اثرات ضدباکتریایی بخش‌های مختلف توتیای‌دریایی خلیج‌فارس

سیما راهی[۱]، بهروز حیدری*[۱،۲]، مهدی رسا[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۱۴۴

۲- گروه علوم‌دریایی، پژوهشکده حوضه آبی دریای خزر، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۱۴۴

تاریخ دریافت: ۱۸ اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: ۲۹ مرداد ۱۳۹۶

چکیده

در مطالعه‌ی حاضر، اثرات ضدباکتریایی اجزای مختلف (گنادها، پوسته، خارها و بخش‌دهانی) توتیای‌دریایی *Echinometra mathaei* حاضر در خلیج‌فارس مورد بررسی قرار گرفته‌است. بدلیل ویژگی‌های بیماری‌زایی و میزان شیوع که باکتری‌های گرم‌منفی مانند *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و باکتری‌های گرم‌مثبت نظیر *Staphylococcus aureus* و *Basillus subtilis* دارند، از این میکروارگانیسم‌ها جهت سنجش تاثیرات باکتری کشی این عصاره‌ها، استفاده شده‌است. توتیای‌دریایی از سواحل خلیج‌فارس جمع‌آوری و پس از کالبدشکافی، از اندام‌های مختلف آن‌ها توسط سه حلال سدیم‌بافرفسفات، اتانول و استونیتریل عصاره‌گیری به عمل آمد. فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ها، با استفاده از روش انتشارچاهکی، در دو غلظت µg/well ۱۵۰۰ و ۶۰۰، مورد ارزیابی قرارگرفت. فعالیت ضدباکتریایی در عصاره‌های پوسته و گناد مشاهده شد. عصاره‌ی بخش‌دهانی و خار در همه‌ی تست‌ها فاقد فعالیت ضدباکتریایی بود. این ارزیابی‌ها نشان داد که عصاره‌های استونیتریلی و اتانولی گناد دارای فعالیت باکتری‌کشی در مقابل سویه *E. coli* می‌باشند. در مورد سویه *B. subtilis*، عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافرفسفاتی گناد و همچنین عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی پوسته فعالیت ضدباکتریایی نشان دادند. همچنین عصاره‌های استونیتریلی و اتانولی گناد فعالیت باکتری‌کشی در مقابل سویه *P. aeruginosa* داشتند. در مورد سویه *S. aureus* نیز عصاره‌های استونیتریلی و اتانولی گناد فعالیت ضدباکتریایی نشان‌دادند. با توجه به نتایج، پیشنهاد می‌گردد که بخش پوسته و گناد توتیای دریایی جهت استخراج و تخلیص ترکیبات تاثیر بیش‌تری دارد.

کلمات کلیدی: توتیای‌دریایی، خلیج‌فارس، باکتری، عصاره.

* عهده‌دار مکاتبات (✉). bheidari@guilan.ac.ir

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

مقدمه

در پنج دهه‌ی اخیر، فرآورده‌های طبیعی دریایی توجه زیست شناسان و شیمیدانان را به خود جلب کرده‌است. موجودات دریایی نه تنها ترکیبات دارویی سودمندی را مهیا می‌کنند، بلکه مواد توکسیک نیز تولید می‌کنند (McCarthy and Pomponi, 2004). در سال‌های اخیر ترکیبات بیواکتیو بسیاری، از جانوران دریایی متنوعی استخراج شده‌است و جستجو برای یافتن متابولیت‌های جدید از این موجودات منجر به جداسازی حدود ۱۰۰۰۰ متابولیت شده‌است که بسیاری از آن‌ها در زمینه‌های داروسازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Mokhlesi *et al*., 2012). این ترکیبات فعالیت‌هایی از جمله فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضد قارچی، ضدسرطانی، ضدویروسی، ضدانگلی، ضد التهابی، آنتی‌اکسیدانی و چندین فعالیت دارویی دیگر از خود نشان داده‌اند که برای انسان سودمند است (Briskin, 2000). ترکیبات یا متابولیت‌های بیواکتیو از گروه‌های مختلفی از جانوران دریایی از جمله مرجان‌ها (Jensen, *et al*., 1996)، خرچنگ‌ها (Chattopadhyay and Chatterjee, 1993)، تونیکات‌ها (Findlay and Smith, 1995)، خارپوستان (Bryan *et al*., 1992)، ماهی‌ها (Cole *et al*., 1997) و اسفنج‌ها (Fusetani, 1996) جداسازی شده‌اند. متابولیت‌های جداشده از جانوران دریایی می‌توانند به استروئیدها، ترپنوئیدها، ایزوپرنوئیدها، غیر ایزوپرنوئیدها، کینون‌ها، ترکیبات برم‌دار، نیتروژن هتروسیکلیک‌ها و نیتروژن‌سولفور هتروسیکلیک‌ها تقسیم شوند (Bhakuni and Rawat, 2005). اساس کشف دارو از دریا از این حقیقت ناشی می‌شود که ارگانیسم‌های دریایی مکانیسم‌های بیوشیمیایی وفیزیولوژیکی پیچیده‌ای برای تولید ترکیبات فعال-زیستی دارند تا برای فعالیت‌هایی مانند تولیدمثل، ارتباط و محافظت در برابر شکارچی، عفونت و رقابت در گستره‌ی تنازع بقا مهیا باشد (یوسف‌پور، ۹۱). جمعیت میکروبی در آب دریا و رسوبات می‌تواند به ترتیب بالاتر از 10^6 و 10^9 در هر میلی‌لیتر باشد (Austin, 1988). بنابراین بی‌مهرگان دریایی به طور مداوم در معرض غلظت بالایی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها هستند که بسیاری از آن‌ها ممکن است پاتوژن یا بیماری‌زا باشند (Haug *et al*., 2002; Casas *et al*., 2011).

