

Investigation of antibacterial effect sea urchin shell species *Echinometra mathaei* Chabahar Beach

A. Shakouri^{1*},

O. Javanmard Kamy Ghazy Mahalleh²

1. Assistant Professor, Departments of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences Chabahar Maritime and Marine Science University

2. Graduate Student, Departments of Marine Biology, Faculty of Marine Sciences Chabahar Maritime and Marine Science University

(Received: Jan. 23, 2015 - Accepted: Jun. 9, 2015)

بررسی اثر ضدباکتریایی پوسته توتیای دریایی گونه *Echinometra mathaei* ساحل چابهار

آرش شکوری^{۱*}، ام ایلا جوانمرد کامی قاضی محله^۲

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی

دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۳ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۱۹)

Abstract

Echinoderms, ancient group of marine invertebrates, are a rich source of antibacterial compounds with high activity mechanism. In the present study, the antibacterial effect of sea urchin skin, *Echinometra mathaei*, was examined in different doses on some pathogenic bacterial strains. After sampling and transport of samples to the laboratory, animals were dissected, and the shucks separated after grinding it and, potentially bioactive metabolites were extracted using chloroform. The extracts were tested for activity against *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* with varying concentration ranged from 1.25 to 11.25 mg/ml. The tests were performed by disk diffusion method. The results showed that the antibacterial effect of different concentrations of extracts on types of bacteria are significantly different ($p < 0/05$). The greatest antibacterial effect on Gram-positive bacteria such as enterococci and staphylococci in concentrations 1/25-5/25 and the most remarkable effect of 6/25-8/25 concentrations was recorded on Gram-negative bacteria such as *Klebsiella* and *E. coli*. The findings suggest that these compounds of sea urchin could serve as a potential source of new antibacterial substances to replace chemical agents even at low concentrations against Gram-positive bacteria. Furthermore, this investigation Proposes that marine echinoderms could be potential sources of novel antimicrobial.

Keywords: Antibacterial effects, Sea urchin, *Echinometra mathaei*, Varying concentration, disk diffusion.

چکیده

خارپوستان گروهی قدیمی از بی‌مهرگان دریایی بوده که منبع غنی ترکیبات ضدباکتری با مکانیسم فعالیت بالا هستند. هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر ضدباکتریایی پوسته توتیای دریایی گونه *Echinometra mathaei* در دوزهای مختلف، روی چند سویه باکتری بیماری‌زای انسانی است. پس از انجام نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جانور تشریح و پوسته آن جدا و پس از شستشو و آسیاب شدن، توسط حلال کلروفرم عصاره‌گیری صورت گرفت و غلظت‌های مختلف ۱/۲۵-۱۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و جهت تعیین فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها، روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Enterococcus faecalis*، *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumonia* از تست انتشار از دیسک استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره تهیه شده در باکتری‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($p < 0/05$). بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره روی باکتری‌های گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس، در غلظت‌های ۱/۲۵-۵/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده و در غلظت‌های ۶/۲۵-۸/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر ضدباکتریایی را باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی نشان دادند. در مجموع، یافته‌های این تحقیق نشان داد که پوسته این گونه توتیای دریایی یک منبع بالقوه‌ای برای ترکیبات ضدباکتریایی جدید با هدف جایگزینی داروهای شیمیایی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: خواص ضدباکتریایی، توتیای دریایی، *Echinometra mathaei*، غلظت‌های مختلف، انتشار از دیسک.

مقدمه

اقلانوس‌ها ۷۱ درصد از سطح زمین را پوشانده و به عنوان منشأ ترکیبات طبیعی محسوب می‌گردند که این ترکیبات در موجودات مختلف انباشته شده و از آنها می‌توان به عنوان یک منبع بالقوه جهت ترکیبات زیست فعال با کاربردهای دارویی، پزشکی و غذایی استفاده نمود (Jha & ZR, 2004; Yasoda *et al.*, 2006). در طی سه تا چهار دهه گذشته تلاش‌های بسیاری جهت کشف ترکیبات زیست فعال از منابع دریایی انجام گرفته است. تعداد زیادی از این ترکیبات طبیعی در صنعت داروسازی نقش بسزایی دارند و به همین دلیل باعث افزایش تقاضا در صنایع داروسازی و غذایی شده‌اند (Venugopal, 2009). با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در علم پزشکی، بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها هنوز هم این عوامل بیماری‌زا به عنوان یک تهدید اساسی برای سلامت عمومی محسوب می‌شوند (De Vrites & Hall, 1994). تولید داروها از منابع دریایی مبحثی است که بستر بسیار مناسبی را در علم داروسازی به جهت بهره برداری از آنها فراهم آورده است. لذا در سال‌های اخیر این موضوع مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است. برخی از این داروها مثل داروی ضد ویروسی وایدراپین و یا ترکیبات ضد تومور سینتارابین اکتیناسیدین ۷۴۳ و اریبولین در مقیاس تجاری تولید گردیده و روانه بازار مصرف شده‌اند (WHO, 1998). رونق استفاده از داروهای مقاوم در مقابل پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی، ضرورت تحقیق در زمینه تولید داروهای ضد میکروبی جدید را از منابع طبیعی، از جمله منابع دریایی بیش از پیش نمایان می‌کند (Blunt *et al.*, 2007). دو مکانیسم اساسی مسئول پیدایش و گسترش سویه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که شامل جهش و انتقال ژن‌های مقاوم هستند (Nourozy *et al.*, 2004).

