

ارزیابی بررسی و مقایسه اثر مهارکنندگی عصاره‌های ان-هگزانی و استونی استخراج شده از گونه‌های آبفشان (*Phaulasia nigra*)، اسفنج (*Cliona spp.*)، شقایق موکتی (*Sarcophyton spp.*) و ستاره دریایی (*Pentaceraster spp.*) بر باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*)

مرضیه منصور لک‌کوری^۱، کامران رضایی توابع^{۲*}، علیرضا میرواقفی^۳، ملیکا ناظمی^۴، محمد علی نعمت‌اللهی^۵

۱. کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۳. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴. استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

۵. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۳/۱۲

چکیده

محیط زیست دریایی، منبع فرآورده‌های طبیعی زیست فعال است که خصوصیات ساختاری-شیمیایی آن‌ها در دیگر محصولات طبیعی گیاهان و جانوران خشکی وجود ندارد. این مطالعه به منظور بررسی و مقایسه خواص آنتی بیوتیکی عصاره‌های ان-هگزانی و استونی گرفته شده از چهار گونه بی‌مهره بر روی باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*) انجام شد. گونه‌های آبفشان (*Phaulasia nigra*)، اسفنج (*Cliona spp.*)، شقایق موکتی (*Sarcophyton spp.*) و ستاره دریایی (*Pentaceraster spp.*) از جزیره لارک در خلیج فارس جمع‌آوری شدند و عصاره‌گیری به روش خیساندن حلال‌های ان-هگزانی و استون انجام گردید. بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های به دست آمده روی باکتری اشرشیاکلی به روش انتشار در آگار جهت اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد و سپس رقت لوله‌ای به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC) با روش‌های استاندارد صورت گرفت. عصاره‌های ان-هگزانی استخراج شده از هر چهار گونه مورد مطالعه خاصیت مهار و ضد باکتریایی نشان ندادند. عصاره استونی استخراج شده از گونه‌های آبفشان و شقایق موکتی نیز فاقد اثر ضد باکتریایی بودند اما عصاره استونی گونه‌های اسفنج و ستاره دریایی به ترتیب در غلظت‌های ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهارکنندگی را نشان دادند و همچنین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره استونی اسفنج، اثر کشندگی باکتریایی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی گونه اسفنج با قطر $16/2 \pm 1/5$ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی ستاره دریایی با قطر $0/3 \pm 0/2$ میلی‌متر بود. نتایج نشان داد که عصاره استونی گونه‌های اسفنج و ستاره دریایی هر دو حاوی ترکیبات زیست فعال با اثرات ضد باکتریایی هستند، اما میزان قدرت کشندگی باکتریایی عصاره استونی اسفنج بسیار بیشتر از ستاره دریایی است.

واژگان کلیدی: اسفنج دریایی، آبفشان دریایی، ستاره دریایی، شقایق دریایی، حداقل غلظت کشندگی باکتریایی.

۱. مقدمه

بالینی این عفونت به صورت تکرر ادرار، سوزش ادراری، وجود خون در ادرار می‌باشد (Todar, 2007). با توجه به رشد روز افزون جمعیت و همچنین مصرف خودسرانه یا بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها که مهم‌ترین عامل پیدایش مقاومت سویه‌های باکتری علیه آنتی-بیوتیک‌ها است، نیازهای دارویی جدید در جوامع و شناسایی سویه‌های جدید باکتری و مقاوم به آنتی بیوتیک‌های معمول، نیاز به تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید و کارآمدتر در پزشکی و کشف ترکیبات جدید با قدرت تأثیرگذاری بیشتر الزامی است (Kluytmans et al., 1997).

