بررسی سمیت اسانس مرزه ریشینگری بر لارو بارناکل گونه *Amphibalanus amphitrite*

مهدیه امیری نژاد[۱]، مرتضی یوسف زادی[۱*]، میترا آرمان[۲] و مهسا رحیم زاده[۳]

[۱] **بندرعباس، دانشگاه هرمزگان ، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست‌شناسی دریا**

[۲] **تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست‌شناسی**

[۳] **بندرعباس، دانشگاه علوم پزشکی هرمزگان، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی**

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۷

چکیده

چرخه‌ی زندگی بسیاری از بی‌مهرگان دریایی دارای یک دوره لاروی است که در طی آن جانور بیشترین حساسیت را نسبت به استرس‌های محیطی دارد که در انجام تست‌های سمیت در بسیاری از مطالعات مقایسه می‌گردد. بارناکل‌ها سخت پوستانی کفزی، دارای جایگاهی آهکی می‌باشند که در حالت بلوغ ساکن‌اند و با پایه‌ای خود را به اجسام داخل آب می‌چسبانند. چرخه زندگی بارناکل‌ها به‌طور معمول شامل دو مرحله می‌باشد، مرحله لاروی با شنای آزاد و مرحله ثابت. مرحله لاروی آنها دارای ۶ مرحله ناپلیوسی می‌باشد. در این مطالعه به‌منظور ارزیابی اثرات سمیت گیاهان دارویی بر روی لارو کشتی چسب (بارناکل) به‌عنوان مدل مطالعه پرداخته شد. این تست براساس تعیین LC_{50} در یک دوره ۲۴ ساعته بر روی مراحل مختلف لاروی صورت گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد، گیاه مرزه گونه*satureja rechingeri* دارای اثرات سمیت بر مراحل مختلف لاروی می‌باشد (۶/۲۰- LC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۶ ناپلیوسی و۲۸/۶۴- LC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۲ لاروی) با افزایش غلظت اسانس درصد مرگ‌ومیر هم افزایش می‌یابد همچنین بین مراحل مختلف لاروی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد بطوریکه مرحله ۶ ناپلیوسی از حساسیت بیشتری برخوردار بود ($P<0.05$). این بررسی نشان داد که از بارناکل میتوان در تست‌های سمیت به‌عنوان مدل مطالعه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: روغن‌های ضروری، سمیت، *satureja rechingeri*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۱۸۸۶۱۳۹ ، پست الکترونیکی: morteza110110@gmail.com

مقدمه

چرخه زندگی بسیاری از بی‌مهرگان دریایی دارای یک دوره لاروی است که در طی آن جانور بیشترین حساسیت را نسبت به استرس‌های محیطی دارد. دوره لاروی اغلب شامل چندین مرحله لاروی است که در هر دوره اندازه، تحرک و همچنین میزان حساسیت در مقابل استرس‌های محیطی متفاوت می‌باشد، درنتیجه میزان حساسیت لاروها در مرحله مختلف از همان‌گونه، در انجام تست‌های سمیت در بسیاری از مطالعات مقایسه می‌گردد (۲). بارناکل‌ها سخت پوستانی کفزی، دارای جایگاهی آهکی می‌باشند که در حالت بلوغ ساکن‌اند و با پایه‌ای خود را به اجسام داخل آب می‌چسبانند. این جانوران در حالت بالغ تک‌پایه‌اند به این معنا که آن‌ها هر دو اندام تناسلی نر و ماده را دارا می باشند. بارناکل‌ها در اقیانوس‌ها، دریاها، بعضی دریاچه‌ها و مصب رودخانه‌ها و یا به‌عبارت‌دیگر در آب‌های شور و لب‌شور و در سطوح مختلف از عمق چند هزار متری تا مناطق فوق جزرومدی پراکنده‌اند چرخه زندگی بارناکل‌ها معمولاً شامل دو مرحله می‌باشد، مرحله لاروی با شنای آزاد و مرحله ثابت. مانند همه سخت‌پوستان، بدن بارناکل