خارپوستان گروهی قدیمی از بی‌مهرگان دریایی بوده که منبع غنی ترکیبات ضد باکتری با مکانیسم

فعالیت بالا هستند. این جانوران هم در مناطق بین جزر و مدی و هم در قسمت‌های عمیق دریاها زیست می‌کنند. حدود ۷۰۰۰ گونه از این شاخه جانوری موجود است. شاخه نامبرده شامل رده‌های ستاره‌سانان (آستروئیده)، خارداران (اکینوئیده)، خیارسانان (هالوتروئیده)، مارسانان (اوفیوروئیده) و لاله‌وشان (سیرینوئیده) می‌باشد (Schillaci & Arizza, 2013). خارپوستان برای اولین بار توسط مردم بومی آسیا شناسایی و بررسی اثرات طبی نیز توسط آنان انجام گرفت (Reich, 2006). از آنجائی که بسیاری از گونه‌های خارپوستان در نزدیکی سواحل یا مصب‌ها زندگی می‌کنند به صورت انبوهی با ارگانسیم‌های عفونی مانند: ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها روبرو هستند، بنابراین بقای این موجودات دریایی وابسته به پاسخ‌های ضد میکروبی سیستم ایمنی خواهد بود که برای حفاظت از خود و هم‌نوازی بدن انجام می‌دهند (Schillaci & Arizza, 2013).

در طی دهه گذشته تحقیقات در مورد سخت پوستان، نرم‌تنان و خارپوستان به ویژه متابولیت‌های ثانویه‌ی آنها با خواص ضد میکروبی افزایش یافته است (Casas *et al.*, 2011; Haug *et al.*, 2002). متابولیت‌های ثانویه نقش کلیدی را در دفاع از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، انگل‌ها، شکارچیان و رقیبان ایفا می‌کنند (Harper *et al.*, 2001). ترکیبات شیمیایی زیست فعال را می‌توان به متابولیت‌های اولیه و ثانویه طبقه بندی کرد و این امر بستگی به اساس بیوسنتز آنها دارد. عملکردهای مختلف متابولیت‌های ثانویه باعث می‌شود که برخی از آنها از نظر درمانی بر روی انسان‌ها مؤثر بوده و از نظر صنعت داروسازی مفید باشند (Briskin, 2000).

کشف پپتیدهای ضد میکروبی^۱ طبیعی، سلاح جدیدی برای مبارزه با میکرواورگانسیم‌ها می‌باشد. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که پپتیدهای غیر کاتیونی و

1. Antimicrobial peptides

حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره کلروفومی پوسته توتیای دریایی *Echinometra mathaei* و مقایسه اثرات دوزهای مختلف این عصاره با روش انتشار دیسک در آگار روی چند سویه باکتری بیماری‌زای انسانی است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های زنده توتیا از پلاژ ساحلی تیس در چابهار با موقعیت جغرافیایی $N=25^{\circ} 21' 42''$ و $E=60^{\circ} 36' 30''$ جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه درون ظرفی که حاوی آب دریای هوادهی شده بود انتقال یافت. سپس نمونه‌های زنده روی یخ تشریح شده و اندام پوسته مورد نظر با دقت جدا گردید و در ظرف‌های استریل قرار داده شد و با آب مقطر جهت از بین رفتن نمک آب دریا شستشو داده شد و برای خشک شدن و از بین رفتن رطوبت در دستگاه فریز درایر با دمای -40° درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند (Haug et al., 2002). پوسته‌های خشک شده آسیاب و به نسبت ۱:۲ (حلال/بافت) در حلال کلروفورم غوطه‌ور گردیدند.

عصاره‌گیری

زمانی که حلال کلروفورم به پوسته اضافه گردید به مدت ۲۴ ساعت ظرف حاوی عصاره در جای تاریک روی شیکر قرار داده شد و سپس مایع رویی از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و ۱۱ غلظت مختلف بین ۱/۲۵ تا ۱۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه گردید و به روش انتشار از دیسک^۱ عصاره کلروفومی پوسته در غلظت‌های موردنظر بررسی شد. جهت اینکه اثر ضدباکتری حلال در نظر گرفته نشود در این آزمایش از نمونه شاهد حلال استفاده گردید.

