فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳

اثرات عصاره‌های آلی و آبی استخراج شده از توتیای دریایی خلیج فارس (*Echinometra mathaei*) بر سه سویه بیماری‌زای قارچ *Candida*

سیما راهی[۱]، بهروز حیدری[۲]*، مهدی رسا[۳]

۱- کارشناس ارشد زیست دریا، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان
۳- مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان

چکیده

مطالعه حاضر در رابطه با اثرات ضدقارچی اجزای مختلف توتیای دریایی *Echinometra mathaei* صورت گرفته است. گنادها، پوسته، خارها و بخش‌دهانی توتیای دریایی مورد مطالعه قرار گرفتند. از سویه‌های قارچی *Candida albicans*، *Candida glabrata* و *Candida parapsilosis* به دلیل بیماری‌زا بودن و شیوع فراوان آن‌ها استفاده شد. توتیای‌دریایی از سواحل خلیج فارس جمع‌آوری شد و پس از کالبدشکافی، از بخش دهانی، گناد، پوسته و خار توتیای دریایی توسط سه حلال سدیم بافر فسفات، اتانول و استونیتریل عصاره‌گیری به عمل آمد. فعالیت ضدقارچی عصاره‌ها، با استفاده از روش Well Diffusion، در دو غلظت ۶۰۰ و ۱۵۰۰ µg/well، مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت ضدقارچی پوسته و گناد و همچنین خار (علیه یکی از سویه‌های قارچی) مشاهده شد. عصاره بخش دهانی در همه آزمایش‌ها فاقد فعالیت ضدقارچی بود. بنابر نتایج، پیشنهاد می‌شود که بخش پوسته و گناد توتیای‌دریایی جهت استخراج ترکیبات موثر در مطالعات آینده، در اولویت قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *توتیای دریایی، خلیج فارس، قارچ* Candida.

تاریخ دریافت: مرداد ۹۳ تاریخ پذیرش: مهر ۹۳

* نویسنده مسئول: bheidari@guilan.ac.ir

مقدمه

اقیانوس‌ها ٪۷۱ از سطح کره زمین را می‌پوشانند و حدوداً شامل نصف کل تولید زیستی دنیا هستند (De Vries and Hall, 1994). از آنجایی که تنوع زیستی اقیانوس‌ها بالا است، موجودات دریایی همان طور که منابع با ارزش خوراکی مغذی هستند، همچنین منابعی جدید از ترکیبات فعال زیستی از قبیل پپتیدهای بیواکتیو ویژه، عوامل ضدمیکروبی و ضدسرطان تولید می کنند (Guerard et al., 2011). در سال‌های اخیر ترکیبات بیواکتیو بسیاری از جانوران دریایی مختلف عصاره‌گیری شده‌اند. پژوهش در مورد متابولیت‌های جدید از موجودات دریایی، جداسازی بیش از ۱۰۰۰۰ متابولیت را نتیجه داد ه است(Mokhlesi et al., 2012). ترکیبات بیواکتیو از گروه‌های مختلفی از جانوران دریایی از جمله مرجان‌ها (Jensen et al., 1996)، سخت پوستان، تونیکات‌ها (Findlay and Smith, 1995)، خارپوستان (Bryan et al., 1992)، ماهی‌ها (Cole et al., 1997) و اسفنج‌ها (Fusetani, 1996) جداسازی شده‌اند. جمعیت میکروبی در آب دریا و رسوبات می‌تواند به ترتیب بالاتر از $۱۰^{۶}$ و $۱۰^{۹}$ در هر میلی‌لیتر باشد (Austin,1988). بنابراین بی‌مهرگان دریایی به طور مداوم در معرض تراکم بالایی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها هستند که بسیاری از آن‌ها ممکن است پاتوژن یا بیماری‌زا باشند (Haug et al., 2002). این سوال به ذهن می‌آید که چطور این موجودات ظریف و حساس از خودشان در برابر شکارچیان و پاتوژن‌ها در محیط‌زیست دریایی محافظت می‌کنند؟ جواب این سوال به مکانیسم‌های دفاعی این موجودات برمی‌گردد (یوسف‌پور، ۱۳۹۱). ترکیبات شیمیایی که از این موجودات ترشح می‌شوند از نظر زیست‌شناختی بسیار قوی و حساس هستند. برخی از این متابولیت‌های بیواکتیو دارای پتانسیل زیست- پزشکی[1] هستند (Bhakuni and Rawat, 2005). خارپوستان موجودات بسترزی بوده و دائماً در معرض مقادیر نسبتاً بالایی از باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها قرار دارند که تعداد زیادی از آن‌ها ممکن است برای جاندار زیان‌آور باشد. بقای این موجودات به مکانیسم‌های ضدمیکروبی مناسب بستگی دارد تا بتوانند خود را دربرابر عفونت‌ها و صدمات محافظت کنند. چند نوع ماده ضدمیکروبی از خارپوستان جدا شده است (Haug et al., 2002). شاخه Echinodermata شاخه بزرگی با تقریباً ۷۰۰۰ گونه زنده است که به رده‌های Crinoidea (سوسن‌های دریایی)، Ophiuroidea (ستاره‌های