پژوهش در ویژگی‌های دارویی فرآورده‌های طبیعی دریایی موجب کشف مواد فعال زیستی گردیده است (Bell Smith, 2004). محیط زیست دریایی، منبع فرآورده‌های طبیعی و فعال زیستی است که خصوصیات ساختاری-شیمیایی آن‌ها در دیگر محصولات طبیعی گیاهان و جانوران خشکی زی وجود ندارد. از ۲۸ شاخه جانوری عمده، تنها دو شاخه در دریا زیست نمی‌کنند. به دلیل تنوع زیستی، دریا بهترین مکان برای آغاز ساخت ترکیبات دارویی طبیعی است (Nabipoor, 1387). تاکنون پژوهشگران توانسته‌اند ۷۰۰۰ فرآورده طبیعی دریایی را استخراج کنند که ۲۵ درصد از آنها از جلبک‌ها، ۳۵ درصد از اسفنج‌ها، ۱۸ درصد از سلانترها و ۲۴ درصد از دیگر شاخه‌های بی‌مهرگان، مانند غلاف‌داران (Tunicates)، نرم‌تنان، خارتنان و بربوزئوها (Bryozoa) هستند (Carter et al., 2000). براساس برآوردهای سالانه، فرآیند استخراج دارو از دریا، با نرخ سالانه ده درصد افزایش برای ترکیبات جدید، در حال رشد است (Nabipoor et al., 1389). از آنجایی که اسفنج‌ها دارای سیستم دفاعی ضعیفی هستند و از نظر اکولوژی شیمیایی جهت دفع حیوان مهاجم توسعه کمی یافته‌اند، جهت بقا گونه‌ای خود به توانایی آن‌ها برای مقابله و تضعیف موجودات مزاحم زیستی، مهار میکروب‌های بیماری‌زا و ارگانسیم‌های آلوده کننده دیگر بستگی دارد (Newbold et al., 1999). بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که ستاره‌های دریایی دارای ویژگی‌های دارویی و بیولوژیکی مفیدی هستند و استفاده از طیف‌های وسیع گونه‌های ستاره دریایی خشک شده به‌عنوان طب سنتی برای درمان بیماری

دریاها و اقیانوس‌ها بیش از ۷۰ درصد سطح زمین را تشکیل می‌دهند و از طرفی بیش از ۸۰ درصد تنوع زیستی فقط در اکوسیستم‌های آبی وجود دارند. بنابراین اقیانوس‌ها بزرگترین منبع حیات در کره زمین به‌شمار می‌آیند (Villasin and Pomory, 2000). اقیانوس‌ها به‌عنوان خاستگاه زیست و منبع ترکیبات طبیعی هستند که این ترکیبات در موجودات مختلف انباشته شده است. ترکیبات طبیعی موجود در جانداران دریایی را می‌توان به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیباتی با کاربرد غذایی، عطریات، رنگدانه‌های دارویی و پزشکی استفاده نمود (Nazemi and Pishevarzad, 1392). تاکنون نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از موجودات دریایی استخراج و شناسایی شده است که از این تعداد ۴۵ ترکیب با خواص دارویی در مراحل آزمایشی پیش بالینی و بالینی قرار دارند (Franklin and Snow, 2005). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضدباکتریایی منشأ طبیعی دارند و بر اساس یک برآورد اقتصادی در آمریکا سالانه مبلغی بیش از ۲۰ میلیون دلار صرف تولید ترکیبات ضد باکتریایی می‌شود (Kluytmans et al., 1997).

مدت‌ها قبل از کشف انواع داروها بشر به‌طور تجربی آموخته بود که بعضی مواد خام را به‌عنوان عامل ضد بیماری مورد استفاده قرار دهد. ۶۰۰-۵۰۰ سال قبل از میلاد، چینی‌ها شیره کپک زده لوبیای شور را برای درمان عفونت‌ها به کار می‌بردند. اصطلاح آنتی بیوز (Antibiosis) اولین بار در سال ۱۸۸۹ به وسیله ویلمین برای توجیه ماهیت رقابتی جوامع بیولوژیک که در آن فقط قوی‌ترین موجود زنده می‌ماند به کار برد و چند سال بعد این اصطلاح برای آنتاگونیسم میکروارگانسیم‌ها نیز مورد استفاده قرار گرفت (Charles et al., 2007).

باکتری اشریشیاکلی نوعی باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است که به طور شایع در روده جانوران خونگرم وجود دارد (Madigan and Martinko, 2006). این باکتری شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری است که حدود ۹۰ درصد عفونت‌های ادراری را به خود اختصاص می‌دهد. علائم

برای عصاره‌گیری نمونه‌های خرد شده درون ارلن ریخته شد و دو برابر وزن نمونه‌ها نیز حلال افزوده شد. به منظور جداسازی ترکیبات، ابتدا حلال ان-هگزان اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (25°C) قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد تا بخش جامد نمونه‌ها از آن جدا شود. بعد از این مرحله، آنچه باقی می‌ماند، حلال ان-هگزانی و ترکیبات موجود در نمونه‌ها می‌باشد. سپس عصاره به دست آمده به دستگاه روتاری منتقل گردید و در دمای 40°C و 145 دور وارد شد تا حلال (ان-هگزان) تبخیر شده و فقط محلول حای نمونه و ترکیبات آن باقی بماند.