کاتیونی مختلفی در بسیاری از گونه‌های مهره داران و بی‌مهرگان دریایی وجود دارد که باعث بهبود پاسخ ایمنی این جانداران در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Lai Gallo, 2009; Ovchinnikov, 2006; Rinkevich, 2000). توتیاهای دریایی دارای پوسته‌ای سخت از جنس کربنات کلسیم هستند که این صفحات کربنات کلسیمی تحت پوشش درم نازک و اپیدرم می‌باشد. درم و اپیدرم غنی از رنگدانه بوده و دارای درصد کمی بافت زنده می‌باشد که حاوی مقدار قابل توجهی ترکیبات پلی فنولی است (Natalya, 2011). پوسته توتیاهای دریایی دارای رنگدانه‌های نافتوکینون پلی هیدروکسیلات با خواص ضد میکروبی، ضد جلبکی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Zhou et al., 2011). این رنگدانه‌ها علاوه بر داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، توانایی جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی را دارند که این ویژگی خاص می‌تواند نقش بسزایی در صنایع غذایی داشته باشد در واقع باعث افزایش عمر مفید ماده غذایی شده و از تخریب لیپیدهای موجود در ماده غذایی جلوگیری می‌کند. در صورت فراوان بودن منبع این رنگدانه و بهینه بودن روش استخراج آن ممکن است در آینده ترکیبات موجود در پوسته توتیاهای دریایی به رقابت با سایر منابع طبیعی آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌های طبیعی در صنعت داروسازی و غذایی بپردازد (Lebedev et al., 2008). مطالعات بسیاری در زمینه خواص ضد میکروبی اندام‌های مختلف خارپوستان در جهان صورت گرفته است از جمله Asleian et al. (2014) به بررسی خواص ضد میکروبی اندام‌های مختلف توتیای دریایی *Echinometra mathaei* پرداختند. Shankarlal et al. (2011) اثر ضد باکتری و آنتی‌اکسیدانی پوسته توتیای دریایی گونه *Salmacis virgulata* را مورد بررسی قرار دادند. همچنین Uma et al. (2014) خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی توتیای دریایی *Temnopleurus Alexandri* را بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی مورد بررسی قرار دادند. هدف از پژوهش

میکروارگانسیم‌ها و محیط کشت

اثرات ضدباکتریایی غلظت‌های تهیه شده از عصاره بر باکتری‌های پاتوژن انسانی از قبیل: باکتری‌های گرم مثبت *Enterococcus faecalis* و *Staphylococcus aureus* و باکتری‌های گرم منفی *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی بندرعباس مطالعه شد. این باکتری‌ها ابتدا در محیط کشت نوترینت برات کشت شدند و جهت کشت میکروارگانسیم‌ها در پلیت از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد (Abubakar et al., 2012).

بررسی اثرات باکتریایی

فعالیت ضدباکتریایی عصاره تهیه شده با استفاده از روش انتشار دیسک آزمایش گردید. برای انجام آزمون انتشار از دیسک از محیط کشت مولر هینتون آگار استفاده شد به میزان ۲۰ میلی‌لیتر درون ظروف پتری ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور به صورت وارونه قرار داده شدند. باکتری‌ها 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 دیسک‌های استریل توسط پنس استریل شده (با استفاده از الکل و شعله) روی پلیت‌ها با فاصله مناسب از دیواره و از یکدیگر قرار داده شدند جهت مقایسه نتایج آزمون حساسیت باکتریایی از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. عصاره‌ها توسط سمپلر ۱۰۰-۱۰ μl به میزان ۱۵ μl روی دیسک‌ها ریخته شد و سپس پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوباتور به مدت ۱۸-۱۶ ساعت قرار داده شد. البته برای انتروکوکوس و استافیلوکوکوس زمان انکوباتور ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد. پس از انکوبه‌گذاری ناحیه‌های مهار رشد توسط کولیس ورنیه با دقت اندازه‌گیری شدند (Jahan et al.,

(2013; Abubakar et al., 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش جهت رسم نمودار داده‌ها از نرم‌افزار Excell 2013 از بسته نرم‌افزاری آفیس استفاده گردید و تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Spss 22 انجام شد. بررسی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره پوسته توتیای دریایی بر باکتری‌های مختلف توسط آنالیز واریانس یک طرفه^۱ و مقایسه داده‌ها در سطح آلفای ۰/۰۵ بررسی شد. تمام آزمایشات با سه بار تکرار انجام گرفت.