از سلسله‌ی جانوران، شاخه‌ی Echinodermata شاخه‌ی بزرگی با تقریبا ۷۰۰۰ گونه‌ی زنده است که به رده‌های Crinoidea (سوسن‌های دریایی)، Ophiuroidea (ستاره‌های شکننده)، Asteroidea (ستاره‌سانان)، Echinoidea (خارسانان) و Holothuroidea (خیارسانان) تقسیم‌بندی می شوند (Li *et al*., 2010). خارسانان (Echinoidea) در تمامی دریاها، از نواحی بین جزر و مدی تا اقیانوس‌های عمیق، گستردگی زیادی دارند (Hickman, 2006). خارپوستان موجودات بسترزی هستند که دائماً در معرض مقادیر نسبتاً بالایی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها هستند که تعداد زیادی از آنها ممکن است برای جاندار زیان‌آور باشد. بقای این موجودات به مکانیسم‌های آنتی‌میکروبیال مناسب بستگی دارد تا بتوانند خود را دربرابر عفونت‌ها و صدمات محافظت کنند. انواعی از فاکتورها یا عوامل ضدمیکروبی از خارپوستان جدا شده‌اند (Haug *et al*., 2002).

اخیرا این موضوع مطرح شده که توتیاهای‌دریایی منابعی غنی از ترکیبات بیواکتیو هستند. Haug و

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

همکاران (۲۰۰۲) فعالیت آنتی‌باکتریال عصاره‌های بدست آمده از پوسته‌ی توتیای‌دریایی سبز با نام علمی *Strongylocentrotus droebachiensis* را گزارش کردند. همچنین در مطالعه‌ای که اخیرا توسط Abubakar و همکاران (۲۰۱۲) صورت گرفته است، عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های مختلف (گنادها، بخش دهانی، روده، خارها و پوسته) یک نوع توتیای دریایی به نام *Tripneustes gratilla* اثرات ضدباکتریایی مختلفی را در مقابل طیفی از باکتری‌های مثبت و منفی نشان دادند. در این تحقیق مشخص شد که عصاره‌ی مربوط به گنادها و روده، دارای بیش‌ترین فعالیت آنتی‌باکتریال است. همچنین با توجه به گزارش Shamsuddin و همکاران (۲۰۱۰)، مشخص شد که عصاره‌های مختلف تهیه شده از بافت‌های داخلی و لایه‌ی خارجی بدن سه گونه از توتیاهای‌دریایی، اثرات متفاوتی برروی چند گونه‌ی مختلف باکتریایی دارند؛ به طوریکه میزان فعالیت آنها در مقابل باکتری‌ها متفاوت بوده و برخی از عصاره‌ها تنها قادر به مهار تعدادی از باکتری‌ها بودند. Shankarlal و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که عصاره‌ی تهیه شده از پوسته‌ی توتیای‌دریایی بنفش (*Salmacis virgulata*) دارای فعالیت ضد میکروبی است.

در این پژوهش سعی شده‌است تا از باکتری‌هایی استفاده گردد که منشاء عفونت‌های باکتریایی انسان می‌باشد. برخی باکتری‌های گرم‌منفی مانند *Escherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و برخی از باکتری‌های گرم‌مثبت مانند *Staphylococcus aureus* و *Bacillus subtilis* دارای ویژگی‌های خاصی درعفونت‌های باکتریایی هستند و در بیش‌تر نمونه‌های کلینیکی ارجاع شده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی جداسازی می‌گردند. اخیرا ظهور تعداد فزآینده‌ی باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها جستجو برای عوامل ضدمیکروبی طبیعی را تحریک می‌کند (Abubakar *et al*., 2012).

از آنجایی که خلیج‌فارس غنی از ذخایر موجودات دریایی است و این موجودات دارای ترکیبات بیواکتیو جهت مبارزه با عوامل میکروبی می‌باشد که می‌توان از این توانایی بالقوه جهت تهیه‌ی داروهای بیولوژیکی استفاده نمود با توجه به فراوانی و دردسترس بودن ارگانیسم‌های دریایی می‌توان ازآن‌ها استفاده خوراکی و بالینی کرد. بسیاری از عوامل میکروبی نسبت با آنتی‌بیوتیک‌های حاضر مقاوم شده‌اند و با توجه به اینکه منابع دریایی غنی از آنتی‌بیوتیک‌های جدید و فراوان‌اند می‌توان راه جدیدی برای مبارزه باعوامل بیماری‌زا یافت کرد.

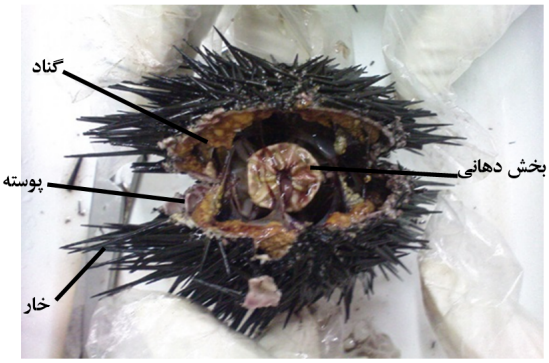
مواد و روش ها

نمونه‌برداری و آماده‌سازی

خارپوست انتخابی برای انجام این مطالعه، یک گونه توتیای‌دریایی از رده‌ی Echinoidea بود. نمونه‌برداری در دو مرحله در دو نوبت تیرماه سال ۱۳۹۲ از سواحل جزیره‌ی کیش و فروردین سال ۱۳۹۳از سواحل جزیره‌ی قشم از عمق یکسان جمع‌آوری شدند. تعداد نمونه‌ها برای گونه‌ی خارپوست دوازده عدد بود و پس از جمع‌آوری از سطح دریا، بیومتری (اندازه‌گیری وزن، قطر جانور با خار و بدون خار و وزن بخش‌های مختلف بدن) کالبدشکافی شد و پس از فریز شدن با نیتروژن مایع در داخل فلاسک‌های حاوی یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی بیولوژی دریا دانشکده علوم‌پایه دانشگاه گیلان منتقل

