شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

صفحات ۴۷۰-۴۶۲

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

مرضیه منصورلکورج[۱]، کامران رضایی توابع*[۲]، علیرضا میرواقفی[۳]، ملیکا ناظمی[۴]، محمد علی نعمت اللهی[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 خشکی‌زی وجود ندارد. این مطالعه به‌منظور بررسی و مقایسهٔ خواص آنتی بیوتیکی عصاره‌های ان- هگزانی و استونی گرفته شده از چهار گونهٔ بی‌مهره بر روی باکتری اشرشیاکلی (*E. coli*) انجام شد. گونه‌های آبفشان (*Phaulasia nigra*)، اسفنج (*Cliona* spp.)، شقایق موکتی (*Sarcophyton* spp.) و ستارهٔ دریایی (*Pentaceraster* spp.) از جزیرهٔ لارک در خلیج فارس جمع‌آوری شدند و عصاره‌گیری به روش خیساندن حلال‌های ان- هگزان و استون انجام گردید. بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های به‌دست آمده روی باکتری اشرشیاکلی به روش انتشار در آگار جهت اندازه‌گیری قطر هالهٔ عدم رشد و سپس رقت لوله‌ای به‌منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC) با روش‌های استاندارد صورت گرفت. عصاره‌های ان-هگزانی استخراج شده از هر چهار گونهٔ مورد مطالعه خاصیت مهار و ضد باکتریایی نشان ندادند. عصارهٔ استونی استخراج شده از گونه‌های آبفشان و شقایق موکتی نیز فاقد اثر ضد باکتریایی بودند اما عصارهٔ استونی گونه‌های اسفنج و ستارهٔ دریایی به ترتیب در غلظت‌های ۱۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهارکنندگی رشد باکتری را نشان دادند و همچنین در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصارهٔ استونی اسفنج، اثر کشندگی باکتریایی مشاهده گردید. نتایج نشان داد که بیشترین قطر هالهٔ عدم رشد مربوط به عصارهٔ استونی گونهٔ اسفنج با قطر ۱/۵±۱۶/۲ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصارهٔ استونی ستارهٔ دریایی با قطر ۰/۲±۰/۳میلی‌متر بود. نتایج نشان داد که عصارهٔ استونی گونه‌های اسفنج و ستارهٔ دریایی هر دو حاوی ترکیبات زیست فعال با اثرات ضد باکتریایی هستند، اما میزان قدرت کشندگی باکتریایی عصارهٔ استونی اسفنج بسیار بیشتر از ستارهٔ دریایی است.

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

* نویسنده مسوول: تلفن: ۹۸۲۶۳۲۲۲۳۰۴۴+ ایمیل: krtavabe@ut.ac.ir

۱. مقدمه

دریاها و اقیانوس ها 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 می آیند (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).

مدت ها 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 شیرهٔ کپک زدهٔ لوبیای شور را برای درمان عفونت‌ها به کار می‌برند. 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 میکروارگانیسم‌ها 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 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. به‌دلیل 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 بریوزئوها (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). ازآن‌جایی که اسفنج‌ها دارای سیستم دفاعی ضعیفی هستند و از نظر اکولوژی شیمیایی جهت دفع حیوان مهاجم توسعهٔ کمی یافته‌اند، جهت بقاء گونه‌ای خود به توانایی آن‌ها برای مقابله و تضعیف موجودات مزاحم زیستی، مهار میکروب‌های بیماری‌زا و ارگانیسم‌های آلوده کنندهٔ 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

آسم، برونشیت، دیابت و بیماری‌های قلبی از آن استفاده می‌شود (Alves, 2007; Alves, 2011). همچنین شقایق‌های دریایی به‌صورت طبیعی در مقابل عوامل باکتریایی و انگلی به‌صورت فاگوسیتوز عمل می‌نمایند. به‌نظر می رسد 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 (به‌خصوص میکروارگانیسم‌ها) 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 مقایسهٔ خواص آنتی بیوتیکی عصاره‌های ان- هگزانی و استونی گرفته شده از چهار گونهٔ بی مهره شامل گونه‌های آبفشان (*Phaulasia nigra*) اسفنج (*Cliona spp.*)، شقایق موکتی (*Sarcophyton* spp.) و ستارهٔ دریایی (*Pentaceraster* spp.) بر روی باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) انجام گردید.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه‌برداری و شناسایی نمونه‌ها

نمونه‌های آبفشان، اسفنج، شقایق و ستاره دریایی هرکدام به وزن ۴۵۰ 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 اپی‌فیت‌های نمونه‌ها، ماسه و شن‌ها جدا شده سپس در اندازه‌های یک سانتی‌متری بریده شدند و در دمای ۲۴- 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 عصاره گیری آماده شدند.

