

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

آرش شکوری^{۱*}ام الیلا جوانمرد کامی قاضی محله^۲فریبرز سهیلی^۳

۱. استادیار گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی،

دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دریا،

دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی،

چابهار، ایران

۳. مربی گروه زیست شناسی 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: ۱۳۹۴۰۱۰۲۳۱

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی

ارشد است.

چکیده

خارپوستان گروهی از بی مهرگان دریایی بوده که منبع غنی ترکیبات ضد باکتری با مکانیسم فعالیت بالا هستند. این تحقیق به منظور بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره های مختلف استخراجی از توتیای دریایی (*Echinometra mathaei*) روی چندین سویه باکتری بیماری زای انسانی در سال ۱۳۹۲ در چابهار انجام گردید. پس از انجام نمونه برداری و انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، جانور تشریح و اندام های پوسته، خار و گناد آن جدا و پس از شستشو توسط دستگاه فریز درایر خشک و آسیاب شدند و توسط حلال های آب، اتیل استات، کلروفرم و متانول عصاره گیری انجام شد. اثرات ضد باکتریایی عصاره های به دست آمده روی باکتری های بیماری زای انسانی شامل *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* با استفاده از دو روش انتشار دیسک در آگار و رقت سازی لوله ای تست شد. تجزیه و تحلیل نتایج توسط آنالیز واریانس یک طرفه انجام پذیرفت و نتایج حاکی از آن بود که اثر ضد باکتریایی عصاره های متفاوت اندام های مختلف دارای اختلاف معنی داری هستند ($P < 0.05$). طبق نتایج به دست آمده 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 $14/33 \pm 1/5$ و $11/33 \pm 1/5$ میلی متر بیشترین اثر ضد باکتریایی را روی باکتری گرم منفی *E.coli* نشان دادند و میزان قطر هاله های مذکور بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک جنتامایسین با قطر هاله $10 \pm 0/2$ 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 مذکور بیشتر از قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک جنتامایسین با قطر هاله $10 \pm 0/2$ 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 به دست آمده مشخص شد که خار و پوسته گونه مورد مطالعه دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای بوده که نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه و خالص سازی ترکیبات مؤثره دارد. در مجموع، یافته های این تحقیق نشان داد این گونه توتیای دریایی یک منبع بالقوه ای برای ترکیبات ضد باکتریایی جدید با هدف جایگزینی داروهای شیمیایی می باشد.

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 پوشانده اند حکم فرما است. اقیانوس ها تقریباً نیمی از کل تنوع زیستی جهان را دارا می باشند (De Vries and Hall, 1994) و به عنوان 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 متابولیت های شیمیایی منحصر به فرد از محیط های دریایی استخراج شده اند که در واقع بخش کوچکی از تنوع