1- Biomedical

شکننده)، Asteroidea (ستاره‌سانان)، Echinoidea (خارسانان) و Holothuroidea (خیارسانان) تقسیم‌بندی می‌شوند (Li et al., 2010).

اخیراً این موضوع مطرح شده که توتیای‌دریایی منبعی غنی از ترکیبات بیواکتیو است. ترکیبات بیواکتیو موجود در اندام‌های مختلف یک خارپوست متفاوت است و گزارشاتی در این زمینه وجود دارد. Haug و همکاران در سال ۲۰۰۲ فعالیت ضدباکتری عصاره‌های بدست آمده از پوسته توتیای دریایی سبز با نام علمی *Strongylocentrotus droebachiensis* را گزارش کردند. همچنین در مطالعه‌ای که اخیراً توسط Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفته است، عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های مختلف (گنادها، بخش‌دهانی، روده، خارها و پوسته) یک نوع توتیای‌دریایی به نام *Tripneustes gratilla* اثرات ضدباکتریایی مختلفی را در مقابل طیفی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی نشان دادند. در این مطالعه مشخص شد که عصاره مربوط به گنادها و روده، دارای بیش‌ترین فعالیت ضدباکتریای است. همچنین با توجه به گزارش Shamsuddin و همکاران در سال ۲۰۱۰، مشخص شد که عصاره‌های مختلف تهیه شده از بافت‌های داخلی و لایه خارجی بدن سه گونه از توتیاهای دریایی، اثرات متفاوتی برروی چند گونه مختلف باکتریایی دارند؛ به طوری که میزان فعالیت آن‌ها در مقابل باکتری‌ها متفاوت است و برخی از عصاره‌ها تنها قادر به مهار تعدادی از باکتری‌ها بودند. در سال ۲۰۱۱، Shankarlal و همکاران بیان کردند که عصاره تهیه شده از پوسته توتیای دریایی بنفش (*Salmacis virgulata*) دارای فعالیت ضدمیکروبی است.

کاندیداها (*Candida*) قارچ‌های مخمری مشهوری هستند که موضوع پژوهش‌های بسیاری در زمینه پزشکی، صنعت و زیست‌شناسی هستند. جنس کاندیدا مشتمل بر بیش از صد گونه است و حدود ۱۵-۱۰ گونه باعث بیماری‌های مختلف در انسان می‌شوند. گونه‌های متعددی باعث کاندیدیاز پوست، کاندیدیاز دهان، واژینیت کاندیدیایی، اونیکومایکوز کاندیدیایی (عفونت ناخن) و سایر عفونت‌های قارچی می‌شوند. در صورتی که به علل مختلف، سیستم ایمنی میزبان دچار نقص یا ضعف می‌شود، کاندیداها عفونت‌های سیستمیک خطرناک و کشنده‌ای در خون یا احشا داخلی به وجود می‌آورند (میرهندی و همکاران، ۱۳۸۷). از سه سویه *Candida albicans*، *Candida glabrata* و *Candida parapsilosis* در این مطالعه استفاده شد.

