای رفع این مشکل هزینه می‌کنند (Schultz et al., 2011). پدیده نامطلوب فولینگ زیستی، سبب ایجاد هزینه‌های اقتصادی زیادی در آبی پروری دریایی، صنایع کشتی‌سازی و خطوط لوله‌ای زیر آب می‌شود و دولت‌ها و صنایع سالانه میلیاردها دلار برای رفع این مشکل هزینه می‌کنند (Schultz et al., 2011).

مخرب بودن این ترکیبات برای محیط زیست دریا و آزاد شدن مواد سمی اصلی آن‌ها در آب، سازمان بین‌المللی دریایی (IMO) از سال ۲۰۰۸ به کار بردن آن‌ها را به طور کامل در کشتی‌ها ممنوع کرد (Lin et al., 2009) و رنگ‌های آنتی فولینگ حاوی مس جایگزین آن‌ها شدند. امروزه رنگ‌های آنتی فولینگ حاوی مس به صورت گسترده در صنایع دریایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و استفاده از انواع دیگر پوشش‌ها و به ویژه پوشش‌های دوست‌دار محیط زیست بسیار محدود است (Edwards et al., 2015). اما طی مطالعات متعدد مشخص شد که استفاده گسترده از این نوع پوشش‌ها سبب تجمع مس و ترکیبات آن در محیط دریایی و بافت موجودات دریایی مثل بافت ماهی‌ها می‌شود، بنابراین هم اکنون محدودیت استفاده از رنگ‌های آنتی فولینگ حاوی مس نیز در بسیاری از کشورهای پیشرفته آغاز شده است (Joshi et al., 2015). با توجه به این ممنوعیت، پژوهشگران به دنبال استفاده از متابولیت‌های ثانویه تولیدی توسط گروهی از موجودات دریایی مانند جلبک‌ها، جانوران (به ویژه بی‌مهرگان) و میکروب‌ها هستند که به دلیل داشتن مکانیسم‌های دفاعی طبیعی علیه موجودات چسبنده مزاحم گزینه مناسبی محسوب می‌شوند (Piazza et al., 2011). بسیاری از بی‌مهرگان دریایی برای جلوگیری از چسبیدن موجودات مزاحم و فولینگ بر سطح خود از مکانیسم‌های دفاعی مختلفی از جمله تولید ترکیبات شیمیایی استفاده می‌کنند. این ترکیبات شیمیایی معمولاً در قالب متابولیت‌های ثانویه توسط موجودات تولید می‌شوند. اغلب این ترکیبات زیستی نسبت به زیست‌کش‌های حاوی قلع موثرتر هستند و از آنجا که توسط خود موجودات دریایی تولید می‌شوند فاقد آلودگی‌های زیست‌محیطی بوده، دارای سمیت بسیار کمتری هستند (Soliman et al., 2014). محصولات زیستی که به عنوان آنتی فولینگ عمل می‌کنند به طور عمده از پنج نوع از ترکیبات شامل تریپن‌ها، ترکیبات حاوی نیتروژن، فنول‌ها، استروئیدها و سایر ترکیبات تشکیل شده‌اند (Omae, 2006) که به طور عمده از اسفنج‌ها، جلبک‌های دریایی، میکروب‌ها و خیارهای دریایی جداسازی شده‌اند (Puentes et al., 2014). خیارهای دریایی گروه فراوان و متنوعی از خارپوستان هستند که دارای بدنی کشیده و معمولاً به صورت گوشتی و نرم هستند. تا کنون بالغ بر ۱۷۱۶ گونه خیار دریایی در سراسر جهان شناسایی و گزارش شده است (Pangestuti

دیاتومه‌ها و میکروجلبک‌ها به عنوان یکی از موجودات اصلی ایجاد کننده فولینگ و بیوفیلیم محسوب می‌شوند. آن‌ها همچنین شرایط را برای چسبیدن و رشد اسپور ماکروجلبک‌ها، لارو بی‌مهرگان و موجودات چسبنده بزرگ‌تر مهیا می‌کنند (Tait and Havenhand, 2013; Yang et al., 2015). در مطالعات مختلف، میکروجلبک‌ها به عنوان موجودات پیشرو در ساکن شدن بر سطوح معرفی شده‌اند (Goffredo et al., 2017). بنابراین بررسی و آزمایش فعالیت‌های ضد میکروجلبکی ترکیباتی که به عنوان مواد آنتی‌فولینگ بالقوه مد نظر هستند، یکی از مراحل مهم و اولیه آزمایشگاهی در پیدا کردن مواد آنتی‌فولینگ جدید است (Yang et al., 2015). از طرفی بررسی ثانویه عملکرد ماده آنتی‌فولینگ تازه معرفی شده در محیط دریا گامی اساسی در تایید یا رد خاصیت آنتی‌فولینگ ماده جدید محسوب می‌شود.