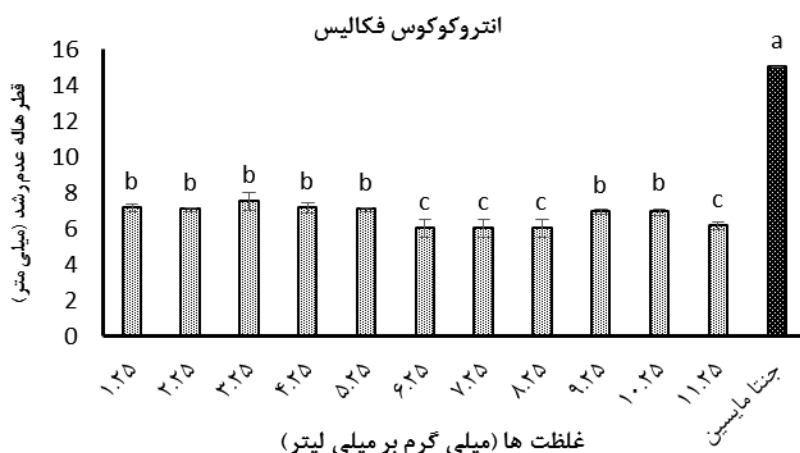
نتایج

در پژوهش حاضر به بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره کلروفومی استخراجی از پوسته توتیای دریایی *Echinometra mathaei* با استفاده از آزمون انتشار از دیسک پرداخته شد و نتایج این آزمون در ادامه آورده شده است. میزان تأثیر عصاره کلروفومی پوسته در غلظت‌های مختلف، روی باکتری‌های مورد آزمایش دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p < 0/05$). در غلظت‌های ۱/۲۵-۵/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر عصاره پوسته‌ی کلروفومی مربوط به باکتری‌های گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس و استافیلوکوکوس اورئوس بوده است. در غلظت‌های ۶/۲۵-۸/۲۵ بیشترین اثر مربوط به باکتری‌های گرم منفی کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکلی، و در غلظت‌های ۹/۲۵-۱۱/۲۵ بیشترین اثر مربوط به باکتری‌های گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس و سپس باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه است. اما اثر غلظت‌های مختلف عصاره روی باکتری‌های نامبرده اثر کمتری نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشته‌اند. در شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ نتایج برای چهار

1. One-way ANOVA

میلی لیتر بود که با غلظت‌های ۶/۲۵، ۷/۲۵، ۸/۲۵ و ۱۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره فاقد اختلاف معنی دار ولی نسبت به سایر غلظت‌ها و آنتی بیوتیک جنتامایسین اختلاف معنی داری نشان داد. عصاره تهیه شده روی باکتری مذکور اثر ضدباکتری کمتری نسبت به آنتی بیوتیک جنتامایسین داشت (شکل ۱).

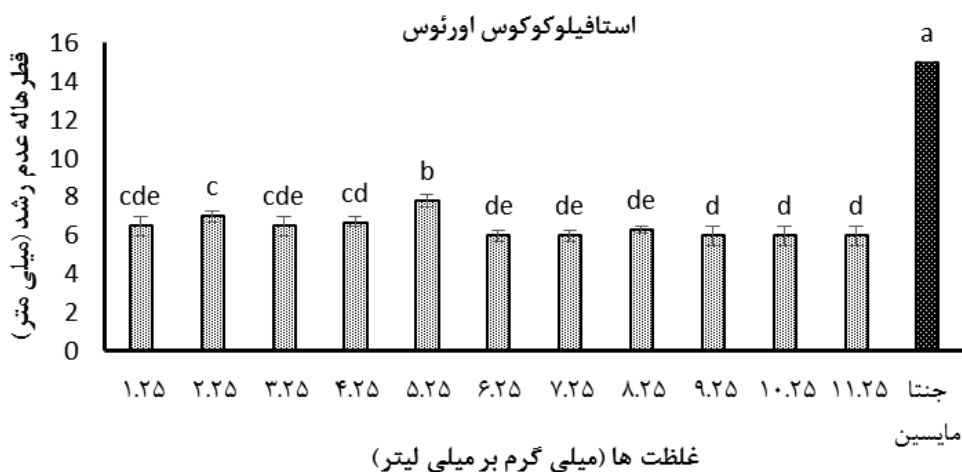
باکتری آزمایش شده به تفکیک آورده شده است. در این شکل‌ها آنتک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار بوده و حروف غیر همنام نیز نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵٪ هستند. در باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس بیشترین اثر ضدباکتری عصاره کلروفرمی پوسته، مربوط به غلظت ۳/۲۵ میلی گرم بر



شکل ۱. اثر ضدباکتری عصاره کلروفرمی پوسته توتیای دریایی بر باکتری *Enterococcus faecalis*

جنتامایسین داشت (شکل ۲). عصاره تهیه شده در غلظت‌های مختلف روی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس دارای اختلاف معنی داری بوده است ($p < 0.05$).

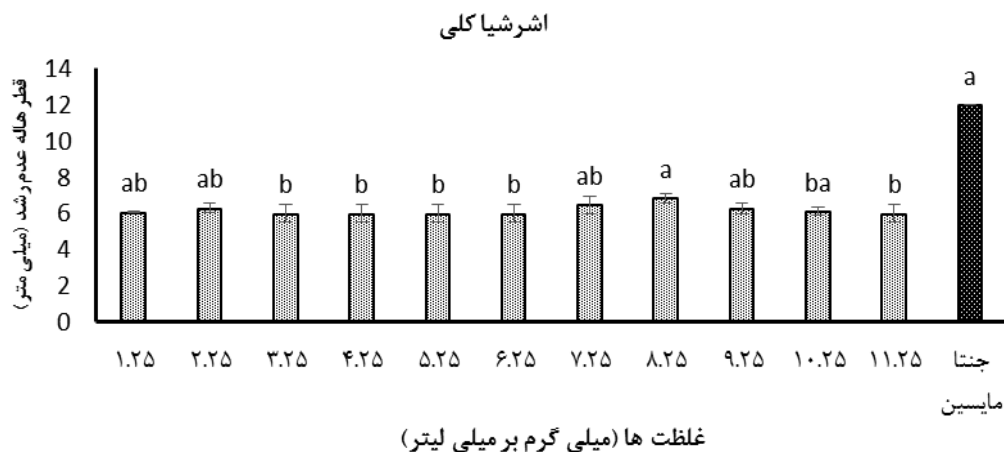
در باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به غلظت ۵/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود که این غلظت از عصاره اختلاف معنی داری با سایر غلظت‌ها و آنتی بیوتیک



شکل ۲. اثر ضدباکتری عصاره کلروفرمی پوسته توتیای دریایی بر باکتری *aureus Staphylococcus*

۱۰/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار ولی با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۳). اثر عصاره پوسته کلروفومی در غلظت‌های مختلف روی باکتری مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($p < 0.05$).