از آنجایی که خلیج فارس غنی از ذخایر موجودات دریایی است و این موجودات برای مبارزه با عوامل میکروبی دارای ترکیبات بیواکتیو هستند که می‌توان از این توانایی بالقوه جهت تهیه مواد زیست فعال استفاده کرد. از این رو در مطالعه حاضر سعی شده است تا فعالیت ضد قارچی عصاره‌های آلی و آبی قسمت‌های گوناگون بدن توتیای دریایی خلیج فارس بر روی سویه‌های قارچ بیماری‌زای *Candida* spp. مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های توتیای دریایی با وزن ۸۳/۲۷±۰/۵۸ گرم و قطر ۵/۵±۰/۴۸ سانتی‌متر از سواحل جزیره قشم از عمق یکسان جمع‌آوری شدند. بخش دهانی به همراه عضلات متصل به آن، گناد، پوسته و خار توتیای دریایی بعد از کالبدشکافی، فریز شد و با ازت مایع در داخل فلاسک‌های حاوی یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی دریا دانشکده علوم پایه دانشگاه گیلان منتقل شد. برای مشخص نمودن رده‌بندی توتیای‌دریایی در حد جنس و گونه ویژگی‌های ظاهری توتیاهای دریایی بررسی و با کلید شناسایی منطقه‌ای (Price, 1983) مطابقت داده شد تا جنس و گونه نمونه مورد نظر مشخص و تایید شد.

آماده‌سازی اندام‌ها جهت عصاره‌گیری

در توتیای دریایی، بخش دهانی به همراه عضلات متصل به آن در نظر گرفته شد و سه جزء دیگر شامل گناد، پوسته و خار، به همان شکل از قبل تشریح شده جهت انجام عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کاهش خطا و افزایش دقت در روند کار، عصاره‌گیری از هر کدام از اندام‌های جاندار، سه بار تکرار شد.

عصاره بافر فسفات سدیم

برای تهیه این عصاره از بافر فسفات‌سدیم ۰/۱M (حاوی $NaH_2PO_4.2H_2O$ ۰/۱M و NaOH ۰/۲M) استفاده شد و pH آن معادل ۷/۲ در نظر گرفته شد که یک pH خنثی جهت استخراج

اغلب ترکیبات پروتئینی است. هر کدام از اندام‌های مورد آزمایش پس از آماده سازی، با استفاده از هاون و با کمک ازت مایع به صورت پودر در آمدند و به آن ها با نسبت ۱:۵ بافر فسفات استریل و سرد اضافه شد. در ادامه، نمونه‌ها با استفاده از دستگاه سونیکاتور (Misonix 3000, USA) به مدت ۵ دقیقه با قدرت ۲۱ وات هموژن شدند. پس از آن هر یک از محلول‌های آماده شده، توسط دستگاه انکوباتور شیکردار (Infros, RFI-150) و بر روی یخ با دور ۹۰ rpm به مدت ۳-۲ ساعت تکان داده شدند. به منظور جداسازی بافت از محلول رویی، عصاره‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه میکروسانترفیوژ (Centurion Scientific; England) با دمای ۴°C و دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی پس از جدا شدن از رسوبات بافتی، در داخل پلیت‌های شیشه‌ای استریل و وزن شده، ریخته شد و جهت لیوفیلیزه کردن به دستگاه Freeze-dryer (Vacuubrand, Germany) انتقال داده شد. این مرحله به مدت ۹ ساعت و در دمای ۵۵°C- و فشار ۰/۰۲ mbarصورت گرفت تا عصاره بافر فسفاتی به طور کامل خشک شود و به صورت پودری کاملا خشک درآید. عصاره‌های لیوفیلیزه شده پس از وزن کردن، تا زمان انجام آزمون‌های ضدقارچی در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند.