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

گردیدند. اندام‌های انتخابی خار، تست، بخش‌دهانی و گنادها بودند (شکل ۱) که پس از جداسازی همه‌ی خارها از سطح تست، تشریح، وزن و قرارگیری در نیتروژن مایع، تا زمان انجام مراحل عصاره‌گیری، در دمای ^{oC} ۷۰- قرارگرفتند. جهت شناسایی گونه از تست و خارهای روی سطح آن با استفاده از کلید شناسایی منطقه‌ای (Price, 1983) صورت پذیرفت.



شکل ۱: بخش‌های مختلف توتیای‌دریایی *E. mathaei* که در مطالعه‌ی حاضر استفاده شد

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری از اندام‌های مختلف خارپوست مورد آزمایش با استفاده از حلال‌های آبی و آلی صورت گرفت. بدین صورت که جهت استخراج ترکیبات غیرپروتئینی اعم از قطبی و غیرقطبی، از حلالهای اتانول ۹۰٪ و استونیتریل ۸۰٪ (Acetonitril; Merck, Germany) به‌کار برده‌شد. برای تهیه‌ی عصاره‌ی خام شامل ترکیبات پروتئینی، حلال آبی مورد استفاده بافر-فسفات‌سدیم (PBS) بود. به منظور کاهش خطا و افزایش دقت در روند کار، عصاره‌گیری از هر کدام از اندام‌های جاندار سه بار تکرار شد.

عصاره بافرفسفاتی

جهت تهیه عصاره بافرفسفاتی از بافرفسفات‌سدیم ($NaH_2PO_4.2H_2O$, 0.1M; NaOH, 0.2M) ۰/۱M استفاده شد. هرکدام از اندام‌های مورد آزمایش پس از آماده‌سازی، با استفاده از ازت مایع به صورت پودر در آمدند. در ادامه، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سونیکاتور (Misonix 3000, USA) به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۲۱ وات سونیکیت شدند و طی آن دومین مرحله‌ی لیز سلولی و یکسان‌سازی محلول صورت گرفت. پس از آن هر یک از محلول‌های آماده شده، توسط دستگاه انکوباتور شیکردار (Infros, RFI-150) و بر روی یخ با دور rpm ۹۰ شیک شدند. سپس به منظور جداسازی بافت از محلول رویی، عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه میکروسانترفیوژ (Centurion Scientific; England) با دمای ^{oC} ۴ و دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از جدا کردن محلول رویی از رسوبات بافتی، آن را در داخل پلیت‌های شیشه‌ای استریل و از قبل وزن شده ریخته و جهت نگهداری طولانی مدت، به دستگاه freeze-dryer (Vacuubrand, Germany) انتقال داده شدند. سپس به صورت پودری کاملا خشک در آمدند.

عصاره اتانولی

قسمت دیگری از بافت‌های پودر شده جهت تهیه‌ی عصاره‌ی اتانولی مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام این کار از اتانول (C_2H_5OH) ۹۰٪ استفاده شد و با نسبت ۱:۵ به بافت‌های پودر شده اضافه شد. پس از انجام سونیکیشن با همان شرایط قبلی، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و با دور rpm ۹۰ در دستگاه انکوباتور شیکردار در دمای ^{oC} ۴۰ شیک شدند. جداسازی عصاره از رسوبات بافتی توسط دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{oC} ۴ و با دور rpm ۴۰۰۰

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

صورت گرفت. محلول رویی در پلیت‌های شیشه‌ای استریل و از قبل وزن شده ریخته‌شدند و جهت لیوفیلیزه کردن در دستگاه freeze-dryer تحت شرایط ذکر شده در بخش قبل، آماده شدند. سپس پلیت‌های حاوی عصاره‌های خشک وزن شدند و تا زمان انجام تست‌های باکتریایی در دمای ^{oC} ۲۰- نگهداری شدند.

عصاره استونیتریلی

برای تهیه‌ی این نوع عصاره از استونیتریل (C2H3N) ٪۸۰ استفاده شد و با همان نسبت ۱:۵ به بافت‌های پودر شده اضافه‌شد. مراحل عصاره‌گیری با استفاده از این حلال آلی همانند عصاره‌ی اتانولی و تحت شرایط مشابه صورت گرفت.

باکتری‌ها

چهار باکتری مورد استفاده برای انجام تست‌های میکروبی باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* هستند که محیط کشت مناسب برای رشد همه‌ی این باکتری‌ها، محیط کشت nutrient agar (Merk; Germani) است. سویه‌های باکتری *B. subtilis PTCC (1254)* و *E. coli PTCC (1395)* و *P. aeruginosa PTCC (1310)* و *S. aureus PTCC (1189)* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC) به صورت لیوفیلیزه تهیه و برای کشت به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه گیلان انتقال داده‌شد.

