اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف استخراجی از اندام های توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) در ساحل چابهار

آرش شکوری[1*]
ام الیلا جوانمرد کامی قاضی محله [2]
فریبرز سهیلی [3]

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار، ایران
۳. مربی گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران

* **نویسنده مسئول مکاتبات**
Aarash220@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۲۱
کد مقاله: ۱۳۹۴۰۱۰۲۲۱

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد است.

چکیده

خارپوستان گروهی از بی‌مهرگان دریایی بوده که منبع غنی ترکیبات ضد باکتری با مکانیسم فعالیت بالا هستند. این تحقیق به‌منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره های مختلف استخراجی از توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) روی چندین سویه باکتری بیماری‌زای انسانی در سال ۱۳۹۲ در چابهار انجام گردید. پس از انجام نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جانور تشریح و اندام های پوسته، خار و گناد آن جدا و پس از شستشو توسط دستگاه فریز دراير خشک و آسیاب شدند و توسط حلال های آب، اتیل استات، کلروفرم و متانول عصاره-گیری انجام شد. اثرات ضد باکتریایی عصاره های به‌دست‌آمده روی باکتری های بیماری‌زای انسانی شامل *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* با استفاده از دو روش انتشار دیسک در آگار و رقت سازی لوله‌ای تست شد. تجزیه و تحلیل نتایج توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام پذیرفت و نتایج حاکی از آن بود که اثر ضد باکتریایی عصاره‌های متفاوت اندام‌های مختلف دارای اختلاف معنی داری هستند ($P<0/05$). طبق نتایج به‌دست‌آمده از آزمون انتشار دیسک در آگار عصاره های آبی فاقد اثر ضد باکتریایی بودند. عصاره های کلروفرمی خار و پوسته با قطر هاله عدم رشد ۱/۵ ± ۱۴/۳۳ و ۱/۵ ± ۱۱/۳۳ میلی‌متر بیشترین اثر ضد باکتریایی را روی باکتری گرم منفی *E.coli* نشان دادند و میزان قطر هاله های مذبور بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با قطر هاله ۰/۲ ± ۱۰ بودند. نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مشخص کرد که عصاره های کلروفرمی نسبت به عصاره های اتیل استاتی اثر ضد باکتری بهتری دارند. عصاره ی کلروفرمی خار و پوسته بیشترین اثر ضد باکتری را روی باکتری *E.coli* نشان دادند و میزان قطر هاله های مذبور بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با قطر هاله ۰/۲ ± ۱۰ بودند. نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی نیز مشخص کرد که عصاره های کلروفرمی نسبت به عصاره های اتیل استاتی اثر ضد باکتری بهتری دارند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که خار و پوسته گونه مورد مطالعه دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای بوده که نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه و خالص سازی ترکیبات مؤثره دارد. درمجموع، یافته های این تحقیق نشان داد این‌گونه توتیای دریایی یک منبع بالقوه‌ای برای ترکیبات ضد باکتریایی جدید با هدف جایگزینی داروهای شیمیایی می‌باشد

واژگان کلیدی: خواص ضد باکتریایی، توتیای دریایی، *Echinometra mathaei*، انتشار دیسک، هاله عدم رشد، MIC.

مقدمه

شرایط محیطی پیچیده ای بر اقیانوس ها که ۷۱ درصد از سطح زمین را پوشانده‌اند حکم‌فرما است. اقیانوس ها تقریباً نیمی از کل تنوع زیستی جهان را دارا می‌باشند (De Vrites and Hall, 1994) و به‌عنوان منبع غنی از متابولیت ها و ترکیبات زیست فعال محسوب می گردند (Jha and Zirong, 2004; Yasoda *et al.*, 2006). تحقیقات روی درمان بیماری ها با استفاده از محصولات طبیعی مشخص می کند که محصولات دریایی یک منبع بسیار امیدوارکننده برای کشف ترکیبات فعال زیستی هستند. در حال حاضر بسیاری از متابولیت‌های شیمیایی منحصربه‌فرد از محیط های دریایی استخراج‌شده‌اند که در واقع بخش کوچکی از تنوع