عصاره اتانولی

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 ۹۰ rpm در دستگاه انکوباتور شیکردار، تکان داده شدند و به منظور خروج بیش‌تر ترکیبات و عصاره‌گیری بهتر، دما ۴۰°C در نظر گرفته شد. جداسازی عصاره از رسوبات بافتی توسط دستگاه میکروسانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C و با دور ۴۰۰۰ rpm صورت گرفت. محلول رویی در پلیت‌های شیشه‌ای استریل و وزن شده، ریخته شد و جهت لیوفیلیزه کردن به دستگاه Freeze-dryer تحت شرایط ذکر شده در بخش قبل، انتقال داده شد. پس از لیوفیلیزه کردن و خروج اتانول، پلیت‌های حاوی عصاره‌های خشک وزن شدند و تا زمان انجام آزمون‌های ضدقارچی در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

عصاره استونیتریلی

برای تهیه این نوع عصاره از استونیتریل (C_2H_3N) ٪۸۰ استفاده شد و با همان نسبت ۱:۵ به بافت‌های پودر شده اضافه شد. مراحل عصاره‌گیری با استفاده از این حلال آلی همانند عصاره اتانولی و تحت شرایط مشابه صورت گرفت. عصاره‌های تهیه شده پس از لیوفیلیزه کردن و وزن کردن تا زمان استفاده از آن‌ها برای انجام آزمون‌های میکروبی در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

ارگانیسم ها

سه قارچ مورد استفاده شامل *Candida albicans*، *Candida glabrata* و *Candida parapsilosis* هستند که محیط کشت مناسب برای رشد آن‌ها، محیط کشت Sabouraud Dextrose Agar (SDA؛ شرکت Merk، آلمان) است. سویه‌های قارچی *C. albicans* PTCC (S027 CATCC 10231) و *C. glabrata* PTCC (5297 CDSM 11226) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (PTCC) و سویه *C. parapsilosis* IBRC (IBRC-30005) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) تهیه شدند. برای تهیه محیط کشت SDA، مقدار ۶۵ گرم از محیط کشت ذکر شده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه[1] حل شد و در دستگاه اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل شد. پس از خروج از دستگاه و رسیدن دمای محیط کشت به حدود ۴۰°C، محیط کشت در پلیت‌های استریل ریخته شد و به منظور خشک شدن و اطمینان از عدم وجود هرگونه آلودگی، به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شد. به دلیل جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی میکروبی به داخل محیط کشت، تمامی این مراحل در کنار شعله و تحت شرایط استریل صورت گرفت. جهت کشت قارچ در آزمایشگاه، پس از شکستن آمپول‌های حاوی قارچ‌های لیوفیلیزه در کنار شعله، مقدار ۰/۵ ml آب مقطر دیونیزه داخل هر آمپول ریخته شد تا قارچ‌ها در داخل آب مخلوط شوند. سوسپانسیون‌های به دست آمده روی محیط‌های کشت SDA ریخته و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور با دمای ۳۷°C قرار داده شد. پس از طی این مدت، جهت اطمینان از خلوص قارچی، هر یک از آن‌ها در محیط‌های جدید به صورت خطی کشت داده شد.

1 .d.d.H_2O

تعیین اثر ضدقارچی

عصاره‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال (GR-200; AND)، به مقادیر ۱۵۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم وزن شدند. حلال‌های مورد استفاده برای انجام آزمون‌های ضدقارچی، عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی، دی‌متیل‌سولفکساید (DMSO؛ شرکت Merck، آلمان) و عصاره‌های بافرفسفاتی، آب مقطر دیونیزه بودند که هرکدام از عصاره‌ها در ۴۰ µL حلال مربوطه، حل شدند. روش انتشار چاهکی یا افقی در پلیت‌های چاهک‌دار به عنوان روش میکروبی موثر به منظور بررسی اثرات ضدقارچی بکار برده شد. بدین منظور از قارچ‌های تازه کشت داده شده که ۲۴ ساعت قبل در محیط کشت SDA کشت داده شده بود، استفاده شد. ۱۰۰ µL از سوسپانسیون مربوط به هر باکتری روی محیط‌های کشت جدید اضافه و با استفاده از پیپت پاستور به صورت سفره‌ای کشت داده شد. در مرحله بعد، به کمک انتهای پیپت پاستور، تعدادی چاهک به قطر ۵ mm در محیط‌های تازه کشت داده شده، ایجاد شد و عصاره‌های حل شده در حلال‌های مربوطه و آماده در داخل چاهک‌ها ریخته شد. در انتها، پلیت‌ها در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. پس از طی ۲۴ ساعت در صورت وجود هاله مهار در نمونه‌ها، قطر آن برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد و داده‌های به دست آمده به صورت میانگین محاسبه شد.