بنابراین در پژوهش حاضر ابتدا فعالیت ضدجلبکی عصاره‌های قطبی، نیمه‌قطبی و غیرقطبی بخش‌های مختلف بدن (دیواره بدن، درخت تنفسی، لوله گوارش و گناد) خیار دریایی *Holothuria leucospilota* بر روی دو گونه میکروجلبک شامل میکروجلبک سبز *Chlorella vulgaris* و میکروجلبک قهوه‌ای (and Arifin, 2018) که از این تعداد طبق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو)، ۵۷ گونه به عنوان گونه‌های با ارزش اقتصادی و پرورشی معرفی شده‌اند (Purcell et al., 2012). خیار دریایی *Holothuria leucospilota* یکی از گونه‌های با ارزش اقتصادی و در نتیجه پرورشی محسوب می‌شود. پرورش این گونه در ایران اولین بار در سال ۱۳۸۴ به صورت توام با میگوی سفید هندی (امینی‌راد، ۱۳۸۴) و تکثیر موفق آن نیز از سال ۱۳۸۹ در مرکز تحقیقات نرم‌تنان بندرلنگه انجام شد (بحیوی و همکاران، ۱۳۹۲). بررسی‌های انجام شده در رابطه با خواص زیست‌شناختی خیارهای دریایی نشان می‌دهد که آن‌ها دارای انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه با خواص زیستی قابل توجه هستند (Bordbar et al., 2011). خیارهای دریایی به منظور حفظ بقای خود متابولیت‌های ثانویه‌ای را تولید می‌کنند که در واقع سلاح‌های شیمیایی آن‌ها است (Thakur et al., 2005). جداسازی این متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال از خیارهای دریایی، می‌تواند به گسترش پوشش‌ها و رنگ‌های سازگار با محیط زیست منجر شود که فاقد اثرات مخرب ترکیبات صنعتی حاوی مس و قلع، بر محیط زیست دریایی باشند.

طلایی *Isochrysis galbana* در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه مناسب‌ترین عصاره‌ها، برای بررسی فعالیت آنتی‌فولینگی در قالب پنل‌هایی با پوشش رزین اپوکسی در محیط طبیعی دریا بررسی شدند.

## مواد و روش‌ها

### مواد زیستی

نمونه‌های خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از عمق حدود ۱۰-۰ متر با جمع‌آوری دستی در جزر کامل و با غواصی از سواحل شنی گلی جزیره هنگام در عرض جغرافیایی  $26^{\circ}65'N$  و طول جغرافیایی  $55^{\circ}88'E$  واقع در خلیج فارس (بندر گرزه) جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با محلول ۵ درصد کلرید منیزیم بی‌هوش و کشته شدند و بخش‌های مختلف بدن آن‌ها شامل دیواره بدن و پوست، گناد، لوله گوارش و درخت تنفسی جدا و در اندازه‌های یک سانتی‌متری برش داده شدند. سپس تمامی نمونه‌ها به کمک دستگاه خشک‌کن انجمادی (Edwards, E2M5، انگلستان) خشک شد. در نهایت نمونه‌های خشک شده آسیاب و همگن شدند و تا زمان عصاره‌گیری، در فریزر ( $-20^{\circ}$  درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند (Mamelona et al., 2007).

عصاره‌گیری و استخراج متابولیت‌های ثانویه عصاره‌گیری برای هر کدام از بخش‌های دیواره بدن، گناد، لوله گوارش و درخت تنفسی به صورت متوالی از نمونه‌های خشک و پودر شده توسط سه حلال ان‌هگزان، اتیل استات و متانول انجام شد. عصاره‌گیری در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت و در تاریکی به روش متوالی انجام شد. به این صورت که مقدار ۵۰ گرم پودر خشک شده از هر اندام خیار دریایی درون ارلن مایر ریخته شده و از حلال غیرقطبی یعنی ان‌هگزان به نسبت ۳:۱ (V/W) بر روی نمونه ریخته شد و برای مدت ۴۸ ساعت در تاریکی قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت، حلال و عصاره به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ از ماده جامد باقیمانده جدا شد و حلال حاوی عصاره با استفاده از دستگاه روتاری (Strike 102، Steroglass، ایتالیا) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شد. در ادامه همین روش به ترتیب برای اتیل استات و متانول نیز انجام شد. عصاره‌های تهیه شده وزن شدند و تا روز بعد برای انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند (Mashjoor and Yousefzadi, 2017).

میکروجلبک‌های کشت داده شده در دمای  $27 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، تا زمان رسیدن به غلظت مناسب نگهداری شدند (Suresh et al., 2016).

#### بررسی اثر عصاره‌ها بر بازدارندگی رشد میکروجلبک‌ها

ارزیابی خواص ضد میکروجلبکی عصاره‌ها با تعیین کمترین غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) دوازده عصاره مختلف خیار دریایی برای هر کدام از میکروجلبک‌ها انجام شد (Suresh et al., 2016).

تهیه میکروجلبک‌ها و شرایط پرورش در ابتدا استوک خالص میکروجلبک‌های *Chlorella vulgaris* و *Isochrysis galbana* از آزمایشگاه کشت جلبک گروه زیست‌شناسی دریا دانشگاه هرمزگان تهیه شد. برای کشت میکروجلبک‌ها از محیط کشت F<sub>2</sub> گیلارد تغییر یافته (Andersen, 2005) استفاده شد (جدول ۱). برای کشت میکروجلبک *I. galbana* آب دریا با شوری ۳۵ قسمت در هزار و برای میکروجلبک *C. vulgaris* آب دریا با شوری ۲۵ قسمت در هزار ساخته شد. در ادامه آب تهیه شده با شوری مناسب در معرض اشعه UV قرار داده شد و مواد مغذی به آن اضافه شد. سپس استوک هر میکروجلبک به آن اضافه شد و هوادهی به صورت مداوم انجام گرفت.