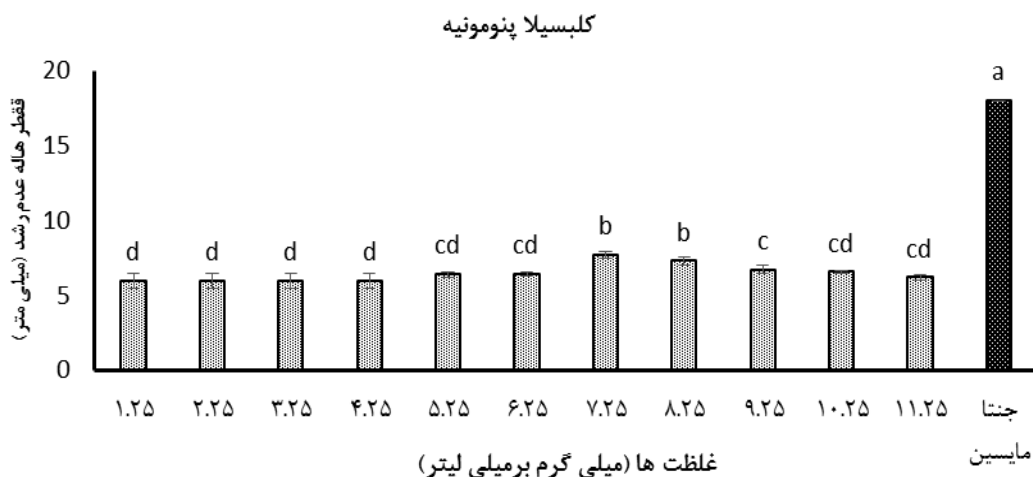
در باکتری گرم منفی اشرشیاکلی بیشترین اثر ضدباکتری را غلظت ۸/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد. عصاره پوسته کلروفومی در غلظت مذکور بر روی باکتری ای‌کلاهی اثری کمتر از جنتامایسین داشت. غلظت ۸/۲۵ با غلظت‌های ۲/۲۵، ۷/۲۵، ۹/۲۵ و



شکل ۳. اثر ضدباکتری عصاره کلروفومی پوسته توتیای دریایی بر باکتری *Escherichia coli*

اختلاف معنی‌داری نشان داد. عصاره موجود روی باکتری کلبسیلا پنومونیه اثری کمتر از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین داشت (شکل ۴). اثر عصاره مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف بر باکتری مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($p < 0.05$).

بیشترین اثر ضدباکتریایی عصاره کلروفومی پوسته در باکتری گرم منفی کلبسیلا پنومونیه مربوط به غلظت ۷/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. غلظت مذکور با غلظت ۸/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاقد اختلاف معنی‌دار ولی با آنتی‌بیوتیک و سایر غلظت‌ها



شکل ۴. اثر ضد باکتری عصاره کلروفومی پوسته توتیای دریایی بر باکتری *Klebsiella pneumoniae*

بحث و نتیجه گیری

آیا پوسته توتیای دریایی منبع مناسبی جهت استخراج ترکیبات ضدباکتریایی می‌باشد؟ موجودات دریایی منابعی غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی جدید هستند که وجود این ترکیبات در پوسته توتیای دریایی چشمگیر است و پیگمان‌های رنگی موجود در عصاره خام پوسته نقش خاصی در کشف رادیکال‌های آزاد دارند (Shankarlal et al., 2011). در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتری عصاره پوسته کلروفومی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* در غلظت‌های متفاوت مطالعه شد. بررسی فعالیت ضد میکروبی گونه‌های مختلف خارپوستان توسط محققین زیادی انجام گرفته است. در مطالعات بیشتر اثبات شده که ترکیبات ضد میکروبی یک نوع لیزوزیم هستند. در مطالعاتی که Benkendorff et al. (2001) و Haug et al. (2002) انجام دادند نشان داد که حداقل برخی از این ترکیبات ضد میکروبی ترکیبات غیر پروتئینی هستند. جهت اثبات اینکه آیا فعالیت‌های مشاهده شده مربوط به ترکیبات پروتئینی اشکال لیزوزیم مانندست و یا مربوط به ترکیبات غیر پروتئینی است نیاز به مطالعه و بررسی بیشتری دارد. ترکیبات مختلفی در فعالیت ضد میکروبی نقش دارند. جداسازی و خالص‌سازی مهم‌ترین بخش این ترکیبات فعال، نیازمند شناسایی ماهیت شیمیایی آن است (Abubakar et al., 2012). Uma & Parvathavarthini (2010) مطالعه‌ای را در زمینه خاصیت ضدباکتری عصاره هگزانی توتیای دریایی گونه *Temnopleurus alexandri* را بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره هگزانی این‌گونه دارای خاصیت ضدباکتریایی است و نیاز به خالص‌سازی بیشتر برای شناسایی ترکیبات شیمیایی عامل این اثر دارد. Uma & Parvathavarthini (2014) خاصیت ضدباکتریایی عصاره هیدروآلکلی توتیای دریایی *Temnopleurus*