برای عصاره‌گیری با حلال استون نیز مانند روش عصاره‌گیری ان-هگزان، بر روی نمونه‌های جامد تا دو برابر وزن نمونه‌ها استون ریخته شده و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (25°C) قرار داده شدند. بعد از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده را از صافی گذرانده تا بخش جامد نمونه‌ها از آن جدا شود. دوباره محلول به دست آمده (حلال استونی و ترکیبات موجود در نمونه) به دستگاه روتاری جهت تبخیر حلال منتقل گردید (Nazemi and Pishvarzad, 1392).

۳.۲. بررسی خواص ضد باکتریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی به روش انتشار در آگار (چاهک) (Sharma and Sharma, 2011) و رقت لوله‌ای (Bacterial Broth Dilution Methods) به شرح زیر انجام گرفت. ابتدا سویه باکتری *Escherichia coli* ATCC 15224 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس سویه باکتری کشت اولیه داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی‌های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد باکتری‌ها آن‌ها از انکوباتور خارج شدند و با استفاده از آنس کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط برات در لوله‌های آزمایش وارد شدند. این کار آنقدر تکرار شد تا کدورت محیط برات با کدورت لوله مک فارلند $0/5$ یکسان گردید. از سوسپانسیون باکتریایی در شرایط کاملاً

آسم، برونشیت، دیابت و بیماری‌های قلبی از آن استفاده می‌شود (Alves, 2007; Alves, 2011). همچنین شقایق‌های دریایی به صورت طبیعی در مقابل عوامل باکتریایی و انگلی به صورت فاگوسیتوز عمل می‌نمایند. به نظر می‌رسد سلول‌های فاگوسیت کننده در طبیعت به سمت مناطق آلوده و زخم شده مهاجرت می‌نمایند و عمل دفع میکروب‌ها صورت می‌گیرد (Franklin and Snow, 2005).

بخش اعظمی از موجودات دریایی (به خصوص میکروارگانسیم‌ها) هنوز ناشناخته باقی مانده که به تدریج در حال شناسایی می‌باشند (Qaralleh, 2010). حتی در مورد موجودات زنده شناخته شده نیز اطلاعات کافی جهت بهره‌برداری از آن‌ها به دست نیامده است و این در حالی است که هزاران ترکیب شیمیایی خاص تنها از تعداد کمی از این موجودات به دست آمده است (Nabipoor, 1387). این تحقیق با هدف بررسی و مقایسه خواص آنتی بیوتیکی عصاره‌های ان-هگزانی و استونی گرفته شده از چهار گونه بی مهره شامل گونه‌های آلفشان (*Phaulasia nigra*) اسفنج (*Cliona spp.*)، شقایق موکتی (*Sarcophyton spp.*) و ستاره دریایی (*Pentaceraster spp.*) بر روی باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه برداری و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌های آلفشان، اسفنج، شقایق و ستاره دریایی هرکدام به وزن 450 گرم از جزیره لارک جمع‌آوری و شسته شدند. شناسایی نمونه‌ها با توجه به ویژگی‌های ظاهری و با استفاده از کلید شناسایی FAO انجام گرفت. پس از شستشوی نمونه‌ها اپی فیت-های نمونه‌ها، ماسه و شن‌ها جدا شده سپس در اندازه‌های یک سانتی‌متری بریده شدند و در دمای 24°C -درجه سانتی‌گراد منجمد و نگهداری شدند. بعد از آن نمونه‌ها فریز شده و به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران منتقل شدند و بعد از انجمادزدایی، نمونه‌ها برای عصاره‌گیری آماده شدند.

۲.۲. عصاره‌گیری

ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت میزان MIC که به ممانعت از رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها می‌باشد را نشان داده، که نشان‌دهنده این است که می‌تواند به عنوان یک انتخاب مناسب ضد باکتریایی به منظور درمان بیماران مورد آزمایش‌های بعدی قرار بگیرد.