جدول ۱: ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت F<sub>2</sub> (Andersen, 2005)

نام ترکیب	مقدار مورد استفاده (mg/L)	نام ترکیب	مقدار مورد استفاده (mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	۷۵	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	۳/۱۶
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۵	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	۰/۰۱
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	۴/۳۶	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	۰/۰۲۳
Na <sub>2</sub> EDTA	۲۰	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	۰/۰۱۲
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	۰/۱۸	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	۰/۰۷
Vitamin B1	۰/۱	Vitamin B12	۰/۵
Biotin	۰/۵		

در آزمایش‌های ۲۴ ساعته، OD (Optical Density) به وسیله اسپکتروفوتومتر (Cecil، انگلستان) در طول موج ۶۸۰ نانومتر و بازماندگی جلبک‌ها به وسیله لام سدویک و زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. کمترین غلظتی از عصاره که مانع رشد و بازماندگی جلبک حداقل در چهار لوله از شش لوله آزمایش شده بود به عنوان MIC گزارش شد (Suresh et al., 2016).

#### آماده‌سازی پوشش آنتی‌فولینگ

به منظور تهیه پوشش‌های رنگی حاوی مواد آنتی‌فولینگی استخراج شده از خیار دریایی، رزین اپوکسی EP-400 به همراه سخت‌کننده (هاردنر) اختصاصی EP-100 (پارس پامچال، ایران) تهیه شد. برای تهیه پوشش آنتی‌فولینگی ۱، عصاره خشک شده اتیل استاتی دیواره بدن خیار دریایی به میزان ۴ درصد وزنی مخلوط نهایی رزین اپوکسی و سخت‌کننده در اتیل استات حل شد و به مخلوط مذکور اضافه شد. پوشش آنتی‌فولینگ ۲ و ۳ نیز با همین روش اما به ترتیب با اضافه کردن ۲ درصد عصاره اتیل استاتی دیواره بدن و ۲ درصد عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی تهیه شدند. نسبت ترکیب رزین اپوکسی با سخت‌کننده طبق

به منظور بررسی اثرات ضدجلبکی عصاره‌های مختلف خیار دریایی، عصاره‌های به دست آمده، وزن شدند و با نسبت یکسان در حلال دی‌متیل سولفوکسید (Dimethyle Sulfoxide: DMSO) حل شدند. سپس عصاره‌ها به روش رقت متوالی (Serial Dilution) و با غلظت‌های ۰/۵۰۰، ۰/۲۵۰، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش حاوی ریزجلبک و محیط کشت F<sub>2</sub> اضافه شدند به نحوی که در هر لوله آزمایش مخلوطی از آب دریا، محیط کشت F<sub>2</sub> و ریزجلبک موجود بود. این روند آزمایش برای هر کدام از دو ریزجلبک *C. vulgaris* و *I. galbana* به صورت جداگانه انجام شد. غلظت هر کدام از ریزجلبک‌ها در شروع آزمایش ۱×۱۰<sup>۵</sup> سلول در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. شمارش و رصد میکروجلبک‌ها به کمک لام سدویک و غلظت به وسیله اسپکتروفوتومتر بررسی شد. تمامی آزمایش‌ها در لوله‌های آزمایش به مدت ۲۴ ساعت، در دمای ۲۷±۱ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی انجام شد (Xin et al., 2017). شرایط کشت در طول آزمایش یکسان در نظر گرفته شد. هر غلظت به صورت شش تکرار در آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

دستور درج شده از طرف شرکت سازنده به صورت ۷۸:۲۲ در نظر گرفته شد. در ادامه مخلوط‌های آماده شده بر روی پنل‌های فایبرگلاس رنگ‌آمیزی شدند.

#### آماده‌سازی پنل‌ها (تیمارهای آزمایشی)

برای آماده‌سازی پنل‌ها، ورقه فایبرگلاس با ضخامت ۱ میلی‌متر تهیه و در ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متری برش داده شد. ورقه‌های برش داده شده با پوشش‌های رنگی آماده شده به روش غوطه‌وری (دپ) رنگ‌آمیزی شدند. پنل‌ها برای هر نوع پوشش رنگی در سه تکرار تهیه شدند. ورقه فایبرگلاس رنگ‌آمیزی شده با رزین

اپوکسی و سخت کننده بدون عصاره آنتی‌فولینگی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ورقه فایبرگلاس بدون هیچ نوع پوشش‌دهی نیز به عنوان شاهد مازاد در نظر گرفته شد. جدول ۲ نحوه طراحی پنل‌ها را نشان می‌دهد. در نهایت پنل‌ها در فرم‌هایی ثابت شده و برای مدت سه ماه در عمق ۲ متری از سطح آب دریا به کمک بویه‌های شناورسازی قرار داده شدند. هر دو هفته یک بار توسط غواص از پنل‌ها عکس تهیه شد. همچنین پنل‌ها هر ماه یک بار با احتیاط کامل و به آرامی از آب خارج و وزن (دقت ۰/۱ گرم) شدند (Soliman et al., 2014).

جدول ۲: طراحی پنل‌های آزمایشی مورد استفاده در بررسی فعالیت آنتی‌فولینگی عصاره خیار دریایی

#### *Holothuria leucospilota*

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



## تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی عکس‌های گرفته شده از پنل‌ها و تعیین درصد پوشش فولینگ بر سطح پنل‌ها از نرم‌افزار CPe 4.1 استفاده شد (Kohler and Gill, 2006). تجزیه و تحلیل و مقایسه داده‌های به دست آمده از عملکرد آنتی‌فولینگی عصاره‌های خیار دریایی توسط آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شد و سپس مقایسه میانگین تیمارها به کمک پس‌آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ صورت گرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P < 0.05$ ) تعیین شد. برای ثبت داده‌ها و رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Microsoft Excel 2017 استفاده شد.