Archive of SID
www.SID.ir

زیستی و شیمیایی اقیانوس‌ها را تشکیل می دهند (Ireland *et al.*, 1993). امروزه در اثر تکامل مداوم میکروب‌های بیماری‌زا و مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تقاضا برای ایجاد ترکیبات جدید و مؤثر ضدمیکروبی وجود دارد (De Vrites and Hall, 1994). و ترکیبات به‌دست‌آمده از موجودات دریایی به دلیل داشتن اثر ضدمیکروبی جداسازی و ایزوله شده‌اند (James, 2001). شاخه ی خارپوستان دارای ۷۰۰۰ گونه هستند که شامل رده های ستاره سانان (آستروئیده)، خاردران (اکینوئیده)، خیارسانان (هالوتروئیده)، مارسانان (اوفیوروئیده) و لاله وشان (سیرینوئیده) می باشد (Schillaci and Arizza, 2013). برای اولین بار توسط مردم بومی آسیا اثرات طبی خارپوستان شناسایی و بررسی شد (Reich, 2006). ترکیبات طبیعی از دوران باستان به‌عنوان مهم‌ترین منبع تهیه داروها موردتوجه بوده است و در حال حاضر نیمی از داروهای مورد استفاده انسان مشاء طبیعی دارند و در سال های اخیر گرایش زیادی به جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی به وجود آمده است. ترکیبات طبیعی موجود در جانداران دریایی از جمله خارپوستان را می‌توان به‌عنوان یک منبع غنی با کاربردهای پزشکی، غذایی و دارویی استفاده نمود (Casas *et al.*, 2011). موجودات دریایی کم‌تحرک و یا فاقد تحرک مثل خیارهای دریایی، توتیاهای دریایی و مرجان‌ها تحت تأثیر انواع مختلف میکروب ها قرار دارند. تحقیقات صورت گرفته نشان‌دهنده‌ی کاربردهای ضد سرطانی مولکول های خارپوستان و کنترل رشد باکتری ها به‌عنوان ماده ای با خاصیت جدید آنتی‌بیوتیکی است (Strahl *et al.*, 2002) دفاع شیمیایی ضد باکتریایی به‌عنوان یک راهکار قابل‌اطمینان برای این موجودات مطرح می باشد (Wahl and Banaigs, 1991). پیشرفت‌های مولکولی اخیر ثابت نموده که برخی از میکروارگانیسم‌های هم‌زیست با این بی‌مهرگان یا با تولید ترکیبات طبیعی خاصی یا فعالیت‌های متابولیکی به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی از میزبان خود عمل می کنند (Paul *et al.*, 2008) ترکیبات شیمیایی زیست فعال را می توان به متابولیت های اولیه و ثانویه طبقه بندی کرد. متابولیت‌های ثانویه نقش کلیدی را در دفاع از میزبان در برابر عوامل بیماری زا، انگل‌ها، شکارچیان و رقیبان ایفا می کنند (*et al.*,2001 Harper). عملکردهای مختلف متابولیت های ثانویه باعث می‌شود که برخی از آن‌ها از نظر درمانی بر روی انسان ها مؤثر بوده و از نظر صنعت داروسازی مفید باشند (Briskin, 2000). مطالعات بسیاری در زمینه‌ی خواص ضدمیکروبی اندام های مختلف خارپوستان در جهان صورت گرفته است، از جمله عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی خواص ضدمیکروبی اندام های مختلف توتیای دریایی *Echinometra mathaei* پرداختند. Shankarlal و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد باکتری و آنتی‌اکسیدانی پوسته توتیای دریایی گونه *Salmacis virgulata* را مورد بررسی قرار دادند. همچنین Uma و Parvathavarthini (۲۰۱۴) خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی توتیای دریایی *Temnopleurus Alexandri* را بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی موردبررسی قراردادند. هدف از مطالعه ی حاضر بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف استخراجی از اندام های توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی چندین سویه باکتری بیماری زای انسانی است و فرضیه ی احتمالی این است که اثر ضد باکتری بین عصاره های متفاوت اندام ها دارای اختلاف معنی داری خواهند بود.

مواد و روش ها

نمونه های زنده ی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* در پاییز ۱۳۹۲ از پلاژ ساحلی تیس در چابهار با موقعیت جغرافیایی ۴۲٫۴ ″ ۲۱ ′ ۲۵ ° N=۳۰٫۵ ″ ۳۶ ′ ۰۶۰ ° E= جمع آوری گردید و به آزمایشگاه درون ظرفی که حاوی آب دریای هوادهی شده بود، انتقال یافت. سپس نمونه های زنده روی یخ تشریح شده و پوسته، خار و گناد طبق مطالعه Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲ با دقت از آن‌ها جدا و در ظرف‌های استیل قرار داده شد.

خارها و پوسته ها با آب مقطر جهت از بین رفتن نمک آب دریا شستشو داده شد. برای خشک شدن و از بین رفتن رطوبت در دستگاه فریز درایر (ساخت شرکت JALTEB، مدل GFD ۲L) با دمای ۴۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند، البته بافت گناد به دلیل رطوبت بالایی که دارد به مدت‌زمان بیشتری جهت خشک شدن نیاز دارد (Haug *et al.*, 2002). اندام های خشک‌شده آسیاب و هر یک از اندام ها به نسبت ۱:۲ (حلال/ بافت) در آب و حلال های آلی کلروفرم، متانول و اتیل استات خیسانده شد. به مدت ۲۴ ساعت ظروف حاوی عصاره در جای تاریک روی شیکر قرار داده و سپس مایع رویی از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و حلال آن‌ها توسط لیوفیلیزاتور تبخیر و عصاره های تهیه شده در تست‌های ضد باکتریایی محلولی از عصاره در حلال مربوطه بوده و غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه گردید (فاضلی، ۱۳۸۴; داداش بیگی، ۱۳۸۹ ;and Satish., 2008 Girish). زمانی که حلال ها به اندام ها اضافه گردیدند به مدت ۲۴ ساعت ظروف حاوی عصاره در جای تاریک روی شیکر قرار داده شد و سپس مایع

Archive of SID

www.SID.ir

رویی از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و به روش انتشار از دیسک (Disc diffusion method (DD عصاره های مورد نظر بررسی شدند (جعفری، ۱۳۹۲).

اثرات ضد باکتریایی عصاره های تهیه‌شده بر باکتری های گرم مثبت شامل *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) و *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) و باکتری‌های گرم منفی شامل *Escherichia coli* (ATCC 35218) و *Klebsiella pneumonia* (PTCC 1290)، تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس مطالعه شد. این باکتری ها ابتدا در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد و جهت کشت میکرو ارگانیسم ها در پلیت از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد (Abubakar *et al.*, 2012).

فعالیت ضد باکتریایی عصاره های تهیه شده با استفاده از روش انتشار دیسک آزمایش گردید. به این منظور از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت درون ظروف پتری ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (شرکت تولید تجهیزات پزشکی بهداد) به‌صورت وارونه قرار داده شد. باکتری ها با غلظت ۰/۵ مک فارلند توسط سواپ پنبه استریل به‌صورت چمنی در پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند و بلافاصله دیسک های استریل توسط پنس استریل شده (با استفاده از الکل و شعله) روی پلیت ها بافاصله‌ی مناسب از دیواره و از یکدیگر قرار داده شدند. جهت مقایسه ی نتایج آزمون حساسیت باکتریایی از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نئومایسین به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. عصاره ها توسط سمپلر ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر به میزان ۱۵ میکرولیتر از عصاره با غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی دیسک ها ریخته شد و سپس پلیت ها به‌صورت وارونه در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوباتور به مدت ۱۸-۱۶ ساعت قرار داده شد. البته برای انتروکوکوس و استافیلوکوکوس زمان انکوباتور ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. پس از انکـــوبه گذاری ناحیه های مهار رشد توسط کولیس ورنیه با دقت اندازه گیری شدند (Jahan *et al.*, 2013; Abubakar *et al.*, 2012). جهت اینکه اثر ضد باکتری حلال در نظر گرفته نشود، در هر یک از آزمایش‌ها از نمونه شاهد حلال ها استفاده گردید و قطر هاله عدم رشد بلانک مربوط به هر حلال از قطر هاله عدم رشد عصاره همان حلال کسر گردید (فاضلی، ۱۳۸۳؛ داداش بیگی، ۱۳۸۹).