۵.۲. تعیین حداقل غلظت کشندگی مطلق (Minimum Bactericidal Concentration)

در ادامه به منظور تعیین توانایی عصاره‌های مورد نظر در از بین بردن باکتری‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود توسط آنس نمونه گرفته شده و به محیط کشت نوترینت آگار انتقال داده شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها بررسی شدند و تعداد کلونی‌های تشکیل شده (CFU) شمرده شد. در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده بود نشان‌دهنده این بود که عصاره مورد نظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد، اما در پلیت‌هایی که کمتر از ۸ کلونی باکتری مشاهده شد نشان‌دهنده آن بود که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است که این مقدار برابر با MBC می‌باشد (Farjami et al., 2014).

۳. نتایج

۱.۳. انتشار در آگار

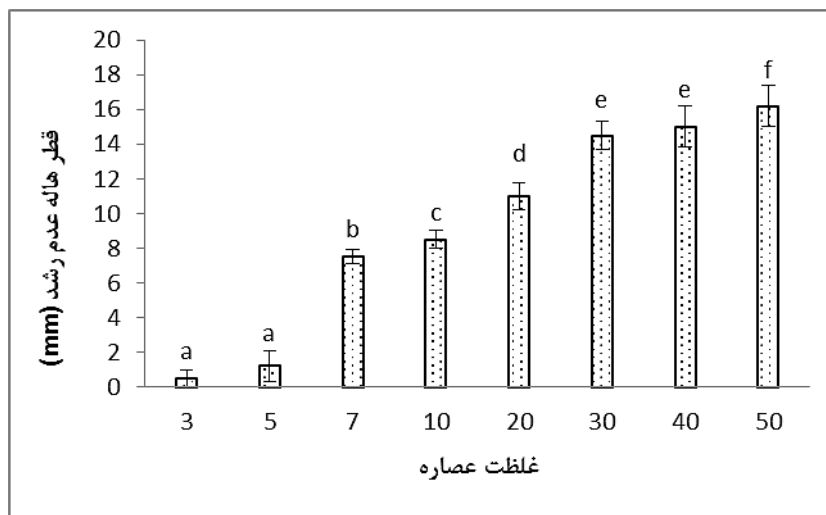
تأثیر رقت‌های مورد مطالعه در جلوگیری از رشد باکتری اشرشیاکلی در روش چاهک گذاری با ایجاد هاله های عدم رشد مشاهده شد. نتایج نهایی حاصل از میانگین میزان هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) در نمودارهای ۱ و ۲ آورده شده است. برای عصاره‌های ان-هگزانی استخراج شده از ۴ گونه مورد آزمایش هیچ گونه هاله عدم رشدی مشاهده نشد. در مورد عصاره-های استونی نیز دو عصاره گرفته شده از شقایق موکتی و آبفشان هیچ گونه قطر هاله‌ای نشان ندادند و بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی استخراج شده از اسفنج با قطر هاله $16/2 \pm 1/5$ و کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت

سترون با سوآب به صورت سطحی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد (Villanova, 2004). سپس در پلیت‌های حاوی محیط مولر هینتون آگار ۵ چاهک به قطر تقریبی ۶ میلی‌متر با فواصل منظم از هم و فاصله مناسب از دیواره پلیت ایجاد شد. در هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از رقت‌های ۰/۱، ۰/۵۰، ۰/۷۵، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱/۰، ۲/۰، ۳/۰، ۴/۰، ۵/۰ mg/ml عصاره ریخته شد. پلیت‌های حاوی کشت باکتری و عصاره به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور 37°C قرار داده شدند. بعد از این مدت قطر هاله‌های عدم رشد تشکیل شده اندازه‌گیری و ثبت شدند. آزمایشات سه بار تکرار شدند و جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 22 استفاده گردید.