زیستی و شیمیایی اقیانوس ها را تشکیل می دهند (Ireland et al., 1993). امروزه در اثر تکامل مداوم میکروب های بیماری زا و مقاومت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک ها، تقاضا برای ایجاد ترکیبات جدید و مؤثر ضد میکروبی وجود دارد (De Vries and Hall, 1994). و ترکیبات به دست آمده از موجودات دریایی به دلیل داشتن اثر ضد میکروبی جداسازی و ایزوله شده اند (James, 2001). شاخه ی خارپوستان دارای ۷۰۰۰ گونه هستند که شامل رده های ستاره سانان (آستروئیده)، خارداران (اکینوئیده)، خیارسانان (هالوتروئیده)، مارسانان (اوفیوروئیده) و لاله و شان (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 به عنوان مهم ترین منبع تهیه داروها مورد توجه 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 می توان به عنوان یک منبع غنی با کاربردهای پزشکی، غذایی و دارویی استفاده نمود (Casas et al., 2011). موجودات دریایی کم تحرک و یا فاقد تحرک مثل خیارهای دریایی، توتیاهای دریایی و مرجان ها تحت تأثیر انواع مختلف میکروب ها قرار دارند. تحقیقات صورت گرفته نشان دهنده ی کاربردهای ضد سرطانی مولکول های خارپوستان و کنترل رشد باکتری ها به عنوان ماده ای با خاصیت جدید آنتی بیوتیکی است (Strahl et al., 2002) دفاع شیمیایی ضد باکتریایی به عنوان یک راهکار قابل اطمینان برای این موجودات مطرح می باشد (Wahl and Banaigs, 1991). پیشرفت های مولکولی اخیر ثابت نموده که برخی از میکروارگانیسم های همزیست با این بی مهرگان یا با تولید ترکیبات طبیعی خاصی یا فعالیت های متابولیکی به عنوان 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. متابولیت های ثانویه نقش کلیدی را در دفاع از میزبان در برابر عوامل بیماری زا، انگل ها، شکارچیان و رقیبان ایفا می کنند (et al., 2001; Harper). عملکردهای مختلف متابولیت های ثانویه باعث می شود که برخی از آن ها از نظر درمانی بر روی انسان ها مؤثر بوده و از نظر صنعت داروسازی مفید باشند (Briskin, 2000). مطالعات بسیاری در زمینه ی خواص ضد میکروبی اندام های مختلف خارپوستان در جهان صورت گرفته است، از جمله عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) به بررسی خواص ضد میکروبی اندام های مختلف توتیای دریایی *Echinometra mathaei* پرداختند. Shankarlal و همکاران (۲۰۱۱) اثر ضد باکتری و آنتی اکسیدانی 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 باکتری های گرم مثبت و باکتری های گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. هدف از مطالعه ی حاضر بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف استخراجی از اندام های توتیای دریایی *mathaei Echinometra* 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° ۲۱' ۳۰" N و ۶۰° ۳۶' ۳۰" 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 آن ها جدا و در ظرف های 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 ۲L GFD) با دمای ۴۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند، البته بافت گناد به دلیل رطوبت بالایی که دارد به مدت زمان بیشتری جهت خشک شدن نیاز دارد (Haug et al., 2002). اندام های خشک شده 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 آن ها توسط لیوفیلیزاتور تبخیر و عصاره های تهیه شده در تست های ضد باکتریایی محلولی از عصاره در حلال مربوطه بوده و غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از هر عصاره تهیه گردید (فاضلی، ۱۳۸۴؛ داداش بیگی، ۱۳۸۹; Girish and Satish., 2008). 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

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 تهیه شده بر باکتری های گرم مثبت شامل (*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) و (*Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) و باکتری های گرم منفی شامل (*Escherichia coli* (ATCC 35218) و (*Klebsiella pneumoniae* (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).