تیمارهای کنترل

آزمون‌های آنتی‌بیوگرام به عنوان کنترل مثبت و استاندارد اثرگذاری بر روی قارچ‌ها انجام گرفت. بدین منظور از ضدقارچ‌های کتوکونازول (۳۰ µg/disc)، فلوکونازول (۳۰ µg/disc)، نیستاتین (۳۰ µg/disc)، استفاده شد. دو حلال DMSO و $d.dH_2O$ به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفتند. هر آزمایش آنتی‌بیوگرام ۳ بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار (mean ± SD) محاسبه شد. دو حلال DMSO و $d.dH_2O$ به عنوان کنترل منفی مورد آزمایش قرار گرفتند تا از عدم ایجاد اختلال در آزمایش توسط آن‌ها اطمینان حاصل شود.

آزمون‌های 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 قرارگرفت.

نتایج

اثر عصاره‌ها بر *Candid albicans*

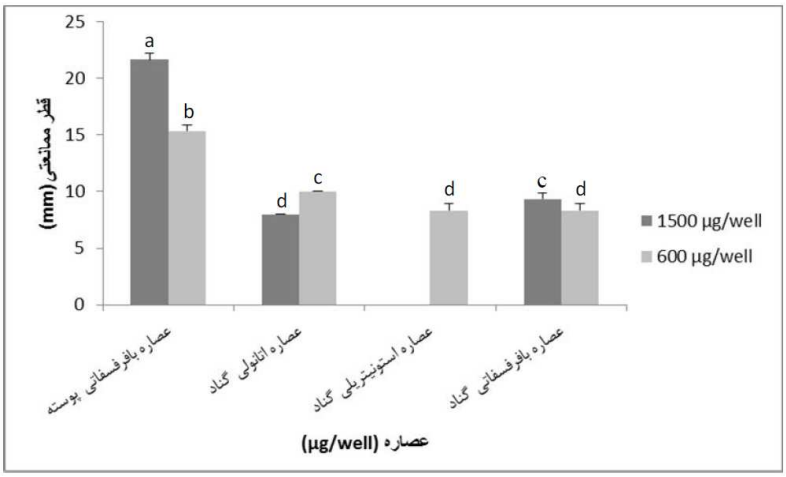
عصاره‌های بخش‌دهانی فاقد فعالیت ضدقارچی در برابر سه سویه مورد نظر بود. عصاره‌های حاصل از نیز خار فاقد فعالیت در برابر سویه *C. albicans* بود. عصاره بافر فسفاتی پوسته دارای فعالیت ضدقارچی و عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی این بخش فاقد فعالیت ضدقارچی در برابر سویه مذکور بودند. همچنین هر سه عصاره گناد فعالیت ضدقارچی در برابر این سویه ارائه می‌دهند. با توجه به نتایج آماری، فعالیت عصاره‌های مختلف در هر دو غلظت ۶۰۰µg/well و ۱۵۰۰µg/well تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵؛ شکل ۱). بیش‌ترین هاله مهاری با قطر ۲۱/۶۷±۰/۵۸mm مربوط به عصاره بافر فسفاتی پوسته ۱۵۰۰µg/well و کم‌ترین آن مربوط به عصاره‌های استونیتریلی گناد ۶۰۰µg/well و اتانولی گناد ۱۵۰۰µg/well بود. همچنین این قارچ نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی مورد استفاده، حساسیت نشان داد که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت بود (جدول ۱). نتایج آماری نشان دهنده وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال برای همه قارچ‌های مورد مطالعه بود (P<۰/۰۵). آزمون‌های کنترل $d.d.H_2O$ و DMSO نیز بر روی همه قارچ‌ها، منفی بود و قارچ‌ها هیچ گونه حساسیتی نسبت به حلال‌های مورد استفاده نشان ندادند.