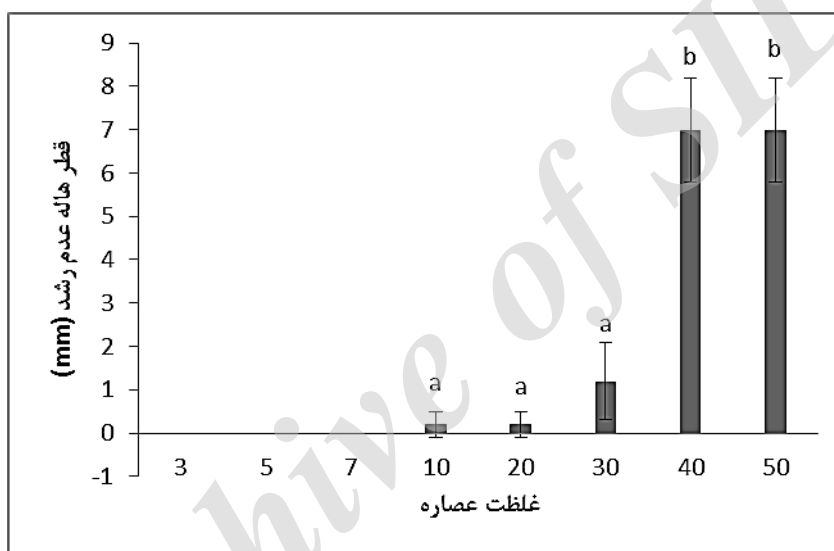
۴.۲. تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitory Concentration)

از لوله مک فارلند ۰/۵ که حاوی $10^6 \times 1/5$ باکتری بود، به مقدار ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های استریل اضافه شد، سپس از آخرین رقت عصاره که دارای کمترین هاله عدم رشد بود به مراتب غلظت‌های رقیق‌تر عصاره‌ها تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های آزمایش اضافه گردید. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی‌سیلین، با غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ درصد استفاده شد و به‌عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس درب تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد (Farjami et al., 2014).

پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آنها مورد بررسی قرار گرفتند. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعال بیولوژیک بود بسیار کدر شده بود، زیرا باکتری‌ها در آن فرصت رشد را داشته اند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند (این آزمایش برای هر عصاره با سه بار تکرار انجام شد) و لوله‌هایی که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت مشاهده نشد به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به



نمودار ۱ - مقایسه قطر هاله عدم رشد (انحراف معیار \pm میانگین) ایجاد شده برای باکتری اشرشیا کلی بین عصاره استونی استخراج شده اسفنج دریایی (حروف لاتین متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می باشد).



نمودار ۲ - مقایسه قطر هاله عدم رشد (انحراف معیار \pm میانگین) ایجاد شده برای باکتری اشرشیا کلی بین عصاره استونی استخراج شده از ستاره دریایی (حروف لاتین متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می باشد).

بر میلی‌لیتر بوده و حداقل اثر مهارکنندگی از رشد برای عصاره استونی ستاره دریایی برابر ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد که عصاره استونی استخراج شده از آبفشان دریایی و شقایق دریایی اثر مهارکنندگی رشد روی باکتری اشرشیاکولای ندارد. عصاره ان-هگزانی استخراج شده از ۴ گونه بی‌مهره فاقد اثر مهارکننده رشد روی باکتری مورد بررسی بوده است.

عصاره ۱۰ و ۲۰ و برای عصاره استونی استخراج شده از ستاره دریایی و با قطر هاله 0.3 ± 0.2 بود. همانگونه که در نمودارها مشخص شده است، در اثرگذاری غلظت‌های متفاوت از عصاره استخراج شده از اسفنج اختلاف معناداری ($P \leq 0.05$) مشاهده شد. اما برای ستاره دریایی تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P \geq 0.05$).

۲.۳. MIC

۳.۳. MBC

بر اساس نتایج جدول ۲، حداقل اثر کشندگی باکتری عصاره استونی اسفنج دریایی بر روی باکتری

بر اساس نتایج جدول ۱، حداقل اثر مهارکنندگی از رشد باکتری عصاره استونی اسفنج دریایی برای باکتری اشرشیاکولای برابر ۱۰ میلی‌گرم

جدول ۱- حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره های گرفته شده از چهار گونه بی مهره مورد مطالعه و دو آنتی بیوتیک روی باکتری اشرشیاکلی