alexandri را بر باکتری‌های گرم مثبت و باکتری‌های گرم منفی مطالعه کردند. این عصاره اثر ضدباکتریایی مناسبی را بر باکتری‌های مورد مطالعه به خصوص باکتری گرم منفی *E. coli* داشته است. بیشینه غلظت عصاره هیدروآلکی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* اثری برابر با اثر آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشته است. این در حالی است که در مطالعه حاضر بیشترین اثر ضد-باکتری عصاره کلروفومی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* مربوط به باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس بوده است و بیشینه غلظت عصاره کلروفومی پوسته در مقایسه با آنتی‌بیوتیک جنتامایسین اثری کمتر روی باکتری‌های مورد مطالعه داشته است. در پژوهش Uma (2014) Parvathavarthini & ترکیبات عصاره هیدروآلکی توتیای *Temnopleurus alexandri* جهت شناسایی به دستگاه GC-MS تزریق شد و آنالیز این دستگاه نشان از حضور استرول‌ها شامل کلسترول و دسمواسترول را داد. این احتمال نیز وجود دارد که در توتیای دریایی *Echinometra mathaei*، استرول‌ها نقش مؤثری در خاصیت ضدباکتریایی این گونه داشته باشند. فعالیت ضدباکتری تشخیص داده شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی در خارپوستان باشد. لیزوزوم‌ها نیز ممکن است نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی در خارپوستان بازی کنند. فعالیت بالای شبه لیزوزومی با خاصیت آنتی‌باکتریال در عصاره طبیعی حاصل از مایع سلومی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Stabili & Pagliara, 1994; Stabili et al., 1994). Service et al. (1984) مطالعه‌ای را در زمینه خواص ضدباکتریایی رنگدانه Echinochrome A پوسته توتیای دریایی *Echinus esculentus* انجام دادند که این رنگدانه اثر ضد باکتری در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی داشته است. در پوسته توتیای دریایی مورد مطالعه نیز این رنگدانه

دریایی گونه *Salmacis virgulata* را مورد بررسی قرار دادند و طبق نتایج بدست آمده مشخص شد که عصاره پوسته متانولی گونه مورد مطالعه دارای خواص ضدباکتریایی است طبق آزمایشات صورت گرفته توسط اصلیان و همکاران مشخص شد که عصاره هگزانی و اتیل استاتی پوسته و عصاره هگزانی خار بر باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس اثر ضدباکتری بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارد. در مطالعه حاضر نیز بیشترین اثر ضدباکتری عصاره کلروفرمی مربوط به باکتری گرم مثبت انتروکوکوس فکالیس بود. در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی‌ها به خاطر دیواره نفوذ ناپذیرشان نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌ترند. پوشش سلولی گرم منفی‌ها ساختمانی چندلایه‌ای و بسیار پیچیده می‌باشد. غشای سیتوپلاسمی (که در باکتری‌های گرم منفی به آن غشای داخلی می‌گویند) به وسیله یک لایه مسطح از پپتیدوگلیکان پوشیده می‌شود که یک لایه پیچیده به نام غشای خارجی روی آن قرار گرفته است (Brogden, 2005; Venugopal, 2009).

در مطالعه حاضر غلظت‌های ۱/۲۵-۵/۲۵ عصاره پوسته کلروفرمی بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم مثبت داشته است احتمال می‌رود دلیل این مسأله این باشد که عصاره موردنظر در غلظت‌های پایین، از پوشش سلولی نسبتاً ساده عبور کرده و وارد سلول باکتری شده و باکتری را متلاشی می‌کند اما باکتری‌های گرم منفی به دلیل دیواره چندلایه‌ای پیچیده‌ای که دارند احتمال می‌رود این ساختمان پیچیده در غلظت‌های بالایی از این عصاره‌ها نفوذناپذیر بودنشان را از دست دهند. Adibpour et al. (2014) به بررسی اثر ضدباکتریایی خیاردریایی *Holothuria leuspilota* جمع‌آوری شده از ساحل خلیج فارس و دریای عمان پرداختند و مشخص شد که دیواره بدن این گونه دارای خاصیت ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های *S.aureu* *S.typhi* *E.coli*