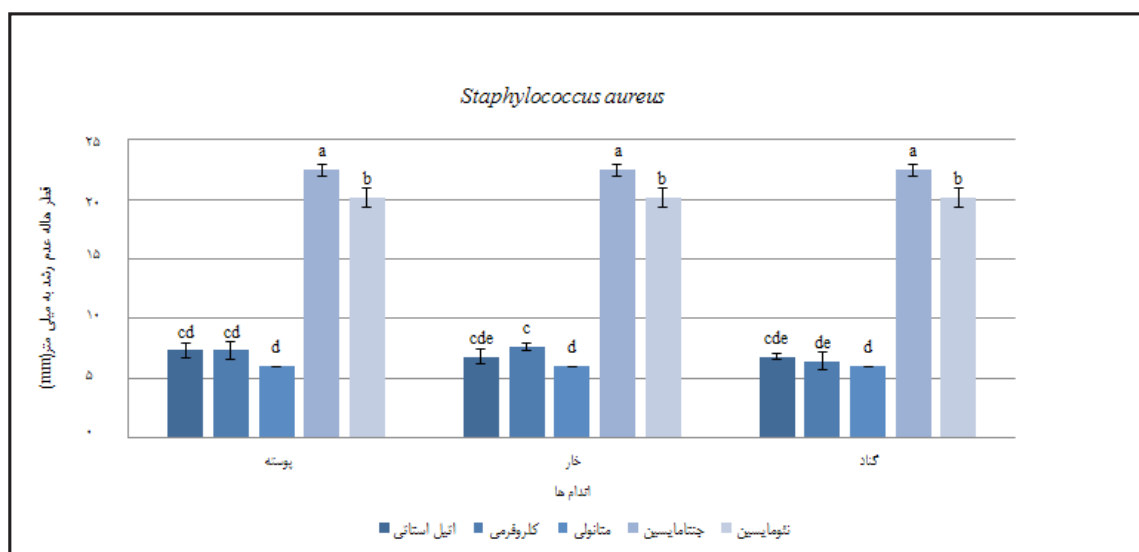
فعالیت ضد باکتریایی عصاره های تهیه شده با استفاده از روش انتشار دیسک آزمایش گردید. به این منظور از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد. ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت درون ظروف پتری ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور (شرکت تولید تجهیزات پزشکی بهداد) به صورت وارونه قرار داده شد. باکتری ها با غلظت ۰/۵ مک فارلند توسط سواپ پنبه استریل به صورت 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 بافاصله مناسب از دیواره و از یکدیگر قرار داده شدند. جهت مقایسه ی نتایج آزمون حساسیت باکتریایی از آنتی بیوتیک های جنتامایسین و نتومایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. عصاره ها توسط سمپلر ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر به میزان ۱۵ میکرولیتر از عصاره با غلظت ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر روی دیسک ها ریخته شد و سپس پلیت ها به صورت وارونه در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد انکوباتور به مدت ۱۸-۱۶ ساعت قرار داده شد. البته برای اتروکوکوس و استافیلوکوکوس زمان انکوباتور ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. پس از انکوبه 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 آزمایش ها 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 لوله ای مایع (Broth dilution test) استفاده گردید. بدین ترتیب که برای هر عصاره و باکتری مجزا از یک سری لوله های ۸ تایی استفاده گردید که ۵ لوله برای غلظت های مختلف هر عصاره و یک لوله به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت براث + باکتری) و یک لوله به عنوان کنترل منفی (براث) و یک لوله هم به عنوان کنترل کارایی آنتی بیوتیک (محیط کشت براث + باکتری + آنتی بیوتیک) 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 سی سی دور ریخته شد. از سه لوله ی دیگر به عنوان محیط های کشت شاهد و کنترل منفی استفاده شد. سپس به تمامی لوله ها به جز کنترل منفی، ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری نیم مکفارلند اضافه و توسط سمپلر خوب باکتری را در محیط کشت مخلوط کرده و لوله ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و آخرین لوله ای که هیچ کدورت رشدی در آن دیده نشد، به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی رشد در نظر گرفته می شود (Madhumathi et al., 2011). تمام لوله های فاقد کدورت رشد جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره های مورد نظر به روش پور پلیت کشت داده شد. بدین ترتیب که یک سی سی از محیط کشت فاقد رشد باکتری از لوله مورد نظر 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 هموزن 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، به عنوان حداقل غلظت کشندگی میکروارگانیسم ها در نظر گرفته شد (Madhumathi et al., 2011).

در این بررسی جهت رسم نمودار داده ها از نرم افزار Excell ۲۰۱۳ استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم افزار Spss ویرایش بیست و دوم انجام شد. بررسی اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف عصاره پوسته توتبای دریایی بر باکتری های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و مقایسه داده ها در سطح آلفای ۰/۰۵ بررسی شد. تمام آزمایش ها با سه بار تکرار انجام پذیرفت.