گونه بی مهره	عصاره استونی (MIC)	عصاره ان-هگزانی (MIC)	تتراسایکلین (MIC)	آمپی سیلین (MIC)
اسفنج دریایی	۱۰ mg/ml	-	۱	۱
آبفشان دریایی	-	-	۱	۱
شقایق دریایی	-	-	۱	۱
ستاره دریایی	۴۰ mg/ml	-	۱	۱

جدول ۲- حداقل غلظت کشندگی عصاره های گرفته شده از چهار گونه بی مهره مورد مطالعه و دو آنتی بیوتیک روی باکتری اشرشیاکلی

گونه بی مهره	عصاره استونی (MBC)	تتراسایکلین (MBC)	آمپی سیلین (MBC)
اسفنج دریایی	۲۰ mg/ml	۱/۵	۱/۵
ستاره دریایی	-	۱/۵	۱/۵

ترکیبات استخراج شده از این موجودات روی باکتری ها می باشد. تحقیقات نشان داده که متابولیت های ثانویه اسفنج احتمالاً نقش مهمی در دفاع اسفنج علیه برخی خطرات زیستی دارند (Newbold *et al.*, 1999). همچنین نشان داده شده است که تولید متابولیت های ثانویه اسفنج در حفظ زیست محیطی آنها در برابر مهاجمان، شکارچیان و دیگر رقبا نقش تعیین کننده ای دارند (Devi *et al.*, 2010).

Haug و همکاران (۲۰۰۲) آثار ضدباکتریایی سه گونه خارنن شامل توتیا، ستاره دریایی و خیار دریایی به دست آمده از سواحل نروژ مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که عصاره های طبیعی مانند لیزوزیم های استخراج شده (تست لیزوزیمی) و سنجش بافت خونی از اندام های این سه گونه خارتن به خصوص عصاره های تهیه شده از دیواره بدن و مایع درون شکمی دارای اثر ضدباکتریایی بوده که البته از این میان بیشترین اثر مربوط به عصاره های به دست آمده از قسمت های معده- روده ای و تخم های ستاره دریایی و تخم های خیار دریایی بوده است (Haug *et al.*, 2002). نتایج ضد باکتریایی عصاره ستاره دریایی به دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج مطالعات فوق مشابه بود. محققین مطالعه ای با هدف تعیین اثر آنتی بیوتیکی ستاره دریایی گونه *Asterina pectinifera* بر روی باکتری *Staphylococcus aureus* انجام دادند. برای انجام کار، با استفاده از حلال استون عصاره

اشرشیاکولی ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. عصاره استونی ستاره دریایی فاقد اثر کشندگی روی باکتری اشرشیاکولی بود.

۴. بحث و نتیجه گیری

بسیاری از مطالعات در حال حاضر در زمینه بی مهرگان دریایی نشان دهنده پتانسیل درمانی بالای ترکیبات زیست فعال آنها است. گونه های مختلف ستاره دریایی دارای مواد دارویی مفید و ویژگی های بیولوژیکی متعددی هستند (Emadi, 1387). همچنین از سموم خارتنان در پزشکی و در درمان سرطان استفاده می شود. بسیاری از گونه های اسفنج ها دارای مواد سمی هستند که این مواد نقش مهمی از نظر دارویی برای انسان داشته و اثر آنتی بیوتیکی، ضد سرطان و ضد تومور دارند (Mayer *et al.*, 2011). در شقایق های دریایی فعالیت های آنتی بیوتیکی تا حد زیادی ناشناخته مانده است. دفاع آنتی بیوتیکی و فاگوسیتی سلول های آمیبوسیت استخراج شده از رشته های مزانتز در شقایق های دریایی در برخی از مقاله ها مورد بررسی قرار گرفته است (Alves and Rosa, 2007). بررسی هایی که طی دوره های زمانی مختلف روی گونه های نرم تنان و خارتنان بنتوزی در جهان صورت گرفته و آزمایشاتی که انجام شده و نتایج به دست آمده از تحقیق حاضر بیانگر تأثیر فوق العاده