۲.۲. عصاره گیری

برای عصاره‌گیری نمونه‌های خرد شده درون ارلن ریخته شد و دو برابر وزن نمونه‌ها نیز حلال افزوده شد. به‌منظور جداسازی ترکیبات، ابتدا حلال ان-هگزان اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵°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 عصارهٔ به‌دست آمده به دستگاه روتاری منتقل گردید و در دمای ۴۰°C و ۱۴۵ 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 (۲۵°C) قرار داده شدند. بعد از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده را از صافی گذرانده تا بخش جامد نمونه ها 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 Pishevarzad, 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 به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس سویه باکتری کشت اولیه داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی‌های تک به‌منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد باکتری‌ها آن‌ها از انکوباتور خارج شدند و با استفاده از آنس کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط براث در لوله‌های آزمایش وارد شدند. این کار آنقدر تکرار شد تا کدورت محیط براث با کدورت لوله مک فارلند ۰/۵ یکسان گردید. از سوسپانسوین باکتریایی در شرایط کاملاً

سترون با سوآب به صورت سطحی بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد (Villanova, 2004). سپس در پلیت های 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، ۱/۵، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ mg/ml عصاره ریخته شد. پلیت های حاوی کشت باکتری و عصاره به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور ۳۷°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 داده ها از نرم افزار SPSS 22 استفاده گردید.

۴.۲. تعیین حداقل غلظت بازدارنده (Minimum Inhibitory Concentration)

از لوله مک فارلند ۰/۵ که حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ 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 رقیق تر 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 ۳۷°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 لوله ها 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 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 به‌منظور درمان بیماران مورد آزمایش‌های بعدی قرار بگیرد.

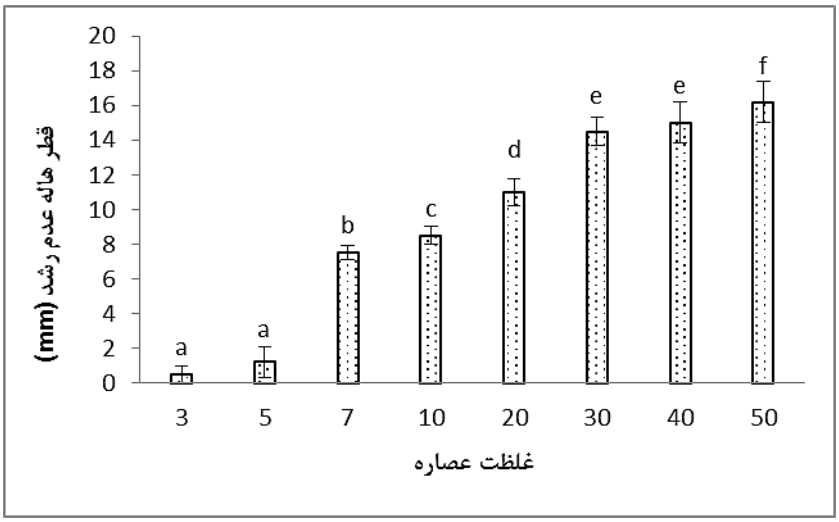
۵.۲. تعیین حداقل غلظت کشندگی مطلق (Minimum Bactericidal Concentration)

در ادامه به‌منظور 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 ۳۷°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 پلیت هایی 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).