## نتایج

## آزمایش‌های ضد میکرو جلیبکی آزمایشگاهی

نتایج آزمایشگاهی پژوهش حاضر بر روی عصاره‌های آن‌هگزانی، اتیل استاتی و متانولی اندام‌های مختلف بدن (دیواره بدن، گناد، دستگاه گوارش و درخت تنفسی) خیار دریایی *H. leucospilota* نشان داد که هر دوازده عصاره دارای خاصیت ضد میکرو جلیبکی بر گونه *I. galbana* بودند (جدول ۳). عصاره اتیل

استاتی دیواره بدن، در بین دوازده عصاره مختلف، دارای بیشترین فعالیت ضد میکرو جلیبکی در مقابل گونه *I. galbana* با کمترین MIC به مقدار  $0.062$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. همچنین عصاره متانولی دیواره بدن و اتیل استاتی گناد با MIC  $0.125$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضد میکرو جلیبکی بالایی در مقابل *I. galbana* از خود نشان دادند. از دوازده عصاره مورد آزمایش، یازده عصاره فعالیت ضد میکرو جلیبکی را در مقابل گونه *C. vulgaris* از خود نشان دادند. بیشترین اثر ضد میکرو جلیبکی بر گونه *C. vulgaris* متعلق به عصاره اتیل استاتی دیواره بدن با MIC  $0.250$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود و پس از آن نیز عصاره‌های اتیل استاتی گناد و متانولی دیواره بدن با MIC  $0.500$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر در جایگاه بعدی قرار داشتند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مقایسه دو گونه *I. galbana* و *C. vulgaris*، گونه *I. galbana* دارای مقاومت کمتری در مقابل عصاره‌های مختلف خیار دریایی *H. leucospilota* به ویژه در مقابل عصاره اتیل استاتی دیواره بدن با MIC  $0.062$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

جدول ۳: کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌های اندام‌های مختلف خیار دریایی *Holothuria leucospilota* در مقابل دو گونه میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* و *Isochrysis galbana*

غلظت مهارکنندگی (mg/mL)		عصاره	
<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Isochrysis galbana</i>		
۱	۰/۵۰۰	دیواره بدن	ان‌هگزان
۱	۰/۵۰۰	گناد	
۲	۱	لوله گوارشی	
-	۲	درخت تنفسی	
۰/۲۵۰	۰/۰۶۲	دیواره بدن	اتیل استات
۰/۵۰۰	۰/۱۲۵	گناد	
۱	۰/۲۵۰	لوله گوارشی	
۱	۰/۲۵۰	درخت تنفسی	
۰/۵۰۰	۰/۱۲۵	دیواره بدن	متانول
۱	۰/۲۵۰	گناد	
۲	۱	لوله گوارشی	
۲	۱	درخت تنفسی	

این نتایج، وزن نهایی پنل بدون پوشش و پنل شاهد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P > 0.05$ ). در حالی که با سایر پنل‌های آزمایشی ۱ (حاوی ۰.۴٪ عصاره اتیل استات) دیواره بدن، ۲ (حاوی ۰.۲٪ عصاره اتیل استات) دیواره بدن، و ۳ (حاوی ۰.۲٪ عصاره اتیل استات) دیواره بدن تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان دادند ( $P < 0.05$ ). در پایان دوره آزمایش، وزن نهایی پنل آنتی‌فولینگی ۱ به صورت معنی‌داری از

جلبک *C. vulgaris* با میزان MIC بیشتر برای هر کدام از عصاره‌ها در مقایسه با گونه *I. galbana* در مقابل فعالیت ضدجلبکی عصاره‌ها مقاومت بیشتری از خود نشان داد.

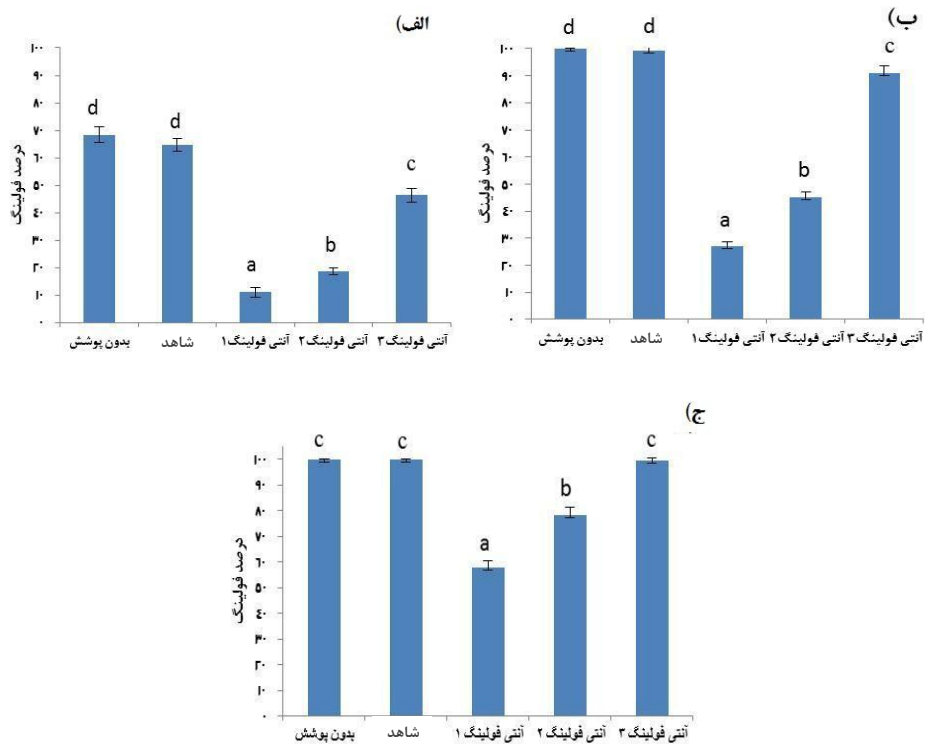
آزمایش‌های آنتی‌فولینگی در محیط دریا نتایج به دست آمده از بررسی عملکرد آنتی‌فولینگی عصاره‌ها بر پایه وزن نهایی موجودات فولینگی کننده بر پنل‌ها در محیط دریا در جدول ۴ نشان داده شده است. بر اساس