نتایج

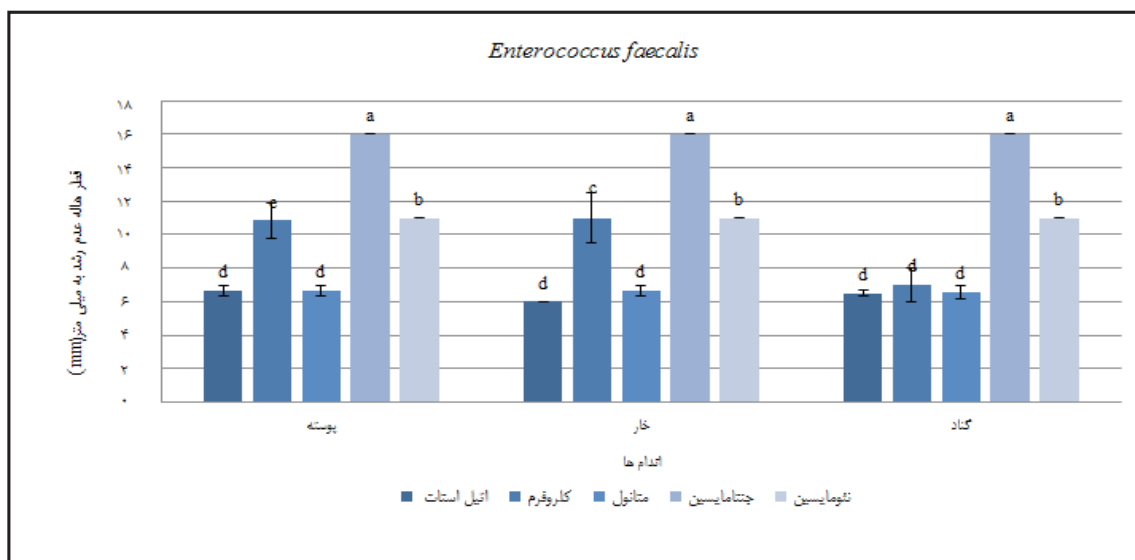
در بررسی حاضر اثر ضد باکتریایی عصاره های مختلف اندام های پوسته، خار و گناد توتیای دریایی گونه *E. mathaei* توسط آب و حلال های آلی اتیل استات، متانول و کلروفرم با استفاده از آزمون انتشار از دیسک، تست زده شد که نتایج این آزمون با احتساب تفاضل هاله حلال از هاله عصاره مربوطه به شرح زیر است: عصاره آبی هیچ یک از اندام ها اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند. در باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* عصاره های کلروفرمی خار و پوسته استخراج شده 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 هیچ گونه اثر ضد باکتریایی از خود نشان ندادند. عصاره های کلروفرمی و اتیل استاتی بر باکتری مورد مطالعه اثر ضد باکتری کمتری را نسبت به آنتی بیوتیک نئومایسین و جنتامایسین نشان دادند. اثر عصاره های مختلف اندام ها بر باکتری *S. aureus* دارای اختلاف معنی داری بوده است ($P > 0.05$) (شکل ۱).



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

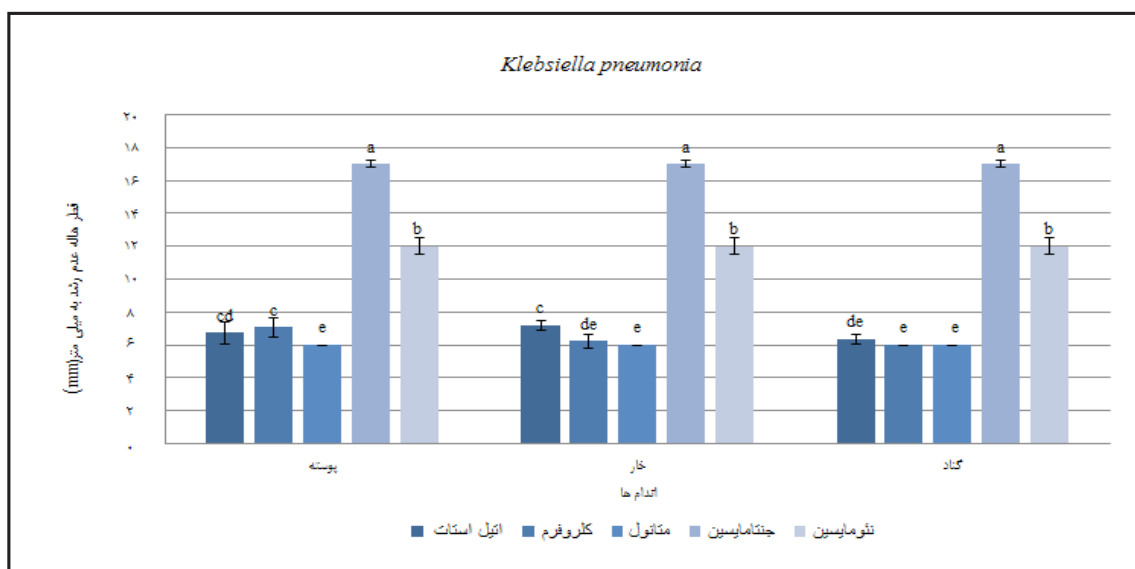
(آنتنک ها نشان دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

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 ذکر شده اثر ضد باکتری کمتری را نسبت به آنتی بیوتیک های جنتامایسین و نئومایسین داشتند. اثر عصاره های کلروفرمی، اتیل استاتی و متانولی اندام های مختلف روی باکتری *E. faecalis* دارای اختلاف معنی داری می باشند ($P > 0.05$) (شکل ۲).