در اسکلتی که از کیتین ساخته‌شده پوشیده می‌شود بارناکل ها هنگامی‌که تخم‌ها از مرحله تکاملی جنینی‌شان عبور می-کنند و سر از تخم بیرون می‌آورند به‌عنوان لارو شناگر وارد مرحله‌ی پلانکتونی می‌شوند. مرحله ناپلیوسی، اولین مرحله لاروی است که خود دارای شش مرحله می‌باشد و پس از گذر از این مراحل لاروی به‌وسیله دگردیسی قبل از استقرار به لارو دیگری موسوم به سیپریس تبدیل می‌شود و سپس به‌وسیله دگردیسی بعد از استقرار به‌صورت یک فرد جوان بر روی سطح مستقر می‌گردد (۱۳).

بارناکل‌ها، در میان جانوران بی‌مهره به دلیل داشتن تولیدمثل فراوان، لارو آن‌ها همیشه در دسترس می‌باشد و از موفق-ترین فولینگ‌های (fouling) بی‌مهره هستند(۴). اغلب گونه‌های بارناکل به‌آسانی قابل‌شناسایی‌اند همچنین پراکنش گسترده آنها، اجازه مقایسه میان مناطق و زمان‌های مختلف را می‌دهد. به دلیل چرخه زندگی دریایی معمول و قابل‌شناسایی، داشتن مراحل لاروی پلانکتونی و ثابت، آن-ها را به گونه‌های مناسبی به‌عنوان مدل‌های اکولوژیک و مانیتورکننده‌های زیستی در مطالعات مربوط به پایش اکوسیستم‌ها تبدیل کرده است (۱).

این سخت‌پوستان هم ازنظر اقتصادی و هم ازنظر اکولوژیک حائز اهمیت می‌باشند به‌طوری‌که آنها از یک‌سو به‌عنوان گونه‌های بنیادی در چرخه‌ی غذایی مناطق بین جزرومدی و از سوی دیگر به‌عنوان موجودات بیوفولینگ محسوب می‌شوند(۷). ازآن‌جهت که در اکوسیستم‌های دریایی بارناکل‌ها با آزادسازی انبوه لارو مورد تغذیه پلانکتون‌خوارها به‌خصوص نرم‌تنان و در مرحله بالغ مورد تغذیه ماهیان کف‌زی قرار می‌گیرد، اهمیت حضور بارناکل-ها در اکوسیستم برای ادامه سیکل زندگی بسیاری از جانداران دریایی ضروری می‌باشد. شناخت مراحل حساس بارناکل‌ها در پاسخ به تغییرات زیست‌محیطی در زیستگاه‌های جزرومدی می‌توان آن را به‌عنوان مدل برای درک اثرات تغییرات آب و هوایی در توزیع گونه‌ها دانست (۴).

مرزه ریشینگری (*Satureja rechingeri*) گیاه بومی ایران است که بطور وسیعی در بخشهای شمالی کشور گسترش دارد این گیاه متعلق به جنس satureja و خانواده Lamiaceaeبوده و در طب سنتی این گیاه به‌عنوان ضد درد و ضد عفونت معروف است (۳) این گیاه در غرب و جنوب کشور نیز دیده میشود.

اگرچه گیاهان معطر عمدتاً در مصارف غذایی، آرایشی و بهداشتی بکار می‌روند اما چنانچه طی آزمایشات و تحقیقات علمی، خواص و اثرات دارویی نیز برای آنها ثابت‌شده، در زمره گیاهان دارویی 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، ضد باکتری، ضدویروسی، و بعضاً ضداکسیدان می‌باشند (۱۱).

هدف اصلی ما از این مطالعه بررسی سمیت گیاه مرزه روی مراحل مختلف لاروی به‌عنوان مدل مطالعه می‌باشد و تابه‌حال اثر سمیت این اسانس بر روی لارو بارناکل کار نشده است.