جهت تعیین MIC (حداقل غلظت ممانعت کنندگی) برای هر عصاره به ازای هر باکتری از روش رقت لوله‌ای مایع (Broth dilution test) استفاده گردید. بدین ترتیب که برای هر عصاره و باکتری مجزا از یک سری لوله‌های ۸ تایی استفاده گردید که ۵ لوله برای غلظت های مختلف هر عصاره و یک لوله به‌عنوان کنترل مثبت (محیط کشت براث + باکتری) و یک لوله به‌عنوان کنترل منفی (براث) و یک لوله هم به‌عنوان کنترل کارایی آنتی‌بیوتیک (محیط کشت براث+ باکتری + آنتی‌بیوتیک) در نظر گرفته شد. به لوله های اول به میزان ۵ میلی لیتر از محیط کشت نوترینت براث و یک میلی لیتر از عصاره های مورد نظر اضافه گردید. بعد از همگن شدن یک سی سی از لوله اول به لوله دوم اضافه و مخلوط گردید و به همین روش تا لوله پنجم ادامه یافت و از لوله پنجم یک سی‌سی دور ریخته شد. از سه لوله ی دیگر به‌عنوان محیط های کشت شاهد و کنترل منفی استفاده شد. سپس به‌تمامی لوله ها به‌جز کنترل منفی، ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری نیم مکفارلند اضافه و توسط سمپلر خوب باکتری را در محیط کشت مخلوط کرده و لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و آخرین لوله‌ای که هیچ کدورت رشدی در آن دیده نشد، به‌عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد در نظر گرفته می‌شود (Madhumathi *et al.*, 2011). تمام لوله های فاقد کدورت رشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره های موردنظر به روش پور پلیت کشت داده شد. بدین ترتیب که یک سی سی از محیط کشت فاقد رشد باکتری از لوله موردنظر برداشته و در پلیت ریخته و ۱۹ سی سی از محیط کشت نوترینت آگار سرد شده به آن اضافه گردید و پلیت ها به شکل عدد هشت لاتین چرخانده می شوند تا هموژن گردند. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور جهت اطمینان از رشد یا عدم رشد باکتری ها قرار داده شدند. آخرین غلظتی از عصاره که قادر به از بین بردن ۹۹/۹ درصد باکتری ها گردد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم ها در نظر گرفته شد (Madhumathi *et al.*, 2011).

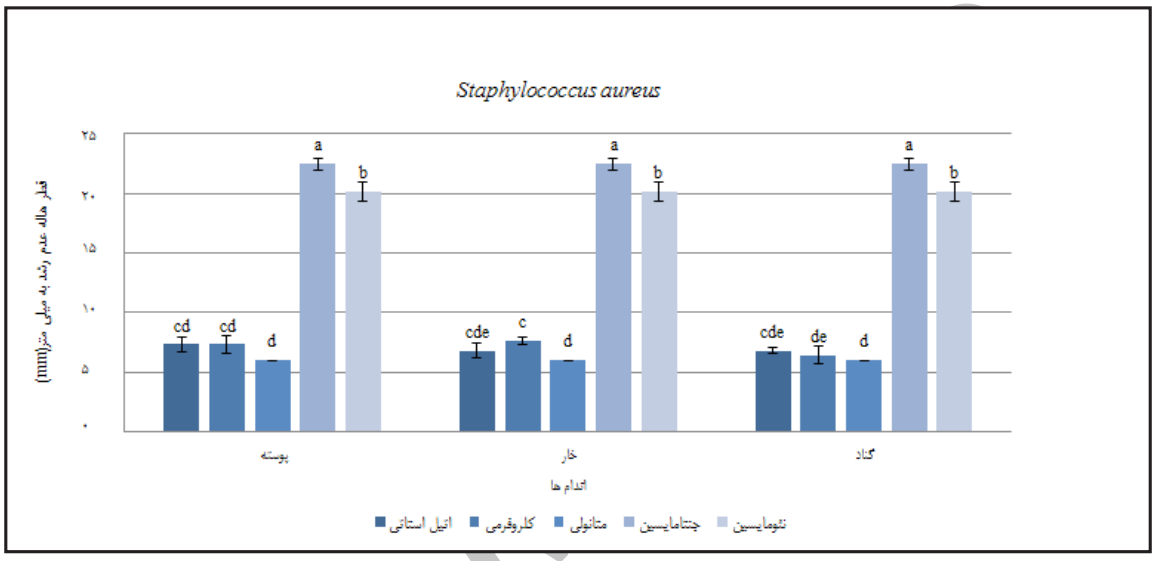
در این بررسی جهت رسم نمودار داده ها از نرم‌افزار Excell ۲۰۱۳ استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم‌افزار Spss ویرایش بیست و دوم انجام شد. بررسی اختلاف معنی‌داری بین غلظت های مختلف عصاره پوسته توتیای دریایی بر باکتری های مختلف توسط آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه داده‌ها در سطح آلفای ۰/۰۵ بررسی شد. تمام آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

در بررسی حاضر اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف اندام های پوسته، خار و گناد توتیای دریایی گونه *E. mathaei* توسط آب و حلال های آلی اتیل استات، متانول و کلروفرم با استفاده از آزمون انتشار از دیسک، تست زده شد که نتایج این آزمون با احتساب تفاضل هاله حلال از هاله عصاره مربوطه به شرح زیر است: عصاره آبی هیچ‌یک از اندام ها اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند. در باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* عصاره های کلروفرمی خار و پوسته استخراج‌شده از توتیای *E. mathaei* بیشترین اثر ضد باکتریایی را نسبت به سایر عصاره ها نشان داده، همچنین عصاره ی خار، پوسته و گناد اتیل استاتی دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی بوده است. عصاره های متانولی اندام های مختلف هیچ‌گونه اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند. عصاره های کلروفرمی و اتیل استاتی بر باکتری مورد مطالعه اثر ضد باکتری کمتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک نئومایسین و جنتامایسین نشان دادند. اثر عصاره های مختلف اندام ها بر باکتری *S. aureus* دارای اختلاف معنی‌داری بوده است (P>۰/۰۵) (شکل ۱).