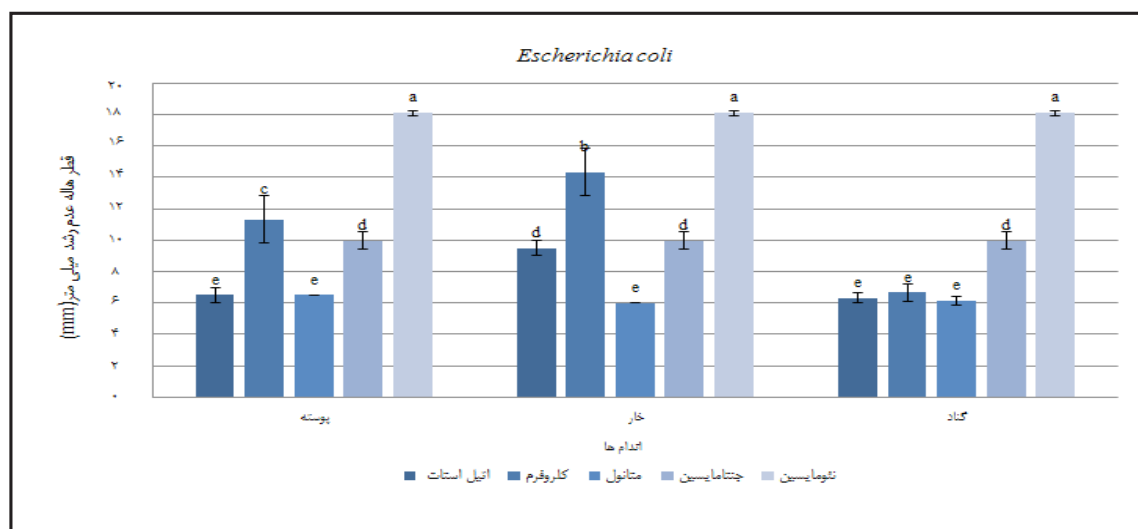
شکل ۲: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Enterococcus faecalis* (آنتنک ها نشان دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

در باکتری *Klebsiella pneumonia* بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره ی اتیل استاتی خار و سپس مربوط به عصاره ی کلروفرمی پوسته بود، درحالی که عصاره های متانولی هیچ اثر ضد باکتری را در این پژوهش از خود نشان ندادند و اثر ضد باکتری عصاره های مختلف کمتر از آنتی بیوتیک های جنتامایسین و تیموایسین بوده است. اثر ضد باکتری عصاره های مختلف اندام ها بر باکتری *K. pneumonia* دارای اختلاف معنی داری بودند ($P > 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳: اثر ضد باکتری عصاره های اتیل استات، کلروفرم و متانول استخراج شده از ۳ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* روی باکتری *Klebsiella pneumonia* (آنتنک ها نشان دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

در باکتری *Escherichia coli* بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره های کلروفومی خار و پوسته بوده که اثری بیشتر از آنتی بیوتیک 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 کلروفومی گناد می باشد. عصاره های متانولی نسبت به عصاره های کلروفومی و اتیل استاتی خاصیت ضد باکتری کمتری را در این تحقیق نشان دادند. عصاره اتیل استاتی خار با آنتی بیوتیک جنتامایسین فاقد اختلاف معنی بوده ($P > 0.05$)، اما نسبت به سایر عصاره ها و آنتی بیوتیک نئومایسین دارای اختلاف معنی داری بوده و همچنین بین اثر عصاره های مختلف بر باکتری *E. coli* اختلاف معنی داری وجود دارد ($P > 0.05$) (شکل ۴).
نتایج به دست آمده از حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره های کلروفومی و اتیل استاتی اندام های پوسته و خار گونه *E. mathaei* در دو غلظت ۰/۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر در جدول ۱ و ۲ بیان شده است.



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

(آنتنک ها نشان دهنده انحراف معیار هستند. حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است).