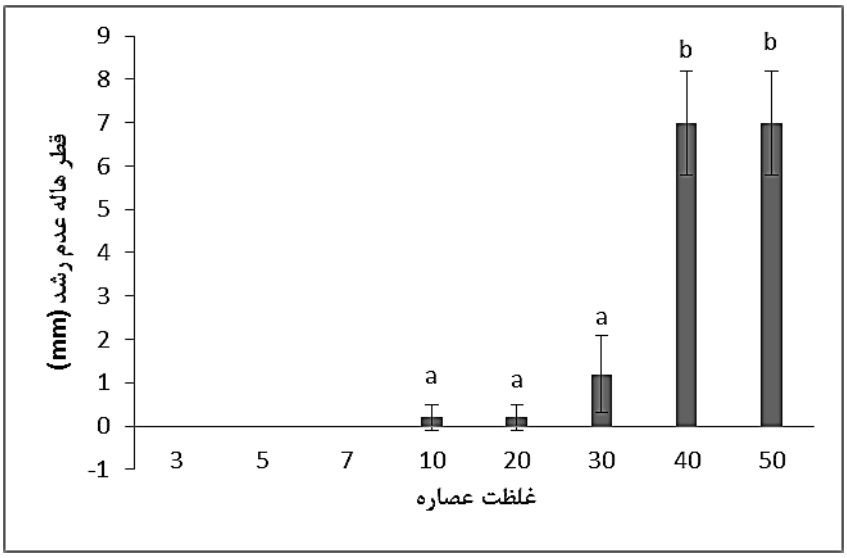
۳. نتایج

۱.۳. انتشار در آگار

تأثیر رقت‌های مورد مطالعه در جلوگیری از رشد باکتری اشرشیاکلی در روش چاهک‌گذاری با ایجاد هاله های عدم رشد مشاهده شد. نتایج نهایی حاصل از میانگین میزان هاله‌های عدم رشد (میلی‌متر) درنمودارهای 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 عصارهٔ استونی استخراج شده از اسفنج با قطر هاله ۱/۵±۱۶/۲ و کمترین میزان قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت



نمودار ۱ - مقایسه قطر هاله عدم رشد (انحراف معیار±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±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).

عصاره ۱۰ و ۲۰ و برای عصاره استونی استخراج شده از ستاره دریایی و با قطر هاله ۰/۲±۰/۳ بود. همانگونه که در نمودارها مشخص شده است، در اثرگذاری غلظت های متفاوت از عصارهٔ استخراج شده از اسفنج اختلاف معناداری ($P\leq$۰/۰۵) مشاهده شد. اما برای ستاره دریایی تا غلظت ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیچ‌گونه اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P\geq$۰/۰۵).

MIC .۲.۳

بر اساس نتایج جدول ۱، حداقل اثر مهارکنندگی از رشد باکتری عصاره استونی اسفنج دریایی برای باکتری اشرشیاکولای برابر ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و حداقل اثر مهارکنندگی از رشد برای عصاره استونی ستاره دریایی برابر ۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر بوده است. نتایج آزمایش‌ها نشان می دهد 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 بی مهره فاقد اثر مهارکننده رشد روی باکتری مورد بررسی بوده است.

MBC .۳.۳

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

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

اشرشیاکولی ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. عصارهٔ استونی ستارهٔ دریایی فاقد اثر کشندگی روی باکتری اشرشیاکولی بود.

۴. بحث و نتیجه گیری

بسیاری از مطالعات در حال حاضر در زمینهٔ بی مهرگان دریایی نشان‌دهنده پتانسیل درمانی بالای ترکیبات زیست فعال آن‌ها است. گونه‌های مختلف ستارهٔ دریایی دارای مواد دارویی مفید و ویژگی‌های بیولوژیکی متعددی هستند (Emadi, 1387). همچنین از سموم خارتنان در پزشکی و در درمان سرطان استفاده می‌شود. بسیاری از گونه‌های اسفنج‌ها 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 شقایق‌های دریایی فعالیت‌های آنتی‌بیوتیکی تا حد زیادی ناشناخته مانده است. دفاع آنتی‌بیوتیکی و فاگوسیتی سلول‌های آمیبوسیت استخراج شده از رشته‌های مزانتر در شقایق‌های دریایی در برخی از مقاله‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (Alves and Rosa, 2007). بررسی‌هایی که طی دوره‌های زمانی مختلف روی گونه‌های نرم‌تنان و خارتنان بنتوزی در جهان صورت گرفته و آزمایشاتی که انجام شده و نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر بیانگر تأثیر فوق‌العاده ترکیبات استخراج شده از این موجودات روی باکتری ها می‌باشد. تحقیقات نشان داده که متابولیت‌های ثانویهٔ اسفنج احتمالاً نقش مهمی در دفاع اسفنج علیه برخی خطرات زیستی دارند (Newbold *et al*., 1999). همچنین نشان داده شده است که تولید متابولیت‌های ثانویهٔ اسفنج در حفظ زیست محیطی آنها در برابر مهاجمان، شکارچیان و دیگر رقبا نقش تعیین کننده‌ای دارند (Devi *et al*., 2010).