اثر عصاره‌ها بر *Candida glabrata*

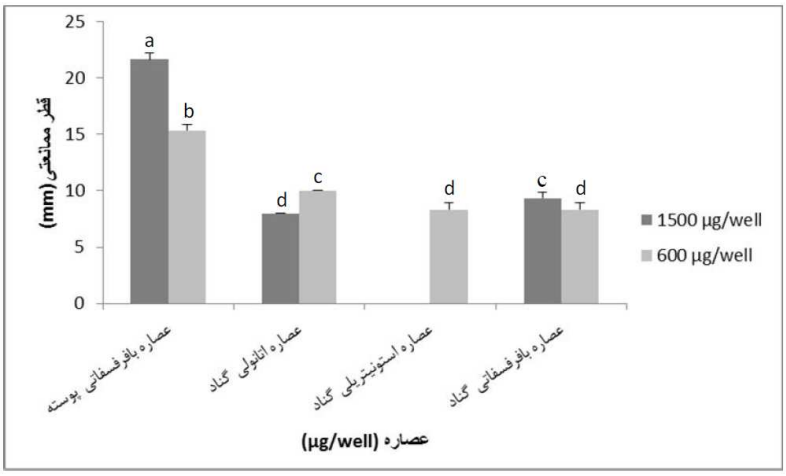
عصاره‌های بافر فسفاتی و استونیتریلی گناد دارای فعالیت ضدقارچی و عصاره اتانولی این بخش فاقد فعالیت ضدقارچی در برابر سویه *C. glabrata* بود. همچنین همه عصاره‌های پوسته و خار فعالیت ضدقارچی در برابر این سویه ارائه می‌دهند. آزمون‌های آماری تفاوت معنی‌داری را در فعالیت ضدقارچی عصاره‌های مختلف در هر دو غلظت ۶۰۰µg/well و ۱۵۰۰µg/well نشان دادند (P<۰/۰۵؛ شکل ۲). بیش‌ترین هاله مهاری با قطر ۱۱/۳۳±۰/۵۸mm مربوط به عصاره اتانولی خار ۱۵۰۰µg/well و کم‌ترین میزان این فعالیت مربوط به عصاره‌های اتانولی، استونیتریلی و بافر فسفاتی خار و استونیتریلی پوسته با غلظت ۶۰۰µg/well بود.

اثر عصاره‌ها بر *Candida parapsilosis*

عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی پوسته دارای فعالیت ضدقارچی و عصاره بافرفسفاتی این بخش فاقد فعالیت ضدقارچی در برابر سویه *C. parapsilosis* بود. با توجه به نتایج آماری، فعالیت ضدقارچی عصاره اتانولی پوسته ۶۰۰µg/well به طور معنی‌داری بالاتر از میزان این فعالیت در عصاره استونیتریلی پوسته ۶۰۰µg/well بود (P<۰/۰۵؛ شکل ۳). بیش‌ترین هاله مهاری با قطر ۹/۳۳±۰/۵۸mm مربوط به عصاره اتانولی پوسته در غلظت ۶۰۰µg/well و کم‌ترین این فعالیت مربوط به عصاره استونیتریلی پوسته در غلظت ۶۰۰µg/well بود. همچنین سه سویه قارچ نسبت به همه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده، حساسیت نشان داد که میزان حساسیت آن با توجه به داده‌ها متفاوت است (جدول ۱). نتایج آماری نشان دهنده وجود تفاوت معنادار بین تیمارهای کنترل و عصاره‌های فعال بود (P<۰/۰۵).



شکل ۱: فعالیت ضدقارچی عصاره‌های بافت‌های مختلف *E. mathaei* در مقابل *C. albicans*.
حروف متفاوت لاتین نشان دهنده معنی‌دار بودن اثرات عصاره‌ها است.



شکل ۲: فعالیت ضدقارچی عصاره‌های بافت‌های مختلف *E. mathaei* در مقابل *C. glabrata*.
حروف متفاوت لاتین نشان دهنده معنی‌دار بودن اثرات عصاره‌ها است.

شکل ۳: فعالیت ضدقارچی عصاره‌های پوسته *E. mathaei* در مقابل *C. parapsiolosis*.
حروف متفاوت لاتین نشان دهنده معنی‌دار بودن اثرات عصاره‌ها است.