اثردهی عصاره‌ها

هرکدام از عصاره‌های بافرفسفاتی، اتانولی و استونیتریلی، با استفاده از ترازوی دیجیتال (GR-200; AND)، به مقادیر ۱۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم وزن شدند. حلال‌های مورد استفاده برای انجام تست‌های آنتی باکتریال، عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی، دی‌متیل سولفکساید (DMSO) (Merck; Germany) و عصاره های بافرفسفاتی، آب‌مقطر دیونیزه بودند که هرکدام از عصاره‌های مذکور با مقادیر گفته شده، در ۴۰ µL حلال مربوطه، حل شدند. روش انتشار چاهکی به عنوان روش میکروبی در این ارزیابی به کار برده شد. تمامی کارهای انجام‌شده بر روی عصاره‌های بافرفسفاتی تا زمان اضافه شدن به محیط‌های کشت، جهت حفظ دما، روی یخ صورت گرفت. از بین سه تکرار عصاره‌های مربوط به هر جزء جاندار، عصاره‌ای که بهتر جواب داده بود دو بار دیگر مورد آزمایش قرار گرفت و داده‌های بدست آمده به صورت میانگین محاسبه گردید. در مجموع تست آنتی‌میکروبیالی مربوط به هرکدام از اجزای توتیای‌دریایی برای هر عصاره (در دو غلظت)، ۱۸ بار تکرار گردید.

کنترل

تست‌های آنتی‌بیوگرام به عنوان کنترل مثبت و استاندارد اثرگذاری بر روی باکتری‌ها انجام گرفت. بدین منظور از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین (µg/disc ۳۰)، کلرامفنیکل (µg/disc ۳۰)، آموکسی کلاو (µg/disc ۲۰/۱۰) و نالیدیکسیک اسید (µg/disc ۳۰) استفاده شد. هر تست آنتی‌بیوگرام ۳ بار تکرار گردید و نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار محاسبه گردید. دو حلال DMSO و d.dH2O به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفتند تا از عدم ایجاد اختلال در آزمایش توسط آن‌ها اطمینان حاصل شود.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

آنالیز آماری

در این پژوهش برای تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS version 17 و Microsoft Office Excel 2010 استفاده شد. پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف_اسمیرونف، از آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف بین عصاره‌های مختلف در توتیای دریایی استفاده شد و در صورت معنادار بودن، پس‌آزمون Duncan جهت تعیین اختلاف بین گروه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

مقایسه‌ی مشاهدات انجام شده با کلید شناسایی(Price, ۱۹۸۳) نشان داد که نمونه‌های توتیای دریایی مورد نظر *Echinometra mathaei* de Blainville 1825 می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از تست‌های باکتریایی عصاره‌های تهیه شده از اجزای مختلف بدن *E. mathaei* در مقابل *B. subtilis* و *E. coli* و *S. aureus* و *P. aeruginosa* متفاوت بوده‌است.

Escherichia coli

باتوجه به جدول ۱ همه‌ی عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافرفسفاتی مربوط به پوسته، خار و بخش‌دهانی فاقد فعالیت آنتی‌باکتریال در مقابل سویه‌ی *E. coli* هستند. عصاره‌ی استونیتریلی و اتانولی گناد دارای فعالیت آنتی‌باکتریال و عصاره‌ی بافر فسفاتی گناد فاقد این فعالیت در مقابل سویه‌ی مذکور می‌باشند. با توجه به تست‌های آماری انجام شده، فعالیت آنتی‌باکتریال عصاره‌ی اتانولی گناد در غلظت (µg/well)۱۵۰۰ بطور معناداری بیش‌تر از میزان این نوع فعالیت در عصاره‌های استونیتریلی در دو غلظت(µg/well)۶۰۰ و ۱۵۰۰ می‌باشد (P<۰/۰۵) (شکل ۱). بیش‌ترین هاله‌ی مهاری به قطر (mm) ۱۴.۶۷±۰.۵۸ مربوط به عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well)۱۵۰۰ و کم‌ترین آنها مربوط به عصاره‌های استونیتریلی در دو غلظت (µg/well)۶۰۰ و ۱۵۰۰ می‌باشد (شکل ۱). همچنین مطابق نتایج بدست‌آمده، این باکتری نسبت به همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، حساسیت نشان‌داد که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت است (جدول ۲). نتایج آماری نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال می‌باشد (P<۰/۰۵). تست‌های کنترل $d.d.H_2O$ و DMSO نیز بر روی این میکروارگانیسم، منفی بوده و این باکتری هیچگونه حساسیتی نسبت به حلال‌های مورد استفاده نشان‌نداد.

Bacillus subtilis

باتوجه به جدول ۱ همه‌ی عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافرفسفاتی بخش‌دهانی و خار فاقد فعالیت آنتی‌باکتریال در مقابل سویه‌ی *B. Subtilis* هستند. عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافر فسفاتی گناد و همچنین عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی پوسته دارای فعالیت آنتی‌باکتریالی و عصاره‌ی بافر فسفاتی پوسته فاقد فعالیت آنتی‌باکتریال در مقابل سویه‌ی مذکور می‌باشند. با توجه به تست‌های آماری انجام شده، عصاره‌های مختلف در هر دو غلظت (µg/well)۶۰۰ و ۱۵۰۰ روی سویه‌ی *B. subtilis* اختلاف معنا داری را نشان ندادند (P≥۰/۰۵) (شکل۲). بیش‌ترین هاله‌ی مهاری به قطر(mm) ۸/۳۳±۰/۵۸ مربوط به عصاره‌ی اتانولی پوسته و استونیتریلی گناد در

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

غلظت (µg/well)۱۵۰۰ و استونیتریلی پوسته در غلظت (µg/well)۶۰۰ و کم‌ترین فعالیت آنتی‌باکتریال مربوط به عصاره‌ی استونیتریلی گناد و اتانولی پوسته به ترتیب در غلظت‌های ۶۰۰ و ۱۵۰۰(µg/well) می‌باشد (شکل ۲). همچنین مطابق نتایج، این باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسیسیلین کلاولانیک اسید مقاومت نشان داد ونسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، حساسیت داشت که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت است (جدول ۲). نتایج آماری نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال می باشد (P<۰/۰۵). تست‌های کنترل $d.d.H_2O$ و DMSO نیز بر روی این میکروارگانیسم، منفی بوده و این باکتری هیچگونه حساسیتی نسبت به حلال‌های مورد استفاده نشان‌نداد.