مواد و روشها

اسانس‌گیری: گیاهان (قسمت برگ) جمع‌آوری‌شده در سایه و دمای مناسب خشک گردید. سپس گیاه را با دستگاه آسیاب پودر کرده سپس ۵۰ گرم از پودر خشک گیاه را درون بالن مربوط به دستگاه کلونجر (Clevenger) ریخته و حجم بالن با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. جریان آب سرد را بازکرده و مقداری آب مقطر از انشعاب بالا ریخته شد که لوله جانبی کاملاً پر شود و سپس هیتر روشن گردید. اسانس‌گیری۳ تا ۴ ساعت طول کشید. اسانس جمع‌آوری‌شده در ظروف تیره و شیشه‌ای دربسته

نگه‌داری شد. ظروف حاوی اسانس در دمای چهار درجه سانتیگراد تا زمان استفاده در یخچال نگه‌داری گردید (۶).

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

نمونه‌برداری بارناکل: بارناکل‌های بالغ *A. amphitrite* چسبیده به قلوه‌سنگ‌ها درزمانی که آب دریا بیشترین جزر را داراست از سواحل بندرعباس جمع‌آوری و به همراه آب دریا به آزمایشگاه زیست‌شناسی منتقل گردید.

نگهداری در شرایط آزمایشگاه: بارناکل *A. amphitrite* پس از انتقال به آزمایشگاه و حذف سایر گونه‌های مزاحم، به‌خوبی با آب معمولی تمیز شدند. سپس بارناکل‌های جداشده در ظرفهایی حاوی۲ لیتر آب دریا با دمای۲۷ درجه سانتیگراد و با شوری ppt ۳۵ نگهداری و توسط پمپ اکسیژن هوادهی شدند. روزانه بارناکل‌های به سنگ چسبیده به‌وسیله ناپلیوس آرتمیا با غلظت ۷ ناپلیوس در میلی‌لیتر تغذیه شدند (۹).

پرورش انبوه لارو جهت تست سمیت در مراحل مختلف لاروی

با ایجاد یک نقطه نوری مشخص در یک‌طرف ظرف حاوی بارناکل‌ها در محیط نسبتاً تاریک لاروهای بارناکل‌ها با استفاده پیپت پاستور پلاستیکی جمع‌آوری و به ظروف کشت لارو انتقال داده شد لاروهای جمع‌آوری شده در مرحله‌ی دوم ناپلیوسی بودند. محیط کشت لاروها حاوی آب دریا با شوری ppt ۳۵ می‌باشد محیط کشت لاروها حاوی فیتوپلانکتونهای *Chlorella vulgaris* و *Chaetoceros calcitrans*، با غلظت ۲×۱۰^{۵} سلول در میلی‌لیتر جهت تغذیه آنها بود. ظروف محیط کشت لاروی به مکانی با ۲۷ درجه سانتیگراد و دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال داده (۸). هر ۲۴ ساعت یک‌بار وضیعت لاروها ازنظر مرگ‌ومیر، زمان و درصد رسیدن لاروها به مرحله بعد مورد ارزیابی قرارگرفت. مراحل مختلف لاروی از روی اندازه و شکل بدن، شاخک‌ها و آنتنولها توسط لوپ قابل‌شناسایی میباشد (۱۰).

تست سمیت: جهت بررسی سمیت اسانس‌ها ابتدا ۲۰۰میکرولیتر از هر اسانس را وزن کرده و حجم آن توسط حلال دی متیل سولفوکسید به ۱۰۰۰میلی‌لیتر رساندیم، سپس در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای که دارای ۲۴ چاهک است و از هر استوک ۶ غلظت ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲۵، ۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه گردید. در ادامه به هر چاهک ۱ میلی‌لیتر آب دریای اتوکلاو با شوری ppt ۳۵ ریخته، سپس به درون هر چاهک ۱۰ عدد لارو بارناکل با استفاده از لوپ و توسط پیپت پاستور اضافه شد، بعد از ۲۴ ساعت پلیت را زیر لوپ برده و تعداد مرده‌ها و زنده‌ها بررسی شد. لاروی که شنا نمی‌کند مرده محسوب میشود (۱۲) در هر مرحله لاروی این روش تکرار شد. هر غلظت با ۳ بار تکرار انجام گرفت به دلیل سمی بودن حلال DMSO (Dimethyle sulfoxide) در هر پلیت یک ستون به‌عنوان کنترل در نظر گرفته و یک ستون نیز حاوی آب دریا و لارو بارناکل به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. درنتیجه با این روند، درصد مرگ‌ومیر در هر غلظت محاسبه گردید. LC_{50} غلظتی از اسانس است که در آن ۵۰ درصد جمعیت کشته شود.