رشد باکتری اشرشیاکلی می‌باشد که احتمالاً تناقض نتایج مربوط به تفاوت در گونه‌های شقایق و منطقه جغرافیایی متفاوت در دو تحقیق می‌باشد. محققین همچنین مطالعات گسترده‌ای بر روی طیف گسترده‌ای از استرهای فنیل پلی‌برمی استخراج شده از اسفنج دریایی خانواده *Dysidea* برای بررسی سه نوع استر فنیل برمی مورد استفاده قرار دادند. در این مطالعه حداقل غلظت بازدارنده رشد بر روی ۱۲ سویه باکتری گرم مثبت و منفی مورد بررسی قرار گرفت که محدوده غلظت بازدارنده رشد برای تمام باکتری‌های گرم مثبت ۰/۱-۴/۰ mg/l و برای باکتری‌های گرم منفی ۰/۱-۱۶/۰ mg/l بود (Sun et al., 2015). در این تحقیق نیز برای باکتری اشرشیاکلی غلظت بازدارنده رشد عصاره استونی اسفنج ۱۰ mg/ml نشان داده شد که نتایج مشابه نتایج پیشین گونه‌های نرم‌تن مشابه می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، عصاره‌های استونی استخراج شده از اسفنج *Cliona spp.* از لحاظ خواص آنتی بیوتیکی قوی‌تر از سه گونه دیگر مورد مطالعه عمل کرده و هم قدرت مهارکنندگی رشد باکتری و هم قدرت کشندگی باکتری را داشته است. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی گونه اسفنج با قطر $16/2 \pm 1/5$ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصاره استونی ستاره دریایی با قطر $0/3 \pm 0/2$ میلی‌متر بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که عصاره استونی گونه‌های اسفنج و ستاره دریایی هر دو حاوی ترکیبات زیست فعال با اثرات ضد باکتریایی هستند، اما میزان قدرت کشندگی باکتریایی عصاره استونی اسفنج بسیار بیشتر از ستاره دریایی است. همچنین عصاره استونی استخراج شده از ستاره دریایی نیز قدرت مهارکننده رشد باکتری را داشته اما قدرت کشندگی را نداشته است. عصاره‌های ان-هگزانی استخراج شده از گونه‌ها نیز فاقد اثر مهارکنندگی و کشندگی بوده اند.

References

Alves, R.R., Rosa, I.L., 2007. Zootherapy goes to town: the use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 113, 541-555.

استونی از ستاره دریایی استخراج کردند قطر هاله عدم رشد به دست آمده بعد از گذشت ۱۲ ساعت $0/50 \pm 14/5$ میلی‌متر و بعد از گذشت ۱۸ ساعت $12/5 \pm 0/87$ و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به اندازه $11/9 \pm 0/69$ میلی‌متر بود (Choi et al., 2010). در این تحقیق نیز همانطور که در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است بیشترین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده برای باکتری اشرشیاکلی بعد از گذشت ۲۴ ساعت برای عصاره استونی استخراج شده از ستاره دریایی $7 \pm 1/2$ می‌باشد.

Thangaraj و همکاران (۲۰۱۱) مطالعاتی بر روی عصاره‌های دی کلرومتان، اتانول، استون، بوتانول و متانولی دو گونه شقایق دریایی *Stichodactyla mertensii* و *Stichodactyla gigantea* انجام دادند. اثر عصاره‌های گرفته شده را روی ده باکتری گرم مثبت و منفی و ۱۰ قارچ بررسی کردند. بیشترین اثر ضد باکتریایی در شقایق دریایی گونه *S. mertensii* عصاره استونی گرفته شده ثبت گردید و عصاره بوتانولی شقایق *S. gigantea* نیز بیشترین اثر کشندگی را دارا بود. بیشترین اثر ضد قارچی نیز در این آزمایش مربوط به عصاره متانولی شقایق دریایی گونه *S. mertensii* بود. طبق نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بیشترین قطر هاله ایجاد شده برای باکتری سودوموناس آروژینوزا با قطر $12/0 \pm 0/8$ میلی‌متر برای عصاره بوتانولی استخراج شده از شقایق گونه *Stichodactyla gigantea* بود و بیشترین قطر هاله برای قارچ اسپرژیلوس نیجر با قطر $1/2 \pm 10/3$ میلی‌متر برای عصاره متانولی استخراج شده از شقایق *S. mertensii* بود. (Thangaraj et al., 2011). نتایج تحقیق حاضر در تضاد با نتایج به‌دست آمده در تحقیق Thangaraj و همکاران (۲۰۱۱) بود به طوری که در این تحقیق نتایج به دست آمده از عصاره‌های استونی و ان-هگزانی استخراج شده از شقایق موکتی نشان دهنده عدم توانایی این عصاره‌ها در جلوگیری از

Alves, R.R., Alves, H.N., 2011. The faunal drugstore: animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 10, 1746-4269.