Pseudomonas aeruginosa

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود همه‌ی عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافرفسفاتی پوسته، خار و بخش‌دهانی فاقد فعالیت آنتی‌باکتریال در مقابل سویه‌ی *P. aeruginosa* هستند و عصاره‌ی استونیتریلی و اتانولی گناد دارای فعالیت آنتی‌باکتریال و عصاره‌ی بافر فسفاتی گناد فاقد این نوع فعالیت در مقابل سویه‌ی مذکور می‌باشند.

با توجه به تست‌های آماری، بیش‌ترین هاله‌ی مهاری در مقابل *P. aeruginosa* با قطر (mm) ۱۲.۰۰±۱.۰۰ مربوط به عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well)۱۵۰۰ بوده و فعالیت آنتی‌باکتریال عصاره‌ی مذکور با عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well)۶۰۰ و استونیتریلی گناد (µg/well)۱۵۰۰ تفاوت معنی‌داری ندارد (P≥۰/۰۵) (شکل ۳). همچنین مطابق مشاهدات انجام شده، باکتری مورد آزمایش، نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسیسیلین کلاولانیک اسید مقاومت نشان‌داده و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، حساسیت داشت که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت است (جدول۲). نتایج آماری نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال می‌باشد (P<۰/۰۵). تست‌های کنترل $d.d.H_2O$ و DMSO نیز بر روی این میکروارگانیسم، منفی بوده و این باکتری هیچگونه حساسیتی نسبت به حلال‌های مورد استفاده نشان نداد.

Staphylococcus aureus

مطابق جدول ۱، همه‌ی عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافرفسفاتی پوسته، خار و بخش‌دهانی فاقد فعالیت آنتی‌باکتریالی در مقابل سویه‌ی *S. aureus* هستند و عصاره‌ی استونیتریلی و اتانولی گناد دارای اثر آنتی‌باکتریال در مقابل این باکتری بوده و عصاره‌ی بافر فسفاتی گناد فاقد چنین فعالیتی در مقابل سویه‌ی مذکور می‌باشند. با توجه به تست‌های آماری، بیش‌ترین اثر آنتی‌باکتریالی در مقابل *S. aureus* مربوط به عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well۱۵۰۰)، با هاله‌ی مهاری به قطر (mm) ۱.۰۰±۱۰.۰۰ می‌باشد، همچنین فعالیت آنتی‌باکتریالی این عصاره در مقابل سویه‌ی مذکور با عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well۶۰۰) دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) و با عصاره‌ی استونیتریلی گناد (µg/well۱۵۰۰) فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشد، عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well۶۰۰) نیز فاقد اختلاف معنی‌دار با عصاره‌ی اتانولی گناد (µg/well۶۰۰) از لحاظ فعالیت آنتی‌باکتریالی است (P≥۰/۰۵) (شکل ۴). همچنین مطابق این نتایج این باکتری نسبت به همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، حساسیت نشان‌داد که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت است

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

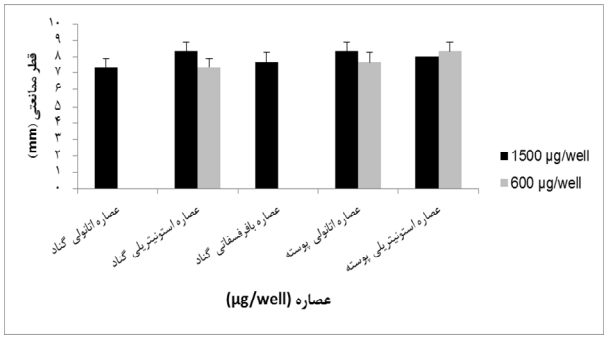
(جدول ۲). نتایج آماری نشان دهنده‌ی وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال می‌باشد ($P<۰/۰۵$). تست‌های کنترل $d.d.H_2O$ و DMSO نیز بر روی این میکروارگانیسم، منفی بوده و این باکتری هیچگونه حساسیتی نسبت به حلال‌های مورد استفاده نشان‌نداد.

جدول ۱: نتایج حاصل از تاثیر عصاره‌های مختلف توتیای‌دریایی بر سویه‌های مختلف باکتری

سویه‌های باکتری									
		E. coli		*B. subtilis*		*P. aeruginosa*		*S. aureus*	
بافت	عصاره µg/well	۱۵۰۰	۶۰۰	۱۵۰۰	۶۰۰	۱۵۰۰	۶۰۰	۱۵۰۰	۶۰۰
گناد	استونیتریل	۷/۰±۰۰/۰۰	۷/۰±۰۰/۰۰	۸/۰±۳۳/۵۴	۷/۰±۳۳/۵۷	۱۱/۰±۶۷/۵۶	—	۹/۱±۰۰/۰۰	—
	اتانول	۱۴/۰±۶۷/۵۸	—	۷/۰±۳۳/۵۸	—	۱۱/۱±۰۰/۰۰	۱۰/۰±۰۰/۰۰	۱۰/۱±۰۰/۰۰	۸/۰±۰۰/۰۰
	بافرفسفات	—	—	۷/۰±۶۷/۵۵	—	—	—	—	—
پوسته	استونیتریل	—	—	۸/۰±۰۰/۰۰	۸/۰±۳۳/۵۸	—	—	—	—
	اتانول	—	—	۸/۰±۳۳/۵۲	۷/۰±۷۶/۵۳	—	—	—	—
	بافرفسفات	—	—	—	—	—	—	—	—
خار	استونیتریل	—	—	—	—	—	—	—	—
	اتانول	—	—	—	—	—	—	—	—
	بافرفسفات	—	—	—	—	—	—	—	—
بخش دهانی	استونیتریل	—	—	—	—	—	—	—	—
	اتانول	—	—	—	—	—	—	—	—
	بافرفسفات	—	—	—	—	—	—	—	—