جدول ۱: قطر ممانعتی (mm) آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل سه سویه قارچی

	C. albicans	*C. glabrata*	*C. parapsilosis*
آنتی‌بیوتیک	**۳۰µg/disc**	**۳۰µg/disc**	**۳۰µg/disc**
نیستاتین	۱۴/۶۷±۰/۵۸	۱۶/۳۳±۰/۵۸	۱۱/۳۳±۰/۵۸
فلوکونازول	۱۶/۳۳±۰/۵۸	۸/۳۳±۰/۵۸	۱۱/۳۳±۰/۵۸
کتوکونازول	۱۱/۳۳±۰/۵۸	۹/۰۰±۰/۰۰	۱۵/۶۷±۰/۵۸

بحث

نتایج نشان دهنده وجود فعالیت ضدمیکروبی اغلب عصاره‌های تهیه شده از اجزای مختلف توتیای دریایی خلیج فارس در مقابل برخی از قارچ‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی بودند.

جانوران دریایی و محصولات طبیعی آن‌ها منبع وسیع و دردسترسی هستند که می‌توان از آن‌ها در جستجو برای یافتن ترکیباتی با فعالیت ضدمیکروبی، استفاده کرد. مطالعه بر روی اثرات ضدمیکروبی موجودات دریایی از جمله خارپوستان، در سال‌های اخیر و در کشورهای مختلف به فراوانی انجام شده است (Dabbagh, 2011). عصاره‌های مربوط به بخش‌دهانی توتیای‌دریایی *E.*

mathaei هیچگونه فعالیت ضدقارچی از خود نشان ندادند، اما بخش‌های گناد و پوسته و خار (تنها بر یک سویه اثر داشت) اثر مهاری بر رشد سویه‌های قارچی این مطالعه داشتند. عصاره‌های آبی تاثیر کم‌تری نسبت به عصاره‌های آلی در مهار رشد این میکروارگانیسم‌ها داشتند که این نیز می‌تواند به دلیل کم بودن ترکیبات فعال ضدباکتری با ماهیت پروتئینی و حساس به دما در این بافت‌ها باشد. در سال ۲۰۱۲ اثرات ضدمیکروبی بر روی اندام‌های مختلف توتیای دریایی *Tripneustes gratilla* از جمله گنادها، پوسته، خارها، بخش دهانی و بخش گوارشی انجام شد، نتایج مشابهی با آزمایش کنونی داشته است که طی آن فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌های متانولی گناد مشاهده شد (Abubakar et al., 2012). دلیل بالا بودن فعالیت ضدمیکروبی گناد توتیای دریایی خلیج فارس می‌تواند به نقش آن در انتقال فاکتورهای ایمنی به نسل بعد یعنی تخم برگردد. به نظر می‌رسد پوسته، اولین سد دفاعی شیمیایی بدن علیه پاتوژن‌ها در توتیای دریایی خلیج فارس باشد، از این رو، نقش ضدقارچی آن با توجه به نداشتن سیستم ایمنی اکتسابی در این جاندار دور از ذهن نیست. اگرچه در میزان قدرت مهاری بین عصاره‌های استخراج شده و آنتی‌بیوتیک‌های بکار رفته در این مطالعه تفاوت بسیار زیادی وجود داشت، 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 قرار داد. در مجموع، مطالعه حاضر اشاره بر این دارد که خارپوستان دریایی و از جمله آن‌ها توتیای دریایی، می‌توانند منابعی غنی برای کشف ضدقارچ‌های جدید باشند. اما از نقطه نظر داروسازی، ترکیباتی می‌توانند کاندایدی مناسب برای استفاده‌های دارویی باشند که هیچگونه اثرات جانبی نداشته باشند. بنابراین تخلیص ترکیبات فعال موجود در عصاره‌های خام حاضر و بررسی‌های بیش‌تر آن‌ها برای استفاده در علم داروسازی ضروری است.