سایر پنل‌ها کمتر بود و هر سه پنل آنتی‌فولینگ ۱، ۲ و ۳ با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری داشتند ( $P < 0.05$ ). نتایج به دست آمده از بررسی درصد پوشش فولینگ ایجاد شده در طول دوره آزمایش بر سطح پنل‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان داد که پس از پایان ماه اول و دوم درصد پوشش فولینگ پنل شاهد و پنل بدون پوشش تفاوت معنی‌داری باهم نداشت ( $P > 0.05$ ) اما با پنل‌های آنتی‌فولینگ ۱، ۲ و ۳ به طور معنی‌داری تفاوت آماری داشتند ( $P < 0.05$ ). در پایان ماه سوم پنل شاهد و پنل بدون پوشش علاوه بر این که با هم تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P > 0.05$ ) با پنل آنتی‌فولینگ ۳ نیز تفاوت معنی‌دار آماری نداشتند ( $P > 0.05$ ). در پایان هر سه ماه اول، دوم و سوم پنل آنتی‌فولینگ ۱ دارای کمترین درصد پوشش (به ترتیب ۱۱، ۲۷ و ۵۷/۸ درصد) در بین پنل‌های آزمایشی بود و با پنل‌های دیگر تفاوت معنی‌دار آماری از خود نشان داد ( $P < 0.05$ ).

جدول ۴: نتایج به دست آمده از عملکرد آنتی‌فولینگی متابولیت‌های ثانویه خیار دریایی *Holothuria leucospilota* در پایان دوره سه ماهه آزمایش (میانگین  $\pm$  انحراف معیار؛  $n=3$ ).

وزن	پنل بدون پوشش	شاهد	آنتی‌فولینگ ۱	آنتی‌فولینگ ۲	آنتی‌فولینگ ۳
وزن اولیه پنل (g)	$12/33 \pm 1/53^a$	$13/66 \pm 1/53^a$	$13/33 \pm 1/53^a$	$14/66 \pm 1/15^a$	$13/00 \pm 1/00^a$
وزن نهایی پنل (g)	$278/67 \pm 9/61^d$	$270/67 \pm 11/06^d$	$123/33 \pm 8/32^a$	$184/00 \pm 6/00^b$	$243/67 \pm 7/02^c$

حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها (پنل‌ها) است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۱: مقایسه درصد پوشش فولینگ ایجاد شده بر سطح پنل‌های آزمایشی پس از استقرار در دریا (میانگین  $\pm$  انحراف معیار). الف) درصد پوشش فولینگ پس از یک ماه. ب) درصد پوشش فولینگ پس از دو ماه. ج) درصد پوشش فولینگ پس از سه ماه. شاهد: پوشش رزین اپوکسی بدون عصاره؛ پنل آنتی‌فولینگ ۱: پوشش حاوی ۴ درصد عصاره اتیل استات دیواره بدن خیار دریایی؛ پنل آنتی‌فولینگ ۲: پوشش حاوی ۲ درصد عصاره اتیل استات دیواره بدن خیار دریایی؛ پنل آنتی‌فولینگ ۳: پوشش حاوی ۲ درصد عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی. حروف متفاوت در نمودارها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها (پنل‌ها) است ( $P < 0.05$ ).

**بحث**  
 ضدجلبکی و ضدماکروفولینگی می‌تواند رویکردی بسیار امیدوار کننده و موثر برای جلوگیری از فولینگ زیستی و توسعه رنگ‌های آنتی‌فولینگ جدید باشد. تاکنون ترکیبات مختلفی به واسطه داشتن فعالیت‌های ضد

جداسازی مواد بیوژنیک تولید شده توسط جلبک‌ها (میکروسکوپی و ماکروسکوپی) و بی‌مهرگان دریایی، با خواص ضدباکتریایی،

موجودات فولینگ کننده گزارش شده‌اند. Xin و همکاران (۲۰۱۷) خاصیت آنتی‌دیاتومه‌ای و آنتی‌فولینگی فاز دی‌کلرومتانی جدا شده از عصاره‌گیری کلی باکتری *Bacillus pumilus* با اتیل استات ۹۵ درصد- استون ۵ درصد را به اسیدهای چرب جدا شده به واسطه این عصاره‌گیری نسبت دادند. Li و همکاران (۲۰۱۳) ۴۹ متابولیت ثانویه شامل دی‌ترپنوئیدها، استروئیدها و پلی‌کتیدهای استخراج شده از مرجان‌ها، جلبک‌های قهوه‌ای و قارچ‌ها را گزارش کردند که ۲۰ مورد از این ترکیبات به طور معنی‌داری از نشستن لارو بارناکل‌ها، که از موجودات اصلی ایجاد فولینگ هستند، در بستر ممانعت کردند.