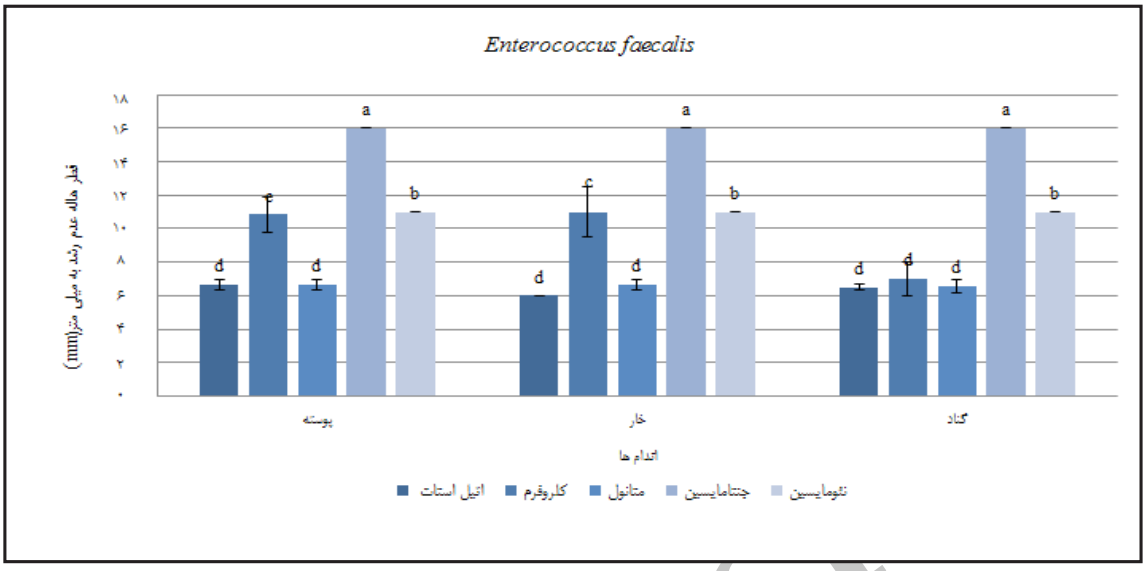


شکل ۱: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج‌شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Staphylococcus aureus*.

(آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

در باکتری *Enterococcus faecalis* بیشترین اثرات ضد باکتری به ترتیب مربوط به عصاره های کلروفرمی خار و پوسته، عصاره های متانولی و در نهایت مربوط به عصاره ی اتیل استاتی پوسته و گناد بود. عصاره های ذکرشده اثر ضد باکتری کمتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نئومایسین داشتند. اثر عصاره های کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی اندام های مختلف روی باکتری *E. faecalis* دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (P>۰/۰۵) (شکل ۲).

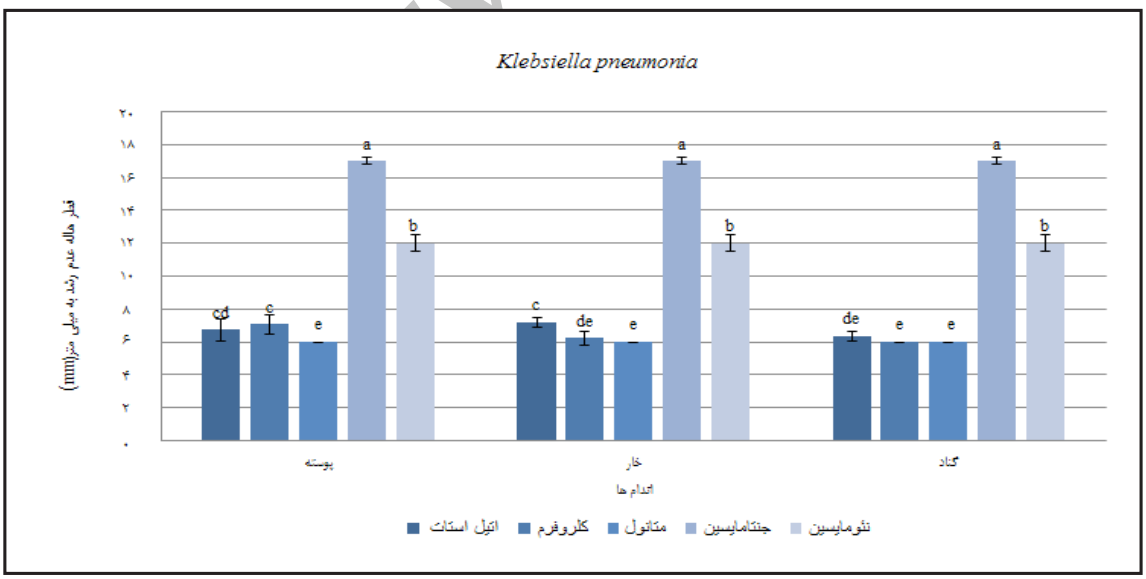
www.SID.ir



شکل ۲: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج‌شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Enterococcus faecalis*.

(آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

در باکتری *Klebsiella pneumonia* بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره ی اتیل استاتی خار و سپس مربوط به عصاره ی کلروفرمی پوسته بود، درحالی‌که عصاره های متانولی هیچ اثر ضد باکتری را در این پژوهش از خود نشان ندادند و اثر ضد باکتری عصاره های مختلف کمتر از آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و نئومایسین بوده است. اثر ضد باکتری عصاره های مختلف اندام ها بر باکتری *K. pneumonia* دارای اختلاف معنی‌داری بودند($P>0/05$)(شکل ۳).