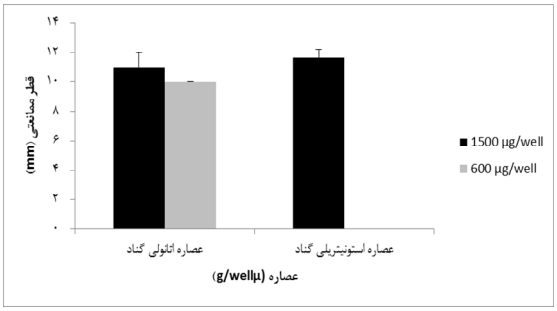
شکل ۱: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بافت‌های مختلف *E. mathaei* در مقابل *E. coli*.



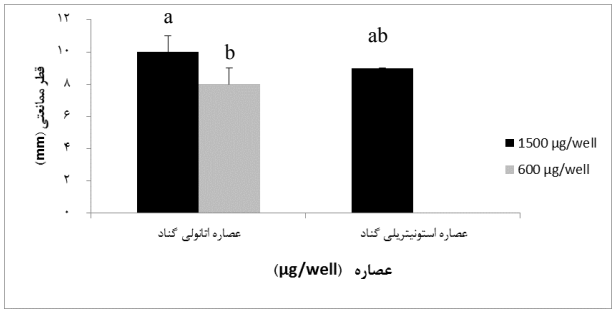
شکل ۲: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بافت-های مختلف *E. mathaei* در مقابل *B. subtilis*

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]



شکل ۳: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بافت‌های مختلف *E. mathaei* در مقابل *P. aeruginosa*



شکل ۴: فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های بافت‌های مختلف *E. mathaei* در مقابل *S. aureus*

جدول ۲: قطر ممانعتی (mm) آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل چهار سویه باکتری

آنتی‌بیوتیک	*E. coli* ۳۰µg/disc	*B. subtilis* ۳۰µg/disc	*P. aeruginosa* ۳۰µg/disc	*S. aureus* ۳۰µg/disc
آموکسی کلاو	۱۵/۰±۶۷/۵۲	—	—	۸/۰±۶۷/۵۴
کلورومفنیکل	۳۶/۰±۳۳/۵۸	۸/۰±۳۳/۵۸	۲۲/۰±۳۳/۴۸	۱۲/۰±۰۰/۰۰
نالیدیکسیک اسید	۲۸/۰±۳۳/۵۵	۱۵/۰±۰۰/۰۰	۱۶/۰±۶۷/۴۹	۱۲/۰±۳۳/۵۸
تتراساکلین	۲۸/۰±۶۷/۳۸	۲۰/۰±۶۷/۲۵	۲۴/۰±۰۰/۶۸	۲۴/۰±۶۷/۴۱

بحث

جانوران و گیاهان دریایی و ترکیبات زیستی آنها منبع وسیع و دردسترسی هستند که در جستجو برای یافتن ترکیباتی با فعالیت ضدمیکروبی می‌توانند نقشی موثر داشته‌باشند. مطالعه بر روی اثرات ضدمیکروبی موجودات دریایی از جمله خارپوستان در سال‌های اخیر و در کشورهای مختلف به فراوانی انجام شده‌است (Dabbagh *et al*., 2011). کشف شده است که خارپوستان دارای اثرات ضدباکتریایی قوی‌تری نسبت به پوریفرا، بریوزوا، نرم‌تنان و کرم‌های حلقوی دارند (Ridzwan *et al*., 1995). فعالیت ضدباکتریایی قبلا در بعضی از گونه‌های خارپوستان توصیف شده‌بود (Haug *et al*., 2002; Kiani *et al*., 2014; Ridzwan *et al*., 1995; Kazemi *et al*., 2016). Haug و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت ضدباکتری در بخش‌های مختلف توتیای‌دریایی سبز *Strongylocentrotus droebachiensis*، ستاره‌دریایی معمولی *Asteria srubens* و خیاردریایی *Cucumaria frondosa* علیه باکتری‌های گرم‌مثبت و منفی را بررسی‌کردند. این مطالعه نشان‌دهنده فعالیت‌های ضدباکتری عصاره‌ها در بخش‌های مختلف *A. rubens* و *C. frondosa* بود. Rinehart و همکاران (۱۹۸۳) ۸۳ گونه از خارپوستان سواحل غربی در Baja California را مورد مطالعه قراردادند و دریافتند که ۴۳ درصد آن‌ها فعالیت ضدمیکروبی داشتند. همچنین کاظمی و همکاران (۲۰۱۶) فعالیت ضدباکتریایی توتیای‌دریایی