در مطالعه حاضر فعالیت ضد میکرو جلیبکی و آنتی‌فولینگی دوازده عصاره مختلف خیار دریایی *H. leucospilota* که از لحاظ قطبیت متابولیت‌های استخراج شده و اندام‌های مورد استفاده برای استخراج متابولیت‌ها با هم تفاوت داشتند، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به دست آمده از بررسی آزمایش‌های ضد میکرو جلیبکی آزمایشگاهی نشان دهنده فعالیت بالای ضد میکرو جلیبکی هر دوازده عصاره در برابر میکرو جلیبک *I. galbana* و مقاومت کم این گونه در مقابل عصاره‌ها بود. بیشترین اثر

ضدمیکرو جلیبکی عصاره‌ها در مقابله با گونه *I. galbana* متعلق به عصاره اتیل استاتی دیواره بدن با MIC ۰/۰۶۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. در حالی که از بین دوازده عصاره مورد آزمایش یازده عصاره بر میکرو جلیبک *C. vulgaris* اثر مهارکنندگی داشتند و بیشترین میزان اثربخشی هم متعلق به عصاره اتیل استاتی دیواره بدن با MIC ۰/۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. Suresh و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی فعالیت ضد فولینگ متابولیت‌های چربی استخراج شده از جلبک *Padina tetrastrumatica*، سه گونه دیاتومه *Pleurosigma elongatum* و *Thalassionema frauenfeldii* و *Navicula longa* را مورد آزمایش‌های ضد میکرو جلیبکی قرار دادند. نتایج آزمایش آن‌ها نشان دهنده فعالیت بالای مهارکنندگی عصاره جلبک *P. tetrastrumatica* در مقابل هر سه دیاتومه بود. آن‌ها وجود اسیدهای چرب و متابولیت‌های چربی موجود در عصاره *P. tetrastrumatica* را علت احتمالی فعالیت ضد میکرو جلیبکی و آنتی‌فولینگی بالای این عصاره عنوان کردند (Suresh et al., 2016).

در مطالعه حاضر در مقایسه بین دو گونه جلبک *I. galbana* و *C. vulgaris* با توجه به میزان غلظت موثر هر عصاره بر فعالیت هر

ضدمیکروجلبکی متعلق به عصاره اتیل استاتی دیواره بدن خیار دریایی برای میکروجلبک *I. galbana* بود. دلیل فعالیت بالاتر عصاره‌های اتیل استاتی نسبت به عصاره‌های متانولی و آن‌هگزانی را احتمالاً می‌توان به تفاوت در نوع ترکیبات زیست‌فعال استخراج شده با این حلال‌ها نسبت داد. از آنجایی که آن‌هگزان یک حلال غیرقطبی است انتظار می‌رود که روند عصاره‌گیری با این حلال به استخراج ترکیبات کاملاً غیرقطبی و احتمالاً بیشتر رنگیزه‌ها منجر شود در حالی که عصاره‌گیری با اتیل استات ترکیبات غیرقطبی به سمت نیمه‌قطبی را جدا کرده و در ادامه متانول تقریباً تمام ترکیبات قطبی باقی مانده را استخراج می‌کند. بنابراین فعالیت بالای عصاره‌های اتیل استاتی به این معناست که ترکیبات با قطبیت کم و متوسط موجود در خیار دریایی مانند اسیدهای چرب، تریپن‌ها و تریپنوئیدها که عمدتاً حلال مناسب آن‌ها برای استخراج حلال‌های نیمه‌قطبی مانند اتیل استات هستند، دارای فعالیت ضدباکتریایی و ضدمیکروجلبکی بالایی هستند. همان‌طور که مطالعات متعددی متابولیت‌های چربی، تریپن‌ها و تریپنوئیدهای استخراج شده از خیارهای دریایی، جلبک‌ها، مرجان‌ها و غیره را دلیل اصلی فعالیت‌های ضدباکتریایی، سیتوتوکسیک،

جلبک، مشخص شد که برای هر کدام از دوازده عصاره، MIC به دست آمده برای جلبک *C. vulgaris* در مقایسه با جلبک *I. galbana* عدد بزرگتری بود و این به معنی مقاوم‌تر بودن جلبک *C. vulgaris* در مقابل عصاره‌ها و آزمایش‌های ضدجلبکی نسبت به *I. galbana* می‌باشد. مقاوم‌تر بودن جلبک *C. vulgaris*، احتمالاً نشأت گرفته از ساختار و زیست‌شناسی خاص این جلبک است. همان‌طور که جلبک *C. vulgaris* یک گونه مقاوم در برابر تغییرات شوری است و در آب‌های با شوری بسیار پایین تا شوری آب دریا قابل پرورش هستند. اما جلبک *I. galbana* تنها قابلیت زیست و پرورش در آب‌های شور را دارد. بنابراین، این مقاومت می‌تواند به زیست‌شناسی و ویژگی‌های اکولوژیکی گونه‌های جلبک که بر ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها موثر است، مرتبط باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در مقایسه نوع حلال و در نتیجه قطبیت متابولیت‌های ثانویه استخراج شده، به طور کلی عصاره‌های اتیل استاتی استخراج شده از دیواره بدن (شامل پوست و بافت گوشتی زیر پوست) دارای بهترین عملکرد ضدجلبکی بر هر دو گونه میکروجلبک *I. galbana* و *C. vulgaris* بودند همان‌طور که در بین تمام عصاره‌ها بیشترین فعالیت