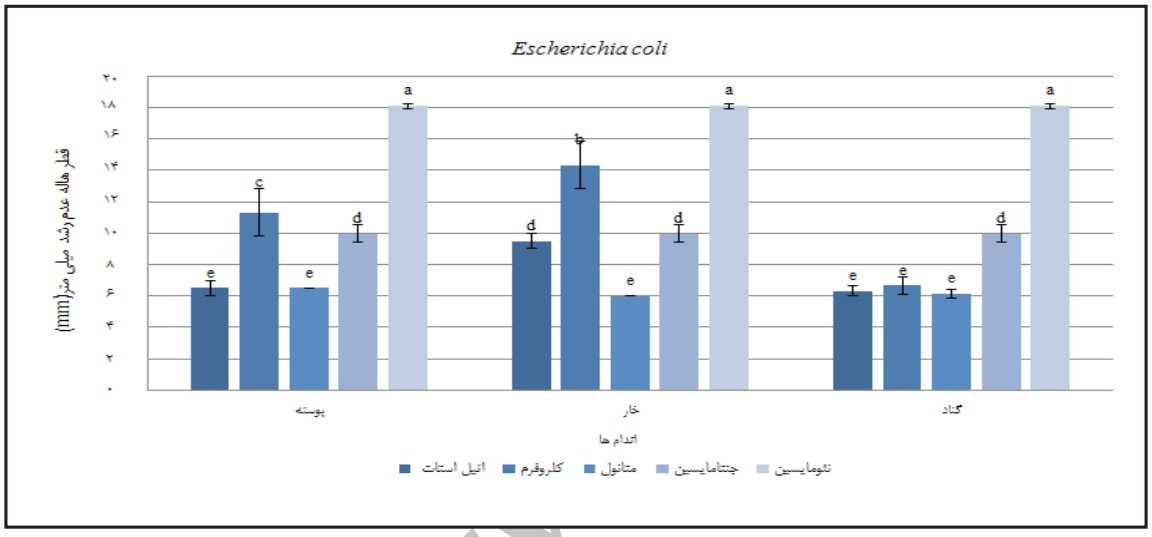
شکل ۳: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج‌شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Klebsiella pneumonia*.

(آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

www.SID.ir

در باکتری *Escherichia coli* بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره های کلروفرمی خار و پوسته بوده که اثری بیشتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین دارند، اما نسبت به نئومایسین اثر ضد باکتری کمتری را نشان دادند. سپس بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره ی اتیل استاتی خار است و پس از آن مربوط به عصاره ی کلروفرمی گناد می باشد. عصاره های متانولی نسبت به عصاره های کلروفرمی و اتیل استاتی خاصیت ضد باکتری کمتری را در این تحقیق نشان دادند. عصاره اتیل استاتی خار با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین فاقد اختلاف معنی بوده)P)۰/۰۵>، اما نسبت به سایر عصاره ها و آنتی‌بیوتیک نئومایسین دارای اختلاف معنی داری بوده و همچنین بین اثر عصاره های مختلف بر باکتری *E.coli* اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P>۰/۰۵)(شکل ۴).

نتایج به‌دست‌آمده از حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره‌های کلروفرمی و اتیل‌استاتی اندام‌های‌پوسته و خار گونه *E. mathaei* در دو غلظت ۰/۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر در جدول ۱ و ۲ بیان‌شده است.



شکل ۴: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج‌شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Escherichia coli*.

(آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

جدول ۱: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره اتیل استاتی پوسته و خار گونه *Echinometra mathaei*.

باکتری	عصاره اتیل استاتی پوسته		عصاره اتیل استاتی خار	
	MBC (میلی گرم)	MIC (میلی گرم)	MBC (میلی گرم)	MIC(میلی گرم)
Escherchia coli	–	۲/۵	۲/۵	۰/۵
Staphylococcus aureus	۲/۵	۰/۵	–	۲/۵
E. faecalis	–	۲/۵	–	۲/۵
Klebsiella pneumonia	–	۲/۵	۲/۵	۰/۵

Archive
www.SID.ir

جدول ۲: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره کلروفرمی پوسته و خار گونه *Echinometra mathaei*.

باکتری	عصاره کلروفرمی پوسته		عصاره کلروفرمی خار	
	MBC (میلی گرم)	MIC (میلی گرم)	MBC (میلی گرم)	MIC (میلی گرم)
Escherchia coli	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
Staphylococcus aureus	–	۲/۵	۲/۵	۰/۵
E. faecalis	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۰/۵
Klebsiella pneumonia	–	۲/۵	–	۲/۵

بررسی عصاره اتیل استاتی پوسته در غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی متر نشان داد که هیچ‌کدام از لوله ها در این غلظت از عصاره، شفافیت نداشته به‌جز لوله مربوط به باکتری *S. aureus* که دارای حداقل غلظت مهارکنندگی است و با افزایش غلظت به ۲/۵ میلی گرم/میلی متر مشاهده شد. لوله های اول مربوط به تمام باکتری ها شفاف و با کشت بر محیط کشت جامد مشخص گردید که عصاره مذبور در این غلظت تنها برای باکتری *S. aureus* دارای حداقل غلظت کشندگی و برای سایر باکتری ها دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بوده است. در عصاره ی اتیل استاتی خار در غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی متر، باکتری *E.coli* و *K. pneumoniae* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بودند و غلظت موردنظر روی باکتری های *S. aureus* و *E. faecalis* هیچ اثر مهاری نشان نداد. با افزایش غلظت عصاره به ۲/۵ میلی گرم/میلی متر باکتری های *E. faecalis* و *S. aureus* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بودند درحالی‌که باکتری های *E.coli* و *K. pneumoniae* حداقل غلظت کشندگی را نشان دادند. در عصاره کلروفرمی پوسته در غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی متر تنها باکتری *E.coli* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی در این دوز بود. با افزایش غلظت به ۲/۵ میلی گرم/میلی متر لوله های اول در تمامی باکتری ها شفاف بودند. باکتری های *S. aureus* و *K. pneumoniae* حداقل غلظت مهارکنندگی و باکتری *E. faecalis* حداقل غلظت کشندگی را در این دوز نشان دادند. در عصاره ی کلروفرمی خار در غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی متر تمامی باکتری ها به‌جز *K. pneumoniae* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بودند. علاوه بر این باکتری *E.coli* در این غلظت دارای حداقل غلظت کشندگی نیز بود. در غلظت ۲/۵ میلی گرم/میلی متر تمامی باکتری ها حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان دادند و جز باکتری *K. pneumoniae* سایر باکتری ها دارای حداقل غلظت کشندگی نیز بودند.

بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر مطالعه و کار در زمینه اثر ضد باکتریایی موجودات دریایی مختلف ازجمله خارپوستان توسط پژوهشگران کشورهای مختلف به فراوانی انجام‌شده است (Ridzwan *et al.*,1995). در بررسی‌های انجام‌گرفته مشخص‌شده است که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله پوریفرا، بریوزوا، نرم تنان، مرجان‌ها و کرم‌های حلقوی آنلیدا دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی می‌باشند (Shakouri *et al.*, 2004). در بررسی حاضر به بررسی خواص ضد باکتری عصاره های متفاوت اندام های مختلف توتیای دریایی *E. mataei* ساحل چابهار پرداخته‌شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اندام‌های مختلف خار، پوسته و گناد دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند و بین اثر ضد باکتری اندام‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P>۰/۰۵) (شکل ۱ تا ۴). این یافته ها تا حدودی مشابه نتایجی است که عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی خود به دست آوردند. آن‌ها خواص ضدمیکروبی اندام های مختلف توتیای دریایی *E. mataei* ساحل ابوموسی از قبیل خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو را مورد مطالعه و بررسی قرار دادند و مشخص شد که بین اثر ضد باکتری اندام های مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد (P>۰/۰۵). همچنین مشابه نتایجی است که Abubakar و همکاران (۲۰۱۲) به دست آوردند آن ها اثر ضد میکروبی عصاره های متفاوت استخراجی از اندام های مختلف توتیای دریایی *Tripneustes gratilla* را روی باکتری های گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار دادند که اثر عصاره های مختلف دارای اختلاف معنی داری بودند (P>۰/۰۵). در مطالعه حاضر طبق نتایج به‌دست‌آمده از آزمون انتشار از دیسک در آگار و رقیق‌سازی محیط کشت مشخص گردید که اثر ضد باکتریایی عصاره های اتیل استاتی، کلروفرمی و متانولی اندام های مختلف بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و منفی دارای اختلاف معنی داری می‌باشند (P>۰/۰۵) که این مطلب می تواند دلیلی بر تأثیر نوع حلال در خاصیت ضد

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریایی عصاره باشد. عصاره های کلروفرمی و اتیل استاتی اثر ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره ی متانولی از خود نشان دادند. بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره های کلروفرمی خار و پوسته بود. در مطالعه ی عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) نیز مشخص شد که عصاره های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی اندام های مختلف ازنظر اثر ضد باکتریایی بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی داری می‌باشند (P>۰/۰۵)؛ که عصاره اتیل استاتی و هگزانی پوسته توتیای دریایی *E.mathaei* اثر ضد باکتریایی قابل‌ملاحظه‌ای نسبت به عصاره متانولی داشتند. در مطالعه ی Abubakar و همکاران (۲۰۱۲) نتایج حاکی از این بود که بیشترین اثر ضد باکتریایی در عصاره متانولی و کلروفرمی گناد و روده و به مقدار بسیار کم در خار و محوطه دهانی مشاهده گردید. روش عصاره گیری و غلظت های متفاوت عصاره نیز درروند فعالیت ضدمیکروبی تأثیرگذار می باشند با تغییر میزان غلظت های عصاره اثرات ضدمیکروبی نیز تغییر می کنند.