مرتب کردن داده‌ها جهت انجام آنالیزهای آماری و همچنین رسم نمودارها در این تحقیق به‌وسیله‌ی نرم‌افزار Excell (Microsoft office 2010) انجام شد. همچنین تمامی آنالیزهای آماری انجام‌شده در تحقیق پیش رو توسط

نرم‌افزار آماری PASW® version 16 (SPSS 16) انجام پذیرفت. جهت مقایسه درصد کشندگی اسانس در غلظت‌های متفاوت، همچنین مقایسه مراحل مختلف لاروی جهت تعیین میزان حساسیت موردمطالعه در طی هر دوره از آزمایش از آنالیز یک‌طرفه (one-way ANOVA) استفاده گردید، همچنین برای محاسبه LC_{50} اسانس‌ها با استفاده از برنامه probit analysis که یکی از برنامه‌های تحت spss می‌باشد با بازه اطمینان ۹۵ درصد محاسبه گردید.

نتایج

در بررسی ترکیب شیمیایی اسانس *S. rechingeri* از بین ترکیبات شناسایی شده کارواکرول به میزان ۸۰/۳ درصد، بیشترین مقدار از حجم اسانس را به خود اختصاص داد (جدول ۱).

جدول ۱- نوع و میزان ترکیبات اسانس (درصد) گونه *S. rechingeri*

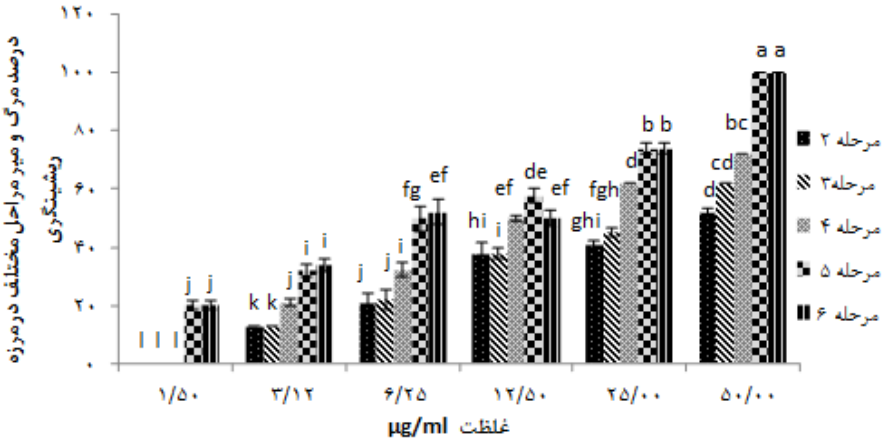
α-Thujene	۱/۵	Limonene	۰/۶
β-Pinene	۰/۵	β-Bisabolene	۱/۴
p-Cymene	۲/۹	Linalool	۱/۲
γ-Terpinen	۲/۱	Cis_Sabinene hydrate	۰/۹
Carvacrol methyl ether	۰/۱	Borneol	۰/۱
Thymol	۰/۳	Terpin-4-ol	۱/۵
Carvacrol	۸۰/۳	Myrcene	۰/۸
β-Caryophyllene	۰/۳		

اثر سمیت غلظت‌های اسانس گونه *S. rechingeri* بر مراحل مختلف لاروی بارناکل اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. نتایج مطالعات ما نشان می‌دهد که مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل دارد و همچنین مرحله ۲ لارو بارناکل مقاومترین حالت را نسبت به سمیت اسانس *S. rechingeri* از خود نشان داد.