- Bell, J.J., Smith, D., 2004. Ecology of sponge assemblages (Porifera) in the Wakatobi region, south-east Sulawesi, Indonesia: richness and abundance. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 84, 581- 591.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren R.J., Wimberly B.T., Ramakrishnan V., 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics". *Nature* 407, 340-348.
- Charles, R., Craig, B., Robert, E., 2007. Stitzel. Modern Pharmacology with Clinical Applications, 6th ed. 510 p.
- Choi, G.H., Kim, B.A., Park, C.I., Kim, Y.Y., 2010. The effect of phytosphingosine isolated from *Asterina pectinifera* on cell damage induced by mite antigen in HaCaT cell and antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Biotechnology* 9, 920-926.
- Devi, P., Wahidullah, S., Rodrigues, C., Souza, L. D., 2010. The sponge-associated bacterium *Bacillus licheniformis* SAB1: a source of antimicrobial compounds. *Marine Drugs* 8, 1203-1212.
- Emadi, H., 1387. Saltwater Aquarium fishes. Aquaculture Scientific Publications. Tehran, 262 p.
- Franklin, T.J., Snow, G.A., 2005. Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action. 6th edition, New York: Springer, 135 p.
- Farjami, B., Nematollahi, M.A., Moradi, Y., Irajian, G.R., Nazemi, M., 2014. Study of Antibacterial Effect of the Extracts of the Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) of Persian Gulf on the *Escherichia coli*, Iranian *Journal of Medical Microbiology*, 8, 27-33.
- Haug T., Kjuul A.K., Styrvold O.B., Sandsdalen E., Olsen Q.M., Stensvag K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 941-949.
- Kluytmans J., Belkum A., Verbrugh H., 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews* 10, 505-520 .
- Madigan M.T., Martinko J.M., 2006. Brock Biology of microorganisms. Pearson press. 11th ed, 404 pp .
- Mayer A.M.S., Rodriguez A.D.R., Berlinck G.S., Fusetani N., 2011. Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C, 153, 191-222.
- Nabipoor, I., Najafi, A., Bolkheyr, A., 1389. Persian Gulf pharmaceutical mollusks, Bushehr University of Medical Sciences and Health Services, Bushehr, 1-61 .
- Nabipoor, I., 1387. Marine medicine. Bushehr University of Medical Sciences and Health Services, Bushehr, 155-167 .
- Nazemi, M., Pischevarzad, F., 1392. Antibacterial Investigation of *Axinella sinoxea* sponge extracts from Persian Gulf Lark Island. Young Researchers Club, Islamic Azad University, Science and Research Branch, 7, 11-18 .
- Newbold, R.W, Jensen, P.R, Fenical, W., Pawlik, J.R. 1999. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquatic Microbial Ecology* 19, 279-284.
- Qaralleh, H., Idid, S., Susanti, D., Taher, M., Khleifat, K., 2010. Antifungal and antibacterial activities of four Malaysian Sponge Species (Petrosiidae). *Journal de Mycologie Medicale* 20, 315-320 .
- Sun, S., Canning, C.B., Bhargava, K., Sun, X., Zhu, W., Zhou, N., Zhang, Y., Zhou, K., 2015. Polybrominated diphenyl ethers with potent and broad spectrum antimicrobial activity from the marine sponge Dysidea. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 2181-2183.
- Sharma, A., Sharma, K., 2011. Should solubility and zone of inhibition be the only criteria for selection of solvent in antimicrobial assay? *Advances in Biological Research* 5, 241-247 .
- Todar, K., 2007. Pathogenic *E. coli*. Online textbook of bacteriology. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Retrieved -11-30.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., Suganthi K., Sri kumar, N., 2011. Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S43-S46.
- Villasin, J., Pomory, C.M., 2000. Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea). *Fish and Shellfish Immunology* 10, 46-57.
- Villanova, P.A., 2004. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. National Committee for Clinical laboratory standards (NCCLS). USA. 3rd ed. Approved standard M7-A6.