معنی‌داری از ایجاد فولینگ بر سطح پنل‌ها جلوگیری کردند ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که هر سه پنل آنتی‌فولینگ ۱، ۲ و ۳ خود با یکدیگر تفاوت معنی‌دار آماری داشتند ( $P < 0.05$ ) و پنل آنتی‌فولینگ ۱ که دارای ۴ درصد عصاره اتیل استات دیواره بدن خیار دریایی بود بهترین عملکرد آنتی‌فولینگ را هم از نظر درصد پوشش و هم از نظر وزن نهایی موجودات فولینگ‌کننده از خود نشان داد. پس از آن پنل آنتی‌فولینگ ۲ که دارای ۲ درصد عصاره اتیل استات بود در رتبه دوم قرار داشت. در مطالعه‌ای که توسط Soliman و همکاران (۲۰۱۴) روی خواص آنتی‌فولینگ عصاره خام موکوس پوسته و گناد (تخم‌دان) دو گونه بادکنک ماهی انجام شد، در پایان شش هفته دوره آزمایش به این نتیجه رسیدند که پنل شاهد (رنگ بدون ماده آنتی‌فولینگ) و پنل بدون رنگ، دارای درصد پوشش فولینگ نسبتاً یکسانی بودند و با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که عصاره مخاط و پوسته دارای خاصیت آنتی‌فولینگ بسیار بیشتری نسبت به گناد بود (Soliman et al., 2014).

در مطالعه حاضر بررسی پنل‌ها از لحاظ وزن نهایی (وزن پنل + وزن فولینگ ایجاد شده)

ضدمیکروجلبکی و آنتی‌فولینگ آن‌ها دانسته‌اند (Li et al., 2013; Suresh et al., 2016;) و Li (Mert Ozupek and Cavas, 2017) همکاران (۲۰۱۳) عنوان کردند از بین ۴۹ متابولیت ثانویه‌ای که از مرجان‌ها، جلبک‌های قهوه‌ای و قارچ‌ها گزارش شده‌اند، دو نوع دی‌تریپنوئید با  $EC_{50}$  کمتر از ۰/۱۳ میلی‌گرم در لیتر در مقابل سیپریس بارناکل امیدوار کننده‌ترین گزینه ضدبسترگزینی (نشستن در بستر) بارناکل و در نتیجه ضدفولینگ بودند. همچنین Suresh و همکاران (۲۰۱۶) اثرات آنتی‌فولینگ و مهارکنندگی قوی عصاره جلبک *P. tetrastromatica* در مقابل سه گونه دیاتومه، پنج سویه باکتری و چسبگی پای صدف ماسل به بستر را به اسیدهای چرب و متابولیت‌های چربی موجود در عصاره نسبت دادند.

نتایج به دست آمده از بررسی عملکرد آنتی‌فولینگ عصاره‌ها به صورت پوشش رزین اپوکسی در قالب پنل در محیط دریا نشان داد که از لحاظ درصد پوشش فولینگ ایجاد شده بر سطح پنل‌ها در پایان ماه اول و دوم، هر سه پنل حاوی ماده آنتی‌فولینگ خیار دریایی در مقایسه با پنل بدون پوشش و پنل شاهد (پوشش رزین اپوکسی بدون عصاره) به صورت

به طور کلی در مطالعه حاضر نتایج بخش پنل رزین اپوکسی در محیط دریا با نتایج بخش آزمایشگاهی هماهنگ و تایید کننده آن بود. عصاره اتیل استات دیواره بدن خیار دریایی *H. leucospilota* عملکرد آنتی فولینگ بسیار مناسبی در محیط دریا داشت در حالی که عصاره متانولی دیواره بدن خیار دریایی اگرچه تا حدودی خواص آنتی فولینگ از خود نشان داد، اما در مقایسه با عصاره اتیل استاتی دیواره بدن فعالیت بسیار کمتری داشت. از طرفی خیار دریایی *H. leucospilota* یک گونه پرورشی محسوب می شود، در نتیجه در مقیاس تجاری قابل تهیه و استفاده است. بنابراین با توجه به نتایج پژوهش حاضر عصاره اتیل استاتی دیواره بدن خیار دریایی *H. leucospilota* می تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تهیه رنگ ها و پوشش های آنتی فولینگ دوستدار محیط زیست و جایگزین مناسب رنگ های مضر کنونی، مورد توجه و مطالعات گسترده تری قرار گیرد.

در پایان دوره سه ماهه آزمایش نیز نتایج نسبتا مشابهی با نتایج درصد پوشش داشت. پنل آنتی فولینگ ۱ با کمترین وزن نهایی موجودات فولینگ کننده به میزان  $123/33 \pm 8/32$  گرم دارای بهترین عملکرد آنتی فولینگ در بین پنل های آزمایشی بود ( $P < 0/05$ ) و پس از آن پنل آنتی فولینگ ۲ با وزن  $174 \pm 6$  گرم و بعد از آن هم پنل آنتی فولینگ ۳ با وزن  $243/67 \pm 7/02$  گرم قرار داشتند. پنل های شاهد و بدون پوشش، با بیشترین وزن نهایی، بیشترین فولینگ تجمع شده در سطح را داشتند. Rajan و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطالعه ای بر خاصیت آنتی فولینگ و ضد خوردگی (ضد زنگ زدگی) عصاره جلبک *Gracilaria edulis* اضافه شده به رنگ اپوکسی در خلیج مانار هند انجام دادند و در پایان دوره ۱۲ ماهه آزمایش، وزن فولینگ جمع شده بر پنل استیل بدون رنگ را ۴ کیلوگرم بر متر مربع و وزن فولینگ تجمع کرده بر پنل استیل رنگ شده با عصاره *G. edulis* را ۰/۶ کیلوگرم بر متر مربع گزارش کردند.