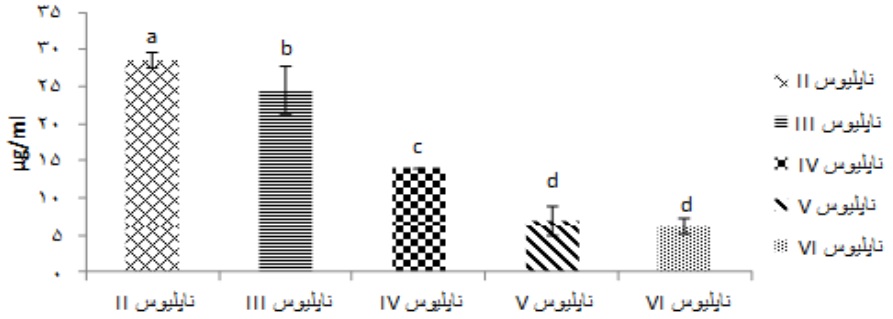
اسانس گیاه *S. rechingeri* در غلظت‌های مختلف سمیت متفاوتی نشان می‌دهد به‌طوری‌که با افزایش غلظت اسانس سمیت آن نیز افزایش می‌یابد. بدین‌صورت که در غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین۰ تا ۲۰ کمترین سمیت را نشان میدهد (صفر درصد کشندگی برای مراحل ۲و ۳ و۴ و ۲۰ درصد کشندگی برای مراحل ۴ و ۵ لاروی) و در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر با درصد کشندگی بین ۵۲ تا ۱۰۰ درصد بالاترین میزان سمیت را نشان می‌دهد (۱۰۰ درصد کشندگی برای مراحل ۵ و۶ و ۵۲ درصد کشندگی برای مراحل۲) (شکل۱).

نتایج (شکل ۲) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در - LC_{50} بین مراحل مختلف لاروی بارناکل گونه *amphitrite-A.* وجود دارد(شکل۳) اما بین مرحله ۵ و ۶ ناپلیوسی تفاوت معناداری یافت نشد ($p<0.05$) (جدول۲).

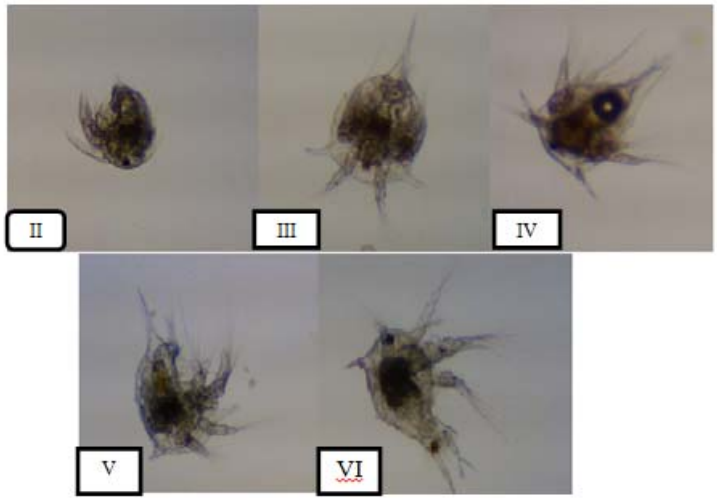
مقدار $LC_{10،15}$ در گیاه *S. rechingeri* به ترتیب ۳/۲۸ و ۴/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله II ناپلیوسی و ۰/۸۷ ,۱/۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله VI ناپلیوسی میباشد. همچنین $LC_{95,99}$ به ترتیب ۴۶۱/۳۸ و ۸۷۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ناپلیوسII و ۷۷/۳۹, ۲۲۰/۰۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ناپلیوس مرحله VI است که این مقایسه‌ها نشان می‌دهد در LC های مختلف مرحله II لاروی از مقاومت بیشتری برخوردار میباشد(جدول ۳).



شکل ۱- مقایسه مربوط به اثرات غلظت های مختلف اسانس گیاه *S. rechingeri* بر مراحل مختلف لاروی بارناکل و مقایسه مراحل ناپلیوسی با یکدیگر. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت اسانس می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه LC_{50} بین مراحل مختلف لاروی در گیاه *S. rechingeri*. آنتنک‌ها نشانه‌ی انحراف معیار و حروف غیرمشابه نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار بین گونه‌های متفاوت گیاه می‌باشد