Haug و همکاران (۲۰۰۲) آثار ضدباکتریایی سه گونه خارتن شامل توتیا، ستارهٔ دریایی و خیار دریایی به‌دست آمده از سواحل نروژ مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که عصاره‌های طبیعی مانند لیزوزیم‌های استخراج شده (تست لیزوزیمی) و سنجش بافت خونی از اندام‌های این سه گونه خارتن به خصوص عصاره‌های تهیه شده از دیواره بدن و مایع درون شکمی دارای اثر ضدباکتریایی بوده که البته از این میان بیشترین اثر مربوط به عصاره‌های به دست آمده از قسمت‌های معده- روده‌ای و تخم های ستاره دریایی و تخم‌های خیار دریایی بوده است (Haug *et al*., 2002). نتایج ضد باکتریایی عصارهٔ ستارهٔ دریایی به‌دست آمده در تحقیق حاضر با نتایج مطالعات فوق مشابه بود. محققین مطالعه‌ای 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

استونی از ستاره دریایی استخراج کردند قطر هاله عدم رشد به دست آمده بعد از گذشت ۱۲ ساعت ۰/۵۰ ±۱۴/۵ میلی متر و بعد از گذشت ۱۸ ساعت ۱۲/۵±۰/۸۷ و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به اندازه ۱۱/۹±۰/۶۹ میلی متر 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 عصارهٔ استونی استخراج شده از ستاره دریایی ۱/۲±۷ 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 گونهٔ *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 گونهٔ *S. mertensii* بود. طبق نتایج به‌دست آمده در این تحقیق بیشترین قطر هاله ایجاد شده برای باکتری سودوموناس آروژینوزا با قطر ۰/۸±۱۲/۰ میلی‌متر برای عصاره بوتانولی استخراج شده از شقایق گونه *Stichodactyla gigantean* بود و بیشترین قطر هاله برای قارچ آسپرژیلوس نیجر با قطر ۱/۲ ± ۱۰/۳ میلی متر 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 به‌طوری که در این تحقیق نتایج به دست آمده از عصاره‌های استونی و ان-هگزانی استخراج شده از شقایق موکتی نشان دهندهٔ عدم توانایی این عصاره‌ها در جلوگیری از رشد باکتری اشرشیاکلی می‌باشد که احتمالاً تناقض نتایج مربوط به تفاوت در گونه‌های شقایق و منطقهٔ جغرافیایی متفاوت در دو تحقیق می‌باشد. محققین همچنین مطالعات گسترده‌ای بر روی طیف گسترده‌ای از استرهای فنیل پلی‌برمی استخراج شده از اسفنج دریایی خانوادهٔ 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 هالهٔ عدم رشد مربوط به عصارهٔ استونی گونهٔ اسفنج با قطر ۱/۵±۱۶/۲ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد مربوط به عصارهٔ استونی ستارهٔ دریایی با قطر ۰/۲±۰/۳میلی‌متر بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که عصارهٔ استونی گونه‌های اسفنج و ستارهٔ دریایی هر دو حاوی ترکیبات زیست فعال با اثرات ضد باکتریایی هستند، اما میزان قدرت کشندگی باکتریایی عصارهٔ استونی اسفنج بسیار بیشتر از ستارهٔ 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., Alves, H.N., 2011. The faunal drugstore: animal-basedremedies used in traditional medicines in Latin America. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 10, 1746–4269.

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

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 ofantimicrobial 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., Pishevarzad, 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 spong 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 Mycologic 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 Immunol*ogy 10, 46-57.

Villanova, P.A., 2004. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobility. National Committee for Clinical laboratory standards (NCCLS). USA. 3rd ed. Approved standard M7-A6.