## منابع

- امینی‌راد ت. ۱۳۸۴. تعیین اثرات پرورش توام خیار دریایی با میگوی سفید هندی *Penaeus indicus* بر روی رشد وزنی و طولی میگوها. پژوهش و سازندگی امور دام و آبزیان، ۶۸: ۱۹-۲۳.
- یحيوی م.، افخمی م. و احسان‌پور م. ۱۳۹۲. تنوع زیستی خیارهای دریایی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، انتشارات نوروزی. ۱۸۶ص.
- Andersen R.A. 2005.** Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, USA. 578P.
- Berglin M., Larsson A., Jonsson P.R. and Gatenholm P. 2001.** The adhesion of the barnacle, *Balanus improvisus*, to poly(dimethylsiloxane) fouling-release coatings and poly(methyl methacrylate) panels: The effect of barnacle size on strength and failure mode. Journal of Adhesion Science and Technology, 15: 1485–1502.
- Bordbar S., Anwar F. and Saari N. 2011.** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods- A review. Marine Drugs, 9(10): 1761–1805.
- De Nys R. and Guenther J. 2009.** The impact and control of biofouling in marine finfish aquaculture. P: 177–221. In: Hellio C. and Yebra D. (Eds.). Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies. Woodhead Publishing, UK.
- 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. 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.
- Goffredo G.B., Accoroni S., Totti C., Romagnoli T., Valentini L. and Munafò P. 2017.** Titanium dioxide based nanotreatments to inhibit microalgal fouling on building stone surfaces. Building and Environment 112: 209–222.
- 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(7): 43–49.
- Kohler K. E. and Gill S. M., 2006.** Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using

- random point count methodology. *Computers and Geosciences*, 32: 1259–1261.
- 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.
- 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(4): 502–510.
- Mamelona J., Pelletier E., Girard-Lalancette K., Legault J., Karboune S. and Kermasha S. 2007.** Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104: 1040–1047.
- 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.
- 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.
- Omae I. 2006.** General aspects of natural products antifoulants in the environment. P: 227–262. In: Konstantinou I.K. (Ed.). *Antifouling Paint Biocides. The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, Germany.
- Pangestuti R. and Arifin Z. 2018.** Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8: 341–351.
- 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.
- Puentes C., Carreno K., Santos-Acevedo M., Gomez-Leon J., Garcia M., Perez M., Stupak M. and Blustein G. 2014.** Anti-fouling paints based on extracts of marine organisms from the Colombian Caribbean. *Ship Science and Technology*, 8(15): 75–90.
- 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. 155P.
- Rajan R., Selvaraj M., Palraj S. and Subramanian G. 2016.** Studies on the anticorrosive & 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.
- 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(1): 87–98.
- 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): 1–7.
- Suresh M., Iyapparaj P. and Anantharaman P. 2016.** Antifouling activity of lipidic metabolites derived from *Padina tetrastratica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 179(5): 805–818.
- Tait K. and Havenhand J. 2013.** Investigating a possible role for the bacterial signal molecules N-acylhomoserine lactones in *Balanus improvisus* cyprid settlement. *Molecular Ecology*, 22(9): 2588–2602.
- Thakur N.L., Thakur A.N. and Muller W.E.G. 2005.** Marine natural products in drug discovery. *Natural Product Radiance*, 4(6): 471–477.
- Xin X., Huang G., Zhou X., Sun W., Jin C., Jiang W. and Zhao S. 2017.** Potential antifouling compounds with anti-diatom adhesion activities from the sponge-associated bacteria, *Bacillus pumilus*. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 31(9): 1028–1043.
- 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.



Research Paper

**Bioactive compounds of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) added to epoxy resin as environmental friendly antifouling coats**

Mehrnoosh Darya<sup>1</sup>, Mir Masoud Sajjadi<sup>2\*</sup>, Morteza Yousefzadi<sup>3,4</sup>, Iman Sourinejad<sup>5</sup>, Maarooof Zarei<sup>6</sup>

Received: March 2019

Accepted: July 2019

**Abstract**

The use of natural antifouling agents is a new and suitable approach to solve the worldwide biofouling problem. In this study, anti-micro algal and antifouling activity of a series of n-hexane, ethyl acetate and methanol extracts from four sections of sea cucumber *Holothuria leucospilota* (body wall, gonad, digestive tract and respiratory tree) were investigated. Anti-microalgal assay against two microalgae species *Chlorella vulgaris* and *Isochrysis galbana* was conducted to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) for each extract. The best extracts were added to resin epoxy and applied on fiberglass panels (10×10cm). All panels were immersed in the Persian Gulf (Bandar-e-Gorzeh) for three months. Results indicated that ethyl acetate extract of the body wall had the best inhibitory activity against *I. galbana*, with MIC of 0.062 mg/mL. Based on field results, the panel coated with 4% ethyl acetate extract from body wall added to resin epoxy had the lowest final weight (123.33±8.32g) and lowest fouling cover percentage (57.8%) among all panels after three months (P<0.05). Regarding the high antifouling activity of ethyl acetate extract from the body wall of sea cucumber *H. leucospilota*, its use as a potential alternative to commercial biocides in antifouling coats is suggestable.

**Key words:** *Fiberglass, Secondary Metabolites, Biofouling, Microalgae.*

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

2- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, 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 Basic 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.

6- Associate Professor in Department of Chemistry, Faculty of Basic Science, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

\*Corresponding Author: [mmsajjadi@hotmail.com](mailto:mmsajjadi@hotmail.com)