وجود دارد و امکان دارد بخشی از خواص ضد میکروبی مورد مطالعه مربوط به این رنگدانه باشد. Asleian et al. (2014) خواص ضد میکروبی اندام‌های مختلف توتیای دریایی *Echinometra mataei* سواحل جزیره ابوموسی را بررسی کردند و اندام‌هایی از قبیل خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو را مورد مطالعه قرار دادند و عصاره‌های متفاوت هگزانی، اتیل استاتی و متانولی از هر اندام تهیه و طبق نتایج به دست آمده از آزمون انتشار از دیسک در آگار مشخص گردید که عصاره‌های مختلف در اندام‌های متفاوت از نظر اثر ضدباکتریایی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند ($p < 0/05$). در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان اثر ضدباکتریایی در غلظت‌های مختلف در باکتری‌های گرم منفی و مثبت دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($p < 0/05$). بیشترین اثر ضد باکتری مربوط به عصاره‌های هگزانی و اتیل استاتی پوسته بود. از آنجایی که حلال هگزان یک حلال غیرقطبی است و حلال اتیل استات نیز یک حلال نیمه قطبی می‌باشد، گروه تحقیقاتی مذکور احتمال داد که ترکیبات شیمیایی موجود در پوسته که عامل خواص ضد باکتری هستند یک ترکیب غیرقطبی یا نیمه‌قطبی می‌باشد. حتی عصاره‌ی بدست آمده توسط گروه تحقیقاتی فوق اثر ضدباکتری بهتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین نشان دادند و در نهایت مشخص شد که اندام پوسته توتیای مورد نظر دارای خاصیت ضدباکتری قابل ملاحظه‌ای می‌باشد. در مطالعه‌ی حاضر احتمال می‌رود قطبیت ضعیف حلال کلروفرم باعث استخراج ماده‌ی مؤثره از پوسته شده باشد و اثر ضدباکتریایی عصاره تهیه شده در غلظت‌های مختلف بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی‌داری بوده است ($p < 0/05$). این یافته همچنین مشابه نتایجی است که Shankarlal et al. (2011) بدست آوردند آنها فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی پوسته توتیای

و یا باعث ایجاد منفذ در سطح غشا می‌شوند و به این شکل سبب از بین رفتن میکرو اورگانسیم‌ها می‌شود. همچنین بر اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های آنزیمی اثر گذاشته و باعث مرگ سلول باکتری می‌شوند (Brogden, 2005; Venugopal, 2009). البته لازم به ذکر است که بسیاری از پیتیدهای ضد میکروبی دارای عملکرد چند منظوره هستند یعنی می‌توانند به طور همزمان در غشای سلولی و داخل سلولی اثر بگذارند (Hale & Hancock, 2007; Kamysz et al., 2003; Nicolas, 2009).

به طور کلی در مطالعه حاضر و سایر تحقیقات صورت گرفته در زمینه خاصیت ضد میکروبی خارپوستان مشخص گردید که دیواره بدن خارپوستان خصوصا توتیاهای دریایی دارای ترکیبات منحصر بفردی است. در واقع یک اندام غنی از ترکیبات ضد میکروبی جدید است که نیاز به مطالعه و بررسی بیشتر و خالص سازی آن ماده مؤثره دارد.

سپاسگزاری

از آقایان دکتر جعفری، مهندس زاد عباس و دکتر شفیع به دلیل کمک‌های بی‌شائبه و بی‌دریغ ایشان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Abubakar, L.; Mwangi, C.; Uku, J.; Ndirangu, S.; (2012). Antimicrobial activity of various extract of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics; 1(1): 19-23.
- Adibpour, N., Nasr, F., Nematpour, F., Shakouri, A., Ameri, A. (2014). Antibacterial and Antifungal Activity of *Holocyrtia leucospilota* Isolated From Persian Gulf and Oman Sea. Jundishapur j Microbiol, 7(1): e8708.
- Ageenko, V.N.; Kiselev, V.K.; Nelly, A.O.; (2011). Expression Of Pigments Cell-Specific Genes In The Ontogenesis of The Sea Urchin *Strongylocentrotus Intermedius*. Hindawi Publishing Corporation; Article ID 730356, 9 pages.
- Asleian, H.; Kamrany, A.; Yousefzadey, M.; Keshavarz, M.; (2014). Antibacterial activity of various extracts of the sea urchin *Echinometra mathaei*; 37-52.
- Bickmeyer, U.; Assmann M.; Kock, M.; Christian, S.; (2005). A secondary metabolite, 4,5dibromopyrrole-2-carboxylic acid, from marinesponges of the genus *Agelas* alters cellular calcium signals. Environmental toxicology and pharmacology; 19:

P.aeruginosa بوده است. (2002) Haug et al. پژوهشی را در زمینه اثر ضدباکتری سه گونه خارپوست شامل توتیای دریایی گونه *Strongylocentrotus droebachiensis* ستاره دریایی *Asterias rubens* و خاردریایی گونه *Cucumaria frondosa* انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره‌های تهیه شده از دیواره و مایع درون حفره شکمی هر سه گونه و تخم ستاره دریایی *A. Rubens* و تخم خیار دریایی *C.frondosa* دارای بیشترین اثر ضدباکتریایی هستند و پژوهشگران مذکور علت اختلاف در میزان اثر ترکیبات ضد میکروبی را تفاوت در آب دوست بودن و حساسیت به حرارت در ترکیبات مختلف بدست آمده بیان کردند.