منابع

میرهندی ه.، آدین ح.، شیدفر م.، کردبچه پ.، هاشمی ج.، موذنی م.، حسین‌پور ل. و مته‌کلایی ع. ۱۳۸۷. شناسایی گونه‌های بیماری‌زای جنس کاندیدا: روش PCR-FSP. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، شماره ۶۶، ص: ۶۴۵-۶۳۹.

یوسف‌پور م. ۱۳۹۱. فرآورده‌های فعال نرمتنان خلیج فارس. مجله علمی پژوهشی علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، ۴۲ص.

Abubakar L., Mwangi C., Uku J. and 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.

Austin B. 1988. Marine Microbiology. Cambridge University Press, New York, P: 229.

Bhakuni D.S. and Rawat D.S. 2005. Bioactive marine natural products. Springer. New York and Anamaya Publishers, New Delhi, P: 382.

Bryan P.J., McClintock J.B., Watts S.A., Marion K.R. and Hopkins T.S. 1994. Antimicrobial activity of ethanolic body-wall extracts of echinoderms from the northern Gulf of Mexico. In: David B., Guille A., Feral J.P. and Roux M. (Eds). Echinoderms Through Time. Balkema, Rotterdam, Pp: 17–23.

Cole A.M., Weis P. and 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.

Dabbagh A.R., Sedaghat M.R., Ramesh H. and 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.

De Vries D.J. and Hall M.R. 1994. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. Drug Development Research, 33: 161–173.

Findlay C. and Smith V.J. 1995. Antimicrobial factor in solitary ascidians. Fish and Shellfish Immunology, 5(8): 645–658.

Fusetani N. 1996. Bioactive substance from marine sponges. Journal of Toxicology Toxin Reviews, 15: 157–170.

Guerard F., Decourcelle N., Sabourin C., Floch-laizet C., Le Grel L., Le Floch P., Gourlay F., Le Delezir R., Jaouen P. and Bourseau P. 2011. Recent developments of marine ingredient for food and nutraceutical applications: A review. Journal des Sciences Halieutique et Aquatique, 2: 21–27.

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(2): 94–102.

Jensen P.R., Harvell C.D., Wirtz K. and Fenical W. 1996. Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. Marine Biology, 125: 411–419.

Li C., Haug T. and Stensvag K. 2010. Antimicrobial peptides in Echinoderms. International Society J, 7: 132–140.

Mokhlesi A., Saeidnia S., Gohari A.R., Shahverdi A.R., Nasrolahi A., Farahani F., Khoshnood R. and Eshaghi N. 2012. Biological Activities of the Sea Cucumber *Holothuria leucospilota*. Journal of Biological Sciences, 3(7): 243–249.

Price A.R.G. 1983. Echinoderms of Saudi Arabia. echinoderms of the gulf coast of Saudi Arabia. Fauna of Saudi Arabia, 5: 28–108.

Shamsuddin A.A., Lukman Hakim M.D. Kumari G.M. and 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.

Shankarlal S., Prabu K. and 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.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 2, No. 3, Autumn 2014

Antifungal effects of organic and aqueous extracts of the Persian Gulf sea urchin (*Echinometra mathaei*) against three strains of pathogenic fungi

Sima Rahi[1], Behrooz Heidari[2]*, Mehdi Rassa[3]
1-M.Sc. in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Guilan, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
3- M.Sc. in Microbiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

Received: August 2014 Accepted: October 2014

Abstract

In the present study, antifungal effects of different components extracts in the Persian Gulf sea urchin *Echinometra mathaei* were investigated. It was used from fungi including *Candida albicans, Candida glabrata and Candida parapsilosis* due to the pathogenicity and prevalence of them. The samples of sea urchin were collected from the coasts of the Persian Gulf, dissected, and extracted by phosphate buffered saline, ethanol and acetonitrile solvents. The antifungal activities of the extracts have been evaluated using the well diffusion method in two concentrations of 1500 and 600 µg/well. The antifungal activity of extracts was observed in the gonad and test as well as spin (against one of fungi strains). The extracts of oral segments did not show any antifungal effects. Considering to the results, the gonad and test of the sea urchin are suggested for purification of effective compounds be prioritized for future studies

Key words: *Sea Urchin, Persian Gulf,* Candida.

*Corresponding Author: bheidari@guilan.ac.ir