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

Echinometra mathaei را برروی سویه‌های باکتری استرپتوکوکوس مطالعه کردند و دریافتند که عصاره‌های آلی اتانولی و استونیتریلی گناد و پوسته توتیای‌دریایی اثرات ضدباکتریایی داشتند در حالیکه عصاره‌های ناشی از خار و قطعات‌دهانی توتیا فعالیتی نداشتند. وجود پپتیدهای ضدباکتریایی در بی‌مهرگانی نظیر خارپوستان که فاقد سیستم‌ایمنی اکتسابی هستند به اثبات رسیده‌است. آنها نه‌تنها باکتری‌ها و قارچ‌ها را در شرایط آزمایشگاهی و محیط طبیعی غیرفعال می‌کنند، بلکه از ارگانیسم‌های میزبان علیه بسیاری از عفونت‌ها محافظت می‌کنند و همچنین باعث تنظیم ایمنی می‌شوند. در خلیج شمالی مکزیک، ۸۰٪ از ۲۲ گونه‌ی خارپوستان فعالیت آنتی‌میکروبیال نشان‌دادند (Baryan *et al* .,1994) در مطالعه‌ای که توسط Abubakar و همکارانش در سال ۲۰۱۲ صورت‌گرفت، مشخص شد که فعالیت ضدمیکروبی توتیای‌دریایی *Tripneustes gratilla* در عصاره‌های گناد و لوله‌ی گوارش، متمرکز شده و فعالیت کم یا عدم فعالیت در عصاره‌های خار و دهان مشاهده‌شد. مطالعه‌ی حاضر وجود فاکتورهای ضدباکتریایی را در چندین بافت دیگر نیز از جمله گنادها و پوسته و خار توتیای‌دریایی نیز به اثبات رسانده‌است.

در این مطالعه سعی شده تا با بکارگیری حلال‌های آلی و آبی، ترکیبات پروتئینی و غیرپروتئینی جاندار طی روند عصاره‌گیری استخراج شود و اثرات آن‌ها بررسی گردد، از آنجایی‌که فعالیت ضدمیکروبی در اجزای مختلف خارپوست مورد نظر و در عصاره‌های آلی و آبی مشخص شده است، لذا هم فاکتورهای پروتئینی و هم‌غیرپروتئینی می‌توانند مسئول چنین فعالیتی باشند. علاوه بر این، با توجه به حضور فاکتور دما در روند عصاره‌گیری، تا حد زیادی حضور برخی ترکیبات موثر در هرکدام از عصاره‌ها بیش‌تر است. در عصاره‌های فعال بافرفسفاتی به دلیل ثابت نگهداشتن دما در ^{o}C ۴ و شرایط بافری، احتمال حضور ترکیبات پروتئینی فعال بیش‌تر است. اما درعصاره‌های آلی بدلیل بالا بردن دما تا ^{o}C۴۰، احتمال حضور ترکیبات پروتئینی فعال و حساس به دما کاهش می‌یابد. بنابراین انتظار می‌رود در این عصاره‌ها، ترکیبات فعال پروتئینی مقاوم به دما و یا ترکیبات غیرپروتئینی بیش‌تر حضور داشته باشند. این نتایج نشان می‌دهد که خارپوستان دارای مولکول‌های دفاعی متنوعی در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند.

در توتیای‌دریایی *E. mathaei*، عصاره‌های مربوط به بخش‌دهانی و خار هیچگونه فعالیت ضدباکتری از خود نشان‌ندادند، اما بخش‌های گناد و پوسته اثر مهاری بر رشد سویه‌های باکتریایی این تحقیق داشته‌اند. بنظرمی‌رسد که بخش‌دهانی و خار بیش‌تر نقش مکانیکی داشته و در ترشح متابولیت‌های فعال شیمیایی دخالت ندارند. در مجموع در مورد چهار سویه‌ی باکتری، گناد نسبت به پوسته فعالیت بیش‌تری نشان داد و عصاره‌های آلی حاصل از آن در برابر هر چهار سویه‌ی باکتری‌های مورد نظر اثر مهاری داشت، اما عصاره‌های بافرفسفاتی هر دو اندام (به استثناء بافر فسفاتی گناد که در برابر رشد *B. subtilis* اثر مهاری نشان‌داد) فاقد هرگونه فعالیت ضدباکتری بر چهار باکتری مذکور بودند که این می‌تواند نشان از نبودن و یا کم بودن ترکیبات فعال ضدباکتریایی با ماهیت پروتئینی و حساس به دما در این بافت‌ها باشد و نقش ضدپاتوژنی بیش‌تر به عهده‌ی ترکیبات فعال غیرپروتئینی می‌باشد.

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

در سال ۲۰۱۲ بر روی اندام‌های مختلف توتیای دریایی *T. gratilla* از جمله گنادها، پوسته، خارها، بخش‌دهانی و بخش گوارشی انجام شد، نتایج مشابهی با آزمایش کنونی داشته‌است و طی آن فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی گناد مشاهده‌شد (Abubakar *et al.*, 2012). دلیل بالا بودن فعالیت ضدمیکروبی گناد می‌تواند به نقش انتقال فاکتورهای ایمنی آن به نسل بعد یعنی تخم برگردد. بنظر می‌رسد پوسته، اولین سددفاعی شیمیایی بدن علیه پاتوژن‌ها در توتیای‌دریایی خلیج‌فارس باشد، لذا نقش ضدباکتری و ضدقارچی آن با توجه به نداشتن سیستم ایمنی اکتسابی در این جاندار دور از ذهن نمی‌باشد.

باتوجه به نتایج بدست‌آمده، برخی از اجزای توتیای‌دریایی مورد مطالعه دارای فعالیت ضدباکتریایی در مقابل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مورد آزمایش هستند. اگرچه میزان قدرت مهاری بین عصاره‌های استخراج شده و آنتی‌بیوتیک‌های بکاررفته در این تحقیق تفاوت بسیار زیادی وجوددارد، با این حال به دلیل وجود انواع مختلف ترکیبات فعال در هرکدام از عصاره‌ها و خالص نبودن یک نوع ترکیب، نمی‌توان به طور قطع برتری آن‌ها را نسبت به ترکیبات طبیعی مورد تأیید قرارداد. در مقایسه‌ی بین دو غلظت بکار رفته در تست‌های آنتی‌میکروبیال، به‌طور کلی در اغلب مواقع تفاوت معناداری در دو غلظت استفاده‌شده در آزمایش مشاهده نمی‌شود.