پیتیدهای ضد میکروبی یا به اختصار AMPs عبارتند از مولکول‌هایی کوچک با حدود ۱۰۰ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون. این ترکیبات تفاوت قابل ملاحظه‌ای در توالی اسیدهای آمینه و ساختار ساختمانی دارند و اکثر آنها دارای بار مثبت هستند. این خصوصیات شیمیایی و فیزیکی اجازه می‌دهد که این پیتیدها در آب قابل حل باشند و همچنین به طور همزمان با لایه هیدروفوب غشای باکتری هم میانکنش داشته باشند. این پیتیدها به دیواره غشای میکروارگانسیم‌ها چسبیده و غشا را بی‌ثبات کرده

- 423-427.
- Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Munro, M.H.G.; Northcote, P.T.; Prinsep, M.R.; (2007). Marine natural products. *Nat Prod Rep*; 21: 1-49.
- Briskin, D.; (2000). Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. *Plant Physiology*; 124: 507-514.
- Brogden, K.A.; (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*; 3: 238-250.
- Casas, S.M.; Comesana, P.; Cao, A.; Villalba, A.; (2011). Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). *J. Invertebr. Pathol*; 106: 343-345.
- De Vries, D.J.; Hall, M.R.; (1994). Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Dev*; 33: 161-173.
- Hale, J.D.; Hancock, R.E.; (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 5: 951-959.
- 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.; 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*; 3-69.
- Haug, T.; Kjuul, A.K.; Styrvold, O.B.; Sandsdalen, E.; Olsen, M.O.; Stensvag, K.; (2002). Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J. Invertebr. Pathol*; 81: 94-102.
- 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.
- Jha, R.K.; Zirong, Xu.; (2004). Biomedical Compounds from Marine organism. *Mar Drugs*; 2(3): 123-146.
- Kamysz, W.; Okroj, M.; Łukasiak, J.; (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. *Acta Biochim Pol*; 50: 461-469.
- Lai, Y.G.; (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*; 30: 131-141.
- Lebedev, A.; Lvanova, M.; Levitsky, D.; (2008). Iron Chelators and Free Radical Scavengers In Naturally Occuring Polyhydroxylated 1, 4-Naphthoquinones. *Hemoglobin*; 32(1-2): 165-79.
- Nicolas, P.; (2009). Multifunctional host defense peptides: intracellular-targeting antimicrobial peptides. *FEBS J*; 276: 6483-6496.
- Nourozy, J.; Valey, Gh.; Yousefy, H.; (2004). The effect of mutations on different methods and patterns of antibiotic resistance plasmids in *E.coli* and *Staphylococcus aureus*. *Scientific Journal*; 8(29): 8-1.
- Ovchinnikov, T.V.; (2006). Aurelin a novel antimicrobial peptide from jellyfish *Aurelia aurita* with structural features of defensins and channel-blocking toxins. *Biochem. Biophys. Res. Commun*; 348: 514-523.
- 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.
- Rinkevich, B.; (2000). Cell culture from marine invertebrates: obstacle, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol*; 70: 133-153.
- Schillaci, D.; Arizza, V.; (2013). Echinoderm Antimicrobial Peptides to Contrast Human Pathogens. *Natural Products Chemistry & Research*; 1: 2.

- Service, M., Wardlaw, A.C., (1984). Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 79: 161-165.
- Shankarlal, S.; Prabu, K.; Natarajan, E.; (2011). Antimicrobial and Antioxidant Activity of Purple Sea Urchin Shell (*Salmacis virgulata*). *American-Eurasian Journal of Scientific Research*; 3: 178-181.
- Stabili, L.; Lassagues, M.; Pastore, M.; (1996). Study on the antibacterial capabilities of eggs of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinodea). *J. Invertebr. Pathol*; 67: 180-182.
- Stabili, L.; Pagliara, P.; (1994). Antibacterial protection in *Marthasterias glacialis* eggs-characterization of lysozyme-like activity. *Comp. Biochem. Physiol*; B 109, 709-713.
- Uma, B., and Parvathavarthini, R., 2014. Antibacterial Activity of Hydroalcohol Extract of Sea Urchin *Temnopleurus Alexandri*. *Journal of Applied Research*. Issue:1: 1677-1680.
- Uma, B.; Paravathavarthini, R.; (2010). Antibacterial Effect of Hexane extract of Sea Urchin, *Temnopleurus alexandri*. *International Journal of PharmTech Research*.3: 1677-1680.
- Uma, B.; Parvathavarthini, R.; (2014). Antibacterial Activity of Hydroalcohol Extract of Sea Urchin *Temnopleurus Alexandri*. *Journal of Applied Research*. Volume 4- Issue:1
- Venugopal, V.; (2009). Marine products for healthcare : function and bioactive nutraceutical compound from the ocean. CRC Press Taylor & Francis Group; Boca Raton, FL, USA; 23-50.
- WHO (World health Organization); (1998). The World Health Report 1998, Life in the 21st century A vision for all. Report in the Director-General. Geneva, Switzerland. Pp 30-46.
- Yasoda, H.N., Chi, Z., and Zhu, K., (2006). Probiotics and sea cucumber farming. *SPC beche-de-mer Information Bulletin*. 24:4-8
- Yount, NY.; Bayer, AS.; Xiong, YQ.; Yeaman, MR.; (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*; 84: 435-458.
- Zhou, D.Y.; Qin, L.; Zhu, B.W.; Wang, X.D.; Tan, H.; Feng Yang, J. *et al.*; (2011). Extraction and Antioxidant Property of Polyhydroxylated Naphthoquinone Pigments From Spines of Purple Sea Urchin *Strongylocentrotus Nudus*. *Food Chemistry*; 129(4): 1591-1597.