جدول ۱: حداقل غلظت مهار کنندگی 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)
<i>Escherichia coli</i>	–	۲/۵	۲/۵	۰/۵
<i>Staphylococcus aureus</i>	۲/۵	۰/۵	–	۲/۵
<i>E. faecalis</i>	–	۲/۵	–	۲/۵
<i>Klebsiella pneumonia</i>	–	۲/۵	۲/۵	۰/۵

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)
<i>Escherchia coli</i>	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	۲/۵	۲/۵	۰/۵
<i>E. faecalis</i>	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۰/۵
<i>Klebsiella pneumonia</i>	-	۲/۵	-	۲/۵

بررسی عصاره ایتیل استاتی پوسته در غلظت ۰/۵ میلی گرم/میلی متر نشان داد که هیچ کدام از لوله ها در این غلظت از عصاره، شفافیت نداشته به جز 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 ایتیل 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 *S. aureus* و *E. faecalis* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی بودند در حالی که 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 به جز *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 از جمله خارپوستان توسط پژوهشگران کشورهای مختلف به فراوانی انجام شده است (Ridzwan et al., 1995). در بررسی های انجام گرفته مشخص شده است که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله پوریفرا، بریوزوا، نرم تنان، مرجان ها و کرم های حلقوی آنلیدا دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی می باشند (Shakouri et al., 2004). در بررسی حاضر به بررسی خواص ضد باکتری عصاره های متفاوت اندام های مختلف توتیای دریایی *E. mataei* ساحل چابهار پرداخته شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اندام های مختلف خار، پوسته و گناد دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند و بین اثر ضد باکتری اندام های مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد ($P > 0.05$) (شکل ۱ تا ۴). این یافته ها تا حدودی مشابه نتایجی است که عبدالله اصلیان و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی خود به دست آوردند. آن ها خواص ضد میکروبی 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 ($P > 0.05$). همچنین 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 ($P > 0.05$). در مطالعه حاضر طبق نتایج به دست آمده از آزمون انتشار از دیسک در آگار و رقیق سازی محیط کشت مشخص گردید که اثر ضد باکتریایی عصاره های ایتیل استاتی، کلروفرمی و متانولی اندام های مختلف بر ضد باکتری های گرم مثبت و منفی دارای اختلاف معنی داری می باشند ($P > 0.05$) که این مطلب می تواند دلیلی بر تأثیر نوع حلال در خاصیت ضد

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 از نظر اثر ضد باکتریایی بر باکتری های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی داری می باشند ($P > 0.05$)؛ که عصاره اتیل استاتی و هگزانی پوسته توتیای دریایی *E. mathaei* اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای 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 در روند فعالیت ضد میکروبی تأثیرگذار می باشند با تغییر میزان غلظت های عصاره اثرات ضد میکروبی 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 به خصوص باکتری گرم منفی *E. coli* داشته است. بیشینه غلظت عصاره هیدرو الکلی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* اثری برابر با اثر آنتی بیوتیک صنعتی آمپی سیلین 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* جمع آوری شده از مناطق قشم و ابوموسی بر باکتری *E. coli* و باکتری *E. faecalis* بیشتر از آنتی بیوتیک صنعتی آمپی سیلین 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 آنتی بیوتیک جنتامایسین نشان داد. بعد از باکتری *E. coli* بیشترین اثر ضد باکتریایی مربوط به باکتری *E. faecalis* بود. مطالعات مختلف نشان داده شده که دیواره سلولی باکتری های گرم مثبت شامل یک لایه پپتیدوگلیکان است که ساختار ساده تری نسبت به باکتری های گرم منفی دارند و در نتیجه در مقابل بسیاری از آنتی بیوتیک ها و ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی حساسیت بیشتری دارند (Donnell and Russe, 1999)؛ اما برخلاف این موضوع عصاره های تهیه شده 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 به عنوان گونه های حساس تر شناخته می شوند و در بعضی دیگر خلاف این موضوع اثبات می شود، می تواند ناشی از ویژگی های فردی و سویه ای باکتری ها باشد. نوع حلال در خاصیت ضد باکتری عصاره تهیه شده نقش بسیار مهمی دارد، از آنجایی که حلال هگزان یک حلال غیر قطبی است و حلال اتیل استات نیز یک حلال نیمه قطبی می باشد، 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 می باشد. حتی عصاره ی به دست آمده توسط گروه تحقیقاتی فوق اثر ضد باکتری بهتری را نسبت به آنتی بیوتیک صنعتی آمپی سیلین نشان دادند. در نهایت مشخص شد که اندام پوسته توتیای مورد نظر دارای خاصیت ضد باکتری قابل ملاحظه ای می باشد. 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 خالص سازی و آنالیز شیمیایی هیچ فرضیه ای قابل اثبات نخواهد بود. طبق گفته ی Geissman (۱۹۶۳) اغلب ترکیبات شناخته شده با فعالیت ضد میکروبی، غیر قابل حل در آب اند. 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 استرول ها 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 استرول ها نقش مؤثری را در خاصیت ضد باکتریایی این گونه داشته باشند. فعالیت ضد باکتری تشخیص داده شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی در خارپوستان باشد. در مطالعات متعدد، اکثراً اثبات شده که ترکیبات ضد میکروبی یک نوع لیزوزیم هستند، اما در مطالعاتی که و Haug و همکاران (۲۰۰۲) انجام دادند نشان داد که حداقل برخی از این ترکیبات ضد میکروبی ترکیبات غیر پروتئینی هستند. جهت اثبات این که آیا فعالیت های مشاهده شده 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 باکتری های مورد مطالعه را مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که عصاره اتیل استاتی پوسته منطقه ابوموسی با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر بر باکتری های *Shigella flexneri* و *V. logei* اثر بازدارندگی به مراتب بهتری نسبت به بقیه عصاره ها بر