در مجموع، مطالعه‌ی حاضر اشاره بر این دارد که خارپوستان دریایی و از جمله‌ی آنها توتیای‌دریایی، می‌توانند منابعی غنی برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید باشند اما ترکیباتی می‌توانند برای استفاده‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرند که اثرات جانبی آنها در مقایسه با دیگر داروها و آنتی‌بیوتیک‌ها حداقلی باشند. همچنین با توجه به اثر بخشی نسبتاً خوب عصاره‌های حاصل از پوسته و گناد، تخلیص ترکیبات این دو اندام در مطالعات بعدی در ارجحیت قراردارد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که مارا در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. یوسف پور م، ۱۳۹۱. فرآورده های فعال نرم تنان خلیج فارس. خلاصه مقالات دومین همایش ملی دوسالانه طب پیشگیری بهداشت، امداد و درمان دریایی بر روی شناورهای سطحی و زیر سطحی، ص ۴۲.

2. Abubakar, L., Mwangi, C., Uku, J., Ndirangu, S., 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics, 1(1), 19-23.
3. Austin, B., 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press, New York, P. 229.
4. Bhakuni D.S., Rawat D.S., 2005. Bioactive marine natural products. Springer. New York and Anamaya Publishers, New Delhi, USA, 382.
5. Bryan, P.J., McClintock, J.B., Watts, S.A., Marion, K.R., Hopkins, T.S., (1994). Antimicrobial activity of ethanolic body-wall extracts of echinoderms from the northern Gulf of Mexico. Echinoderms Through Time, Rotterdam, Netherlands, 17-23.
6. Briskin, D.P., 2000. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. Plant Physiology, 124(2), 507-514.
7. Casas, S.M., Comesaña, P., Cao, A., Villalba, A., 2011. Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). Journal of Invertebrate

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]

Kadkhodazadeh, M., Heidari, B. 2014. Antibacterial activity of the body wall extracts of sea cucumber (Invertebrata; Echinodermata) on infectious oral streptococci. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology 25,367–373.
18. Li, C., Haug, T., Stensvag, K., 2010. Antimicrobial peptides in Echinoderms. Invertebrate Survival Journal, 7, 132-140.
19. McCarthy, P.J., Pomponi, S.A. 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. Marine Biomedical Research, 22, 1-2.
20. Mokhlesi, A., Saeidnia, S., Gohari, A.R., Shahverdi, A.R., Nasrolahi, A., Farahan, F., Khoshnood, R., Eshaghi, N., 2012. Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Asian Journal of Animal & Veterinary Advances, 7(3), 243-249.
21. Price, A.R.G., 1983. Echinoderms of Saudi Arabia. Echinoderms of the gulf coast of Saudi Arabia. Fauna of Saudi Arabia, 5, 28–108.
22. Ridzwan, B.H, Kaswandi, M.A., Azman, Y., Fuad, M., 1995. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. General Pharmacology, 26, 1539–1543.
23. Rinehart, K.L, Shaw, P.D., Shield, L.S., Gloer, J.B., Harbour, G.C., Koker, M.E.S., 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial, and antineoplastic agents. Pure and Applied Chemistry, 53, 795–817.
24. Shamsuddin, A.A., Kumari, M.D., Noraznawati, I., 2010. Anti-bacterial activity of three species of sea urchin extracts from Pulau Bidong, Terengganu. Journal of Sustainability Science and Management, 5(1), 116-124.
25. Shankarlal, S., Prabu, K., Natarajan, E., 2011. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Purple Sea Urchin Shell (*Salmacis virgulata* L. Agassiz and Desor 1846. American-Eurasian Journal of Scientific Research, 6(3), 178-181.

Pathology, 106, 343-345.
8. Chattopadhyay, T., Chatterjee, B.P., 1993. A low molecular weight lectin from the edible crab *Scylla serrata* hemolymph: purification and partial characterization. Biochemistry Archive, 9, 65–72.
9. Cole, A.M., Weis, P., Diamond, G., 1997. Isolation and characterization of pleurocidin: An antimicrobial peptide in the skin secretion of winter flounder. The Journal of Biological Chemistry, 272(18), 12008–12013.
10. Dabbagh, A.R., Sedaghat, M.R., Ramesh, H., Kamrani, E., 2011. Breeding and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (*Holothuria vegabunda* Selenka) from the northern Persian Gulf, Iran. *SPC* Beche-de-mer Information Bulletin, 31, 35–38.
11. Findlay, C., Smith, V.J., 1995. Antimicrobial factor in solitary ascidians. Fish and Shellfish Immunology, 5(8), 645–658.
12. Fusetani, N., 1996. Bioactive substance from marine sponges. Journal of Toxicology Toxin Reviews, 15, 157–170.
13. Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M., Stensvag, K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology, 81(2), 94-102.
14. Hickman, C.P., 2006. Integrated Principles of Zoology. McGraw-Hill, Boston, USA.
15. Jensen, P.R., Harvell, C.D., Wirtz, K., Finical, W., 1996. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. Marine Biology, 125, 411–419.
16. Kazemi, S., Heidari, B., Rassa, M., 2016. Antibacterial and hemolytic effects of aqueous and organic extracts from different tissues of sea urchin *Echinometra mathaei* on pathogenic streptococci. International Aquatic Research, 8, 299-308.
17. Kiani, N., Heidari, B., Rassa, M.,

[Downloaded from aqudev.lahijan.iau.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1396.11.3.7.8]