Uma و همکاران (۲۰۱۴) خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* را بر باکتری های گرم مثبت و باکتری های گرم منفی مورد مطالعه قرار دادند. این عصاره اثر ضد باکتریایی مناسبی را بر باکتری های مورد مطالعه به‌خصوص باکتری گرم منفی *E. coli* داشته است. بیشینه غلظت عصاره هیدرو الکی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* اثری برابر با اثر آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشته است. همچنین در مطالعه ی عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) مشخص گردید که اثر عصاره اتیل استاتی و هگزانی پوسته توتیای دریایی *E. mathaei* جمع‌آوری‌شده از مناطق قشم و ابوموسی بر باکتری *E.coli* و باکتری *E.faecalis* بیشتر از آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین بوده است. در مطالعه ی حاضر بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره ی کلروفرمی خار روی باکتری گرم منفی *E.coli* بود و این عصاره روی باکتری نامبرده اثر بسیار بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نشان داد. بعد از باکتری *E.coli* بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به باکتری *E.faecalis* بود. مطالعات مختلف نشان داده‌شده که دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت شامل یک‌لایه پپتیدوگلیکان است که ساختار ساده تری نسبت به باکتری های گرم منفی دارند و درنتیجه در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی ضدمیکروبی حساسیت بیشتری دارند (Donnell and Russe, 1999)؛ اما برخلاف این موضوع عصاره های تهیه‌شده روی باکتری گرم منفی *E.coli* فعالیت بهتری را نسبت به باکتری های گرم مثبت نشان دادند. این مسئله که در بعضی مطالعات باکتری های گرم مثبت به‌عنوان گونه های حساس تر شناخته می‌شوند و در بعضی دیگر خلاف این موضوع اثبات می‌شود، می‌تواند ناشی از ویژگی های فردی و سویه ای باکتری ها باشد. نوع حلال در خاصیت ضد باکتری عصاره تهیه‌شده نقش بسیار مهمی دارد، ازآنجایی‌که حلال هگزان یک حلال غیر قطبی است و حلال اتیل استات نیز یک حلال نیمه قطبی می‌باشد، عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) احتمال دادند که ترکیبات شیمیایی موجود در پوسته که عامل خواص ضد باکتری هستند یک ترکیب غیر قطبی یا نیمه قطبی می‌باشد. حتی عصاره ی به‌دست‌آمده توسط گروه تحقیقاتی فوق اثر ضد باکتری بهتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین نشان دادند. در نهایت مشخص شد که اندام پوسته توتیای مورد نظر دارای خاصیت ضد باکتری قابل‌ملاحظه‌ای می‌باشد. در مطالعه ی حاضر نیز قطبیت ضعیف حلال کلروفرم و نیمه قطبی بودن حلال اتیل استات ممکن است باعث استخراج ماده ی مؤثره از خار و پوسته شود که احتمال دارد یک ترکیب غیر قطبی یا نیمه قطبی باشد، هرچند که بدون عمل خالص‌سازی و آنالیز شیمیایی هیچ فرضیه ای قابل‌اثبات نخواهد بود. طبق گفته ی Geissman (۱۹۶۳) اغلب ترکیبات شناخته‌شده با فعالیت ضد میکروبی، غیرقابل‌حل در آب‌اند. در پژوهش Uma و همکاران (۲۰۱۴) ترکیبات عصاره هیدرو الکلی توتیای *T. alexandri* جهت شناسایی به دستگاه GC-MS تزریق شد و آنالیز این دستگاه نشان از حضور استرول‌ها شامل کلسترول و دسمواسترول را داد. طبق گفته ی عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) این احتمال وجود دارد که در توتیای دریایی *E. mathaei* نیز استرول‌ها نقش مؤثری را در خاصیت ضد باکتریایی این‌گونه داشته باشند. فعالیت ضد باکتری تشخیص داده‌شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی در خارپوستان باشد. در مطالعات متعدد، اکثراً اثبات شده که ترکیبات ضدمیکروبی یک نوع لیزوزیم هستند، اما در مطالعاتی که و Haug و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند نشان داد که حداقل برخی از این ترکیبات ضدمیکروبی ترکیبات غیر پروتئینی هستند. جهت اثبات این که آیا فعالیت‌های مشاهده‌شده مربوط به ترکیبات پروتئینی لیزوزیم مانند است و یا مربوط به ترکیبات غیر پروتئینی است نیاز به مطالعه و بررسی بیشتری دارد. عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره هگزانی پوسته توتیای دریایی *E. mathaei* منطقه ابوموسی بر باکتری‌های موردمطالعه را مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که عصاره اتیل استاتی پوسته منطقه ابوموسی با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر بر باکتری های *Shigella flexneri* و *V. logei* اثر بازدارندگی به‌مراتب بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها بر

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری‌های مورد آزمایش داشتند. درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره کلروفرمی پوسته بر باکتری های موردمطالعه مشخص شد که این عصاره بر باکتری *E.coli* در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر بازدارندگی به‌مراتب بهتری نسبت به بقیه باکتری ها داشت و با افزایش غلظت به ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تمامی باکتری ها حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان دادند. عصاره کلروفرمی خار نیز در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری های *E.coli*،*E. faecalis* و *S.aureus* اثر بازدارندگی نشان داد. در عصاره اتیل استاتی پوسته در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تنها باکتری‌های *S.aureus* دارای اثر بازدارندگی بوده و در این غلظت در عصاره اتیل استاتی خار نیز تنها باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumonia* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی است.

حداقل غلظت کشندگی (MBC) در عصاره‌های مختلف متفاوت است. در عصاره کلروفرمی پوسته و خار در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تنها باکتری *E.coli* دارای حداقل غلظت کشندگی بوده و در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی باکتری *E faecalis*. در عصاره کروفرمی پوسته و خار و باکتری *S aureus*. در عصاره کلروفرمی خار حداقل غلظت کشندگی را نشان دادند. در عصاره اتیل استاتی پوسته و خار در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ اثر کشندگی در هیچ‌یک از باکتری‌ها مشاهده نشد، اما در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در عصاره اتیل استاتی پوسته تنها در باکتری *S aureus*. و در عصاره اتیل استاتی خار نیز تنها در باکتری‌های *E.coli* و *K. pneumoniae* دارای حداقل غلظت کشندگی بودیم. به‌طورکلی عصاره‌های کلروفرمی در غلظت پایین ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روی باکتری های موردمطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به‌مراتب بهتری نسبت به سایر عصاره ها نشان دادند که این یافته مغایر با نتایج مطالعات اصلیان بوده که در مطالعه ی ایشان عصاره اتیل استاتی پوسته با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر اثر بازدارندگی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها داشت.

به‌طورکلی در مطالعه ی حاضر و سایر تحقیقات صورت گرفته در زمینه ی خاصیت ضدمیکروبی خارپوستان مشخص گردید که خارپوستان خصوصاً خیارهای دریایی و توتیاهای دریایی دارای ترکیبات منحصربه‌فردی در اندام های خود هستند. در واقع اندام های غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی جدید ند که نیاز به مطالعه و بررسی بیشتر و خالص سازی آن مواد مؤثر دارد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از زحمات بی دریغ جناب آقایان مهندس زاد عباس مسئول محترم آزمایشگاه علوم دریایی دانشگاه چابهار و آقای نجفی کارشناس محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پرستاری و مامایی بندرعباس همچنین از آقای مهندس اصلیان و خانم مهندس جعفری که نهایت همکاری را مبذول داشتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

جعفری، ر.، عطاران فریمان، گ.، طاهری، ع.، ۱۳۹۲. بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره ی فیتوپلانکتون *Chlorella vulgarif* و بلوم دینوفلاژله *Noctiluca miliarif* بومی دریای عمان علیه چند سویه ارگانیسم بیماری زا، صفحات ۴۵-۴۰.