باکتری‌های مورد آزمایش داشتند. درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره کلروفرمی پوسته بر باکتری‌های مورد مطالعه مشخص شد که این عصاره بر باکتری *E. coli* در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر اثر بازدارندگی به مراتب بهتری نسبت به بقیه باکتری‌ها داشت و با افزایش غلظت به ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تمامی باکتری‌ها حداقل غلظت مهارکنندگی را نشان دادند. عصاره کلروفرمی خار نیز در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر روی باکتری‌های *E. faecalis* و *S. aureus* اثر بازدارندگی نشان داد. در عصاره اتیل استاتی پوسته در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تنها باکتری‌های *S. aureus* دارای اثر بازدارندگی بوده و در این غلظت در عصاره اتیل استاتی خار نیز تنها باکتری‌های *E. coli* و *K. pneumoniae* دارای حداقل غلظت مهارکنندگی است.

حداقل غلظت کشندگی (MBC) در عصاره‌های مختلف متفاوت است. در عصاره کلروفرمی پوسته و خار در غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تنها باکتری *E. coli* دارای حداقل غلظت کشندگی بوده و در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی باکتری *E. faecalis* در عصاره کلروفرمی 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 میلی گرم بر میلی لیتر هیچ اثر کشندگی در هیچ یک از باکتری‌ها مشاهده نشد، اما در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر 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. به طور کلی عصاره‌های کلروفرمی در غلظت پایین ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر روی باکتری‌های مورد مطالعه حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی به مراتب بهتری نسبت به سایر عصاره‌ها نشان دادند که این یافته مغایر با نتایج مطالعات اصلی‌ان بوده که در مطالعه‌ی ایشان عصاره اتیل استاتی پوسته با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر اثر بازدارندگی بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها داشت.

به طور کلی در مطالعه‌ی حاضر و سایر تحقیقات صورت گرفته در زمینه‌ی خاصیت ضد میکروبی خارپوستان مشخص گردید که خارپوستان خصوصاً خارهای دریایی و توتیاهای دریایی دارای ترکیبات منحصر به فردی در اندام‌های خود هستند. در واقع اندام‌های غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی جدیدند که نیاز به مطالعه و بررسی بیشتر و خالص سازی آن مواد مؤثر دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله 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 ضد میکروبی عصاره‌ی فیتوپلانکتون *Chlorella vulgaris* و بوم داینوفلاژله *Noctiluca miliaris* بومی دریای عمان علیه چند سویه ارگانیزم 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 ضد میکروبی 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 اشیریشیا 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 Invertebrate pathology, Pathol. 106: 343-345.

- De Vries, D. J. and Hall, M. R., 1994.** Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Development Research*. 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, New York, 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 seas around Indian. *Naga, The ICLARM Quarterly*, 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 Ethnopharmacology*, 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 of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology*, 26(7): 1539-43.
- Reich, M. L., 2006.** Cambrian 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 activity. *Curr Microbiol*, 44:450-459.
- Uma, B. and Parvathavarthini, R., 2014.** Antibacterial Activity of Hydroalcohol 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 *Polysynchraton 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.