شکل ۳- مراحل مختلف لارو بارناکل *A.amphitrite*

جدول ۲- مقایسه LC_{50} گونه *S. rechingeri* در مراحل مختلف لاروی

نام گیاه	LC_{50} ($\mu g.mL^{-1}$) در مراحل مختلفی ناپلیوسی				
	مرحله VI	مرحله V	مرحله IV	مرحله III	مرحله II
S. rechingeri	۶/۲۰	۶/۸۹	۱۳/۹۶	۲۴/۵۲	۲۸/۶۴

جدول ۳- نتایج اثر سمیت اسانس گونه گیاهی *S. rechingeri* بر مراحل مختلف لاروی *A.amphitrite* (µg/ml)

نام گونه	نوع اسانس	دوز کشنده	ناپلیوسII	ناپلیوس III	ناپلیوس IV	ناپلیوس V	ناپلیوس VI
A. amphitrite	*S. rechingeri*	LC_{10}	۳/۲۸	۳/۰۱	۲/۰۴۹	۰/۹۴	۰/۸۷
		LC_{15}	۴/۹۷	۴/۵۰	۲/۹۵	۱/۳۷	۱/۲۶
		LC_{50}	۲۸/۶۴	۲۴/۵۲	۱۳/۹۶	۶/۸۹	۶/۲۰
		LC_{85}	۱۶۵/۰۱	۱۳۳/۴۵	۶۵/۹۳	۳۴/۵۵	۳۰/۴۳
		LC_{90}	۲۴۹/۷۲	۱۹۹/۲۵	۹۵/۱۸	۵۰/۵۹	۴۴/۳۳
		LC_{95}	۴۶۱/۳۸	۳۶۰/۸۴	۱۶۴/۰۱	۸۸/۹۹	۷۷/۳۹
		LC_{99}	۸۷۰/۰۵	۸۶۲/۴۳	۴۵۵/۰۵	۲۵۶/۷۰	۲۲۰/۰۹

بحث و نتیجه‌گیری

نوع گیاه و نوع موجود موردمطالعه در غلظت به‌کاربرده شده برای کشتن ۵۰ درصد از موجودات متفاوت می‌باشد و این به دلیل ترکیبات متفاوتی که هر اسانس داراست. ارزیابی آزمون سمیت گیاه جنس *Satureja* این واقعیت را بازگو می‌کند که دارای اثر سمیت بالایی است. نتایج حاصل از محاسبه اثر سمیت غلظت‌های اسانس بر مراحل مختلف لاروی بارناکل اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ۶/۲۰- LC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۶ ناپلیوسی و ۲۸/۶۴- LC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر در مرحله ۲ لاروی نشان‌دهنده این است که مراحل ۵و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل دارد و همچنین مرحله ۲ لارو بارناکل مقاومترین حالت را نسبت به سمیت اسانس *S. rechingeri* از خود نشان داد. در این تحقیق با مشاهده LC_{50} در مراحل مختلف لاروی بارناکل مشخص شد که هر چه مراحل رشد و نمو لاروی به سمت جلو می‌رود مقدار LC_{50} کمتری از خود نشان داد و در غلظتهای پایین‌تری باعث مرگ ۵۰ درصد از لاروها شد.

میزان مرگ‌ومیر در غلظتهای مختلف از ۱/۵ تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسانس با توجه به افزایش غلظت افزایش پیدا می‌کند ($P<۰,۰۵$). در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، مرحله II لاروی در گونه گیاهی , *S. rechingeri* بالای ۵۰ درصد مرگ‌ومیر مشاهده شد. در غلظتهای پایین ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز درصد مرگ‌ومیر پایین‌تر۲۰ درصد بود. همچنین در غلظت ۱/۵میکروگرم در میلی‌لیتر در مرحله II ناپلیوسی گونه‌ی سمیتی مشاهده نگردید.

ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌های گیاهی برحسب 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 می-تواند تغییر کند (۵). ترکیبات عمده گونه‌های جنس مرزه از مونوترپن‌های فنلی مثل تیمول و کارواکرول میباشد که اغلب به همراه گاماترپین، پاراسمین و لینالول وجود دارند و این گروه از ترکیبات فنلی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی میکروبی هستند. مهم‌ترین ترکیبات شیمیایی اسانس

مرزه رشینگری شامل کارواکرول بیش از ۹۰ درصد، پاراسیمن، گاما ترپینن، لیمونن، ۱و ۸ سینئول، اوژنول، میرسن، آلفاتوژن می‌باشد. کارواکرول بعنوان ترکیب اصلی سازنده اسانس در همه مراحل تکوینی می‌باشد به همین جهت از فعالیت بیولوژیکی قابل‌توجهی برخوردار می‌باشند.

کارواکرول حالت مایع و بوئی شبیه به تیمول دارد. وزن مخصوص آن در گرمای ۲۵ درجه ۰/۹۷۵۱ است. در گرمای صفر درجه منجمد می‌گردد. عملاً در آب غیرمحلول ولی به مقادیر زیاد در الکل و اتر حل می‌شود. کارواکرول اثر ضدعفونی کننده دارد و در سنتز بعضی مواد آلی مورد استفاده قرارمی‌گیرد.چنانچه در بیشتر مطالعات از آرتمیا و دافنی به‌عنوان مدل مطالعه استفاده میشود اما برخی از گونه‌های بارناکل مانند *A. amphitirte* در شرایط آزمایشگاهی می‌توان نگهداری کرد. تمام مراحل لاروی در زمان کوتاه ۴ تا ۱۱ روز می‌تواند انجام گیرد 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 (۸). کیو و همکاران در سال ۲۰۰۵ اثر سمی مس بر رشد مراحل مختلف لاروی بارناکل گونه *Balanus amphitrite* و مقایسه حساسیت سه مرحله لاروی در برابر مس موردبررسی قراردادند. نتایج نشان داد کاهش رشد در همه مراحل رخداده و ناپلیوس II بیشترین حساسیت را نسبت به مراحل دیگر لاروی دارد و این مرحله برای انجام تست سمیت استفاده می‌گردد اما نتایج مطالعات ما حاکی از آن است که مراحل ۵ و ۶ لارو بارناکل حساسیت بیشتری نسبت به بقیه مراحل دارد و همچنین مرحله ۲ لارو بارناکل مقاومترین حالت را نسبت به سمیت اسانس گونه گیاهی *S. rechingeri* از خود نشان داد اما ازآنجایی‌که تعداد بیشتری از ناپلیوس II در دسترس می‌باشد و بارناکل‌های بالغ تعداد انبوهی ناپلیوس II زنده تولید می‌کنند همچنین دسترسی سریع در مدت‌زمان کوتاه برای رسیدن به این مرحله، بیشتر برای انجام تست سمیت استفاده می‌شود. از طرفی با انجام کشت انبوه و مرگ‌ومیر تعداد زیادی از ناپلیوس‌ها در حین رشد و نمو و رسیدن به مراحل بعدی تحت شرایط آزمایشگاهی از تعداد لاروها کاسته شده و به دلیل بزرگ شدن و نشست لاروها به کف و کم‌تر شدن پاسخ مراحل بالاتر به نورگرایی، انجام تست سمیت مشکل‌تر شده به همین علت بیشتر از مرحله II ناپلیوسی برای انجام تست‌های سمیت استفاده می‌شود.

منابع

1- Anil, A. C., and Dattesh, D., 2000. Infuence of temperature on the starvation threshold of nauplii of the barnacle *Balanus amphitrite* (Cirripedia: Thoracica), Indian Journal of Marine Sciences, 29, PP: 69-722.

2- Chan, BBK., Prabowe, RE., Lee, K.S., 2009. Crustacean fauna of Taiwan: barnacles, Vol 1- Cirripedia, Thoracica excluding the Pyrgomatidae and Acastinae. Taiwan: National Taiwan Ocean University Press, 298p.

3- Anil, A. C., and Desai, D., 2001. Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica): significance of food concentration, temperature and nucleic acids, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 263, PP: 125–141.

4- Dehkordi, S., Tajik, H., Moradi, M., and Khalighi-Sigaroodi, F., 2010. Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. From different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity, Food and Chemical Toxicology, 48, PP: 1562–1567.