عبدالله اصلیان، ح.، کامرانی، آ.، یوسف زادی، م. و کشاورز، م.، ۱۳۹۲. بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *(Echinometra mathaei)*. صفحات ۵۲-۳۷.

فاضلی، م.، آشتیانی، ح.، احمدیان عطاری، م.، جمالی فر، ح. و زاهری، آ.، ۱۳۸۴. بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره تام سماق (*Rhus coriaria* L.) بر سویه‌های مختلف پوستی *Corynebacterium xerosis*، *Staphylococcus epidermidis*. فصلنامه گیاهان دارویی، شماره ۱۷، صفحات ۳۱ -۲۷.

داداش بیگی، م.، رضاخانی، و.، پشدار، م.، دارابی، آ. و مسرور، ع.، ۱۳۸۹. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه ریحان بر اشریشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شماره ۴، صفحات ۸۰-۷۱.

Abubakar, L., Mwangi, C., Uku, J. and Ndirangu, S., 2012. Antimicrobial activity of various extract of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics, Vol. 1. No. 1.PP. 19-23.

Briskin., D., 2000. Medicinal Plants and Phytomedicines.Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology, 124*: 507-514.

Casas, S.M. Comesana, P., Cao, A. and Villalba, A.2011 „.Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). J. Journal of Invertebrtebrate pathology, Pathol.106: 343–345.

Archive of SID

www.SID.ir

De Vries, D. J. and Hall, M. R., 1994. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. Drug Development Rescarcn. 33. 161–173.

Donnell, G. and Russe, A., 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance Clinical Microbiology Reviews, Vol.12, No.1. pp. 147-179.

Geissman, T., 1963. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds. In: Pyrrole Pigments, Isoprenoid Compounds and Phenolic Plant Constituents (Florkin,M. and Stotz, E.H. ed.), vol. 9. Elsevier, NewYork,), 265.

Girish, H. V. and Satish, S., 2008. Antibacterial Activity of Important Medicinal Plants on Human Pathogenic Bacteria-a Comparative Analysis. World Applied Sciences Journal, 5 (3): 267-271.

Harper, M. K., Bungi, T. S., Copp, R. D., James, B. S., Lindsay, A. D., Richardson, P. C. Schnabel, D., Tasdemir, R. M., Vanwagoner, S. M., Verbitski, M., and Ireland, C. M., 2001. Introduction to the chemical ecology of marine natural products. In: J.B. McClintock and B.J. Baker(eds), Marine chemical ecology, marine biology, pp. 3-69. CRC Press, Boca Raton, Fla. USA.

Haug, T., kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, O. M. and Stensvag, K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa*(Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology,81. 94–102.

Ireland, C. M., Copp, B. R., Foster, M. D., McDonald, L. A., Radisky, D. C. and Swersey, J. C., 1993. Biomedical potential of marine natural products. In: D.H. Attaway and O.R. Zabrosky (eds.) Marine biotechnology: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products, pp. 1-43. Plenum Press, New York.

Jahan, N., Khatoon, R., Shahzad, A., Shahid, M. and Ahmad, S., 2013. Comparison of antibacterial activity of parent plant of Tylophora indica Merr. with its in vitro raised plant and leaf callus. African Journal of Biotechnology, 12(31): 4891 4896.

James, D. B., 2001. Twenty sea cucumber from seasaround indian. Naga, The ICLARM Quartely, 24(1&2): 4-8.

Jha, R. K., and Zirong, Xu., 2004. Biomedical Compounds from Marine organism. Marine Drage. 2(3): 123-146

Kartal, M., Kaya, S., Kurucu, S. Journal of and Topcu, G., 2003. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. Journal of *Ethnopharmacoloy,* 86:69-73.

Madhumathi, V., Deepa, P., Jeyachandran, S., Manoharan, C., and Vijayakumar, C., 2011. Antimicrobial Activity of Cyanobacteria Isolated from Freshwater Lake. International Journal of Microbiological Research, 2(3): 213-216.

Paul, V. J., Puglisi, M. P. and Ritson-Williams, R., 2008. Marine chemical ecology. Nat. Prod. Rep, 25:662-695

Ridzwan, B. H., Kaswandi, M. A., Azman, Y. and Fuad, M., 1995. Screening for antibacterial agents in three species od sea cucumbers from coastal areas of Sabah. General Pharmacoloy, 26(7): 1539-43.

Reich, M. L., 2006. Combrian holothurians the early fossil record and evolution of Holothuroidea. *Journal Georges Ubaghs(Dijon, France: Universite de Bourgogne)* dipl. geol. David Ware, 36-37.

Schillaci, D. and Arizza, V., 2013. Echinoderm Antimicrobial Peptides to Contrast Human Pathogens. Natural Products Chemistry & Research 1:2.

Shakouri, A., Aminrad, T., Nabavi, M. B., Kochanian, P., Savari, A. and Safahiye, A., 2004. New observation of antimicrobial activity of marine halophytic actinopolyspora species AH1 from the west coast of India. Current Science, 86(4) 593-7.

Shankarlal, S., Prabu, k. and Natarajan, E., 2011. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Purple Sea Urchin Shell (*Salmacis virgulata*). American-Eurasian Journal of Scientific Research.3: 178-181.

Strahl, E. D., Dobson, W. E., Lundie, J. R., and L. L., 2002. Isolation and Screening of brittle star- associated bacteria for antibacterial activitu. Curr Microbiol, 44:450-459.

Uma, B. and Parvathavarthini, R., 2014. Antibacterial Activity of Hydroalcohil Extract of Sea Urchin *Temnopleurus Alexandri*. Journal of Applied Research. Issue:11677-1680 :.

Wahl, M. and Banaigs, B., 1991. Marine epibiosis Possible antifouling defense adaptations in Polysyncraton lacazei. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 145:49-63.

Yasoda, H. N., Chi, Z. and Zhu, K., 2006. Probiotics and sea cucumber farming. SPC beche-de-mer Information Bulletin. 24:4-8.

Archive of SID

www.SID.ir