5- Dionı´sio, M., Rodrigues, A., and Costa, A., 2014. A description of the larval development of *Megabalanus azoricus* (Pilsbry, 1916) reared in the laboratory. Helgol Mar Res, 68, PP: 89–9.

6- Epifanio, C. E., 1971. Effects of dieldrin in seawater on the developmentof two species of crab larvae, Leptodius floridanus and Panopeus herbstii, Marine Biology, 11, PP: 356–362.

7- Koryakova, M., and Korn, O., 1993. Using barnacle larvae for evaluation of the toxicity of antifouling paints compounds, Russian Journal of Marine Biology, 19, PP: 212-216.

8- Lin, X., Lu, Y., Ch, Y., and Ye, Y., 2009. Toxicity of crude extracts from several terrestrial plants to barnacle larvae on mangrove seedlings. Ecological Engineering, 35, PP: 502–510.

9- Marechal, J. P., and Hellio, C., 2011. Antifouling activity against barnacle cypris larvae: Do target species matter *(Amphibalanus amphitrite* versus *Semibalanus balanoides*)? International Biodeterioration and Biodegradation Society, 65, PP: 92-101.

10- Moghaddama, M., Khaleghi, M., Ghasemi, G. H., Pirbalouti, A., Mehdizadeh, L., and Ghaderi, Y., 2015. Variation in essential oil composition and antioxidant activity ofcumin (Cuminum cyminum L) fruits during stages of maturity. Industrial Crops and Products, 70, PP: 163–169

11- Nasrolahi, A., Sari, A., Saifabadi, S., and Malek, M., 2007. Effects of algal diet on larval survival and growth of the barnacle *Amphibalanus* (=*Balanus*) *improvises* Journal of the Marine Biological Association of the UK, 87, PP: 1227-1233.

12- Olmedo, R. H., Asensio, C. M., and Grosso, R. N., 2015. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils fromaromatic plants farmed in Argentina. Industrial Crops and Products, 69, PP: 21–28.

13- Piazza, V., Roussis, V., Garaventa, F., Greco, G., Smyrniotopoulos, V., Vagias, S., and Faimali, M., 2011. Terpees from the Red Alga *Sphaerococcus coronopifolius* Inhibit the Settlement of Barnacles, Marine Biotechnology, 13, PP: 764-772.

14- Qiu, J. W., Thiyagarajan, V., Cheung, S., and Qian, P. Y., 2005. Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus Amphitrite*, Marine Pollution Bulletin, 51, PP: 688–693.

Toxicity effect of *Satureja rechingeri* on barnacle *Amphibalanus amphitrite*

Amirinezhad M.[1], Yousezadi M.[1], Arman M.[2] and Rahimzadeh M.[3]

[1] Marine Biology Dept., Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Payame Noor University (PNU), Tehran, I.R. of Iran

[3] Biochemistry Dept., School of Medicine, Hormozgan University of Medical Science, Bandar Abbas, I.R. of Iran

Abstract

The life cycle of many marine invertebrates has a larval period, during which the animals usually most susceptible to environmental stress. As sensitivity is of prime concern when conducting toxicity tests, many studies have compared the sensitivity of different larval stages of the same species. Barnacles are crustacean arthropods. Barnacles are found on hard substrates in virtually all marine habitats and on all levels of the shore, often in vast numbers. This, coupled with the fact that they have a typical marine life cycle with an easily identifiable, planktonic larval stage, has made them a model study organism. The life cycle of a typical barnacle includes two stages a free-swimming larval stage and a sessile adult stage. Stage In this study the toxicity effect of S.rechingeri on the larval stages of barnacles was investigated. Barnacles are a good model for toxicity studies, because have many reproduction and their larvae always are available.This test was done based on the determined LC_{50} in a 24 hours period on larvae of barnacles stages. The results showed the essential oil from plan (S. rechingeri) in hight concentration have the toxicity effect on larvae of barnacles.(LC_{50}-6/20 µg/ml stage VI and LC_{50}-28/66 µg/ml stage II). among the naupliar stages of *Balanus amphitrite*, stage VI is the most sensitive stage($P<0.05$). use of this species in toxicity tests.

Key words: Essential oils, Toxicity, *Satureja rechingeri*