فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دوم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۳

ارزیابی عصاره‌های آلی و آبی استخراج شده از شکم‌پای خلیج فارس (*Plakobranchus ocellatus*: Gastropoda: Opisthobranchia) بر قارچ بیماری‌زای کاندیدا

لیلا یاوری[۱]، ایلیا اعتمادی دیلمی[۲]*

تاریخ دریافت: شهریور ۹۳ تاریخ پذیرش: دی ۹۳

چکیده

در مطالعه حاضر فعالیت ضدقارچی گونه *Plakobranchus ocellatus* جمع‌آوری شده از آب‌های جنوبی جزیره قشم در خلیج فارس بر سه قارچ *Candida albicans*، *C. parapsilosis* و *C. glabrata* که از قارچ‌های بیماری‌زای انسانی با خطرآفرینی زیاد هستند، مورد بررسی قرار گرفته است. عصاره‌ها با استفاده از سه حلال با پایه‌های آلی و آبی (استونیتریل، اتانول و بافرفسفات) استخراج شده، در هفت غلظت جداسازی و توسط DMSO و آب مقطر استریل، رقیق شده و با روش Well Diffusion اثر داده شدند. بیش‌ترین و کم‌ترین قطر ممانعتی به ترتیب مربوط به عصاره استونیتریل بر قارچ *C. parapsilosis* و عصاره بافرفسفات بر قارچ *C. albicans* با غلظت ۲۰۰۰µg/mL بود. بیش‌ترین اثر عصاره‌ها بر قارچ‌ها در غلظت‌های ۶۰۰، ۹۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰µg/mL مشاهده شد. عصاره آبی در مقایسه با عصاره‌های آلی تاثیر کم‌تری داشت که می‌تواند نشانی از کم بودن میزان ترکیبات فعال ضدقارچی با ماهیت پروتئینی و حساس به دما در عصاره‌ها باشد. در مجموع، می‌توان بیان کرد که جهت دستیابی به ترکیبات زیست‌فعال در عصاره‌هایی با قطر بیش‌تر ممانعتی، تخلیص و استخراج متابولیت‌های ثانویه ضروری است.

واژگان کلیدی: *ضدقارچ*، Plakobranchus ocellatus، Candida، *خلیج فارس*.

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت
۲- کارشناس ارشد زیست شناسی دریا، گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران
* نویسنده مسئول: eelia.e.d.c@gmail.com

مقدمه

در محیط زیست دریایی، جانوران استراتژی‌های منحصر به فردی را برای حفاظت از خود نشان می‌دهند. این رفتارها از استتار کامل در هشت‌پاها تا بادکردن بدن در بادکنک‌ماهیان متفاوت است. برخی از شکم‌پایان صدف‌های سختی به عنوان اصلی‌ترین لایه دفاعی دارند و برخی بدون صدف هستند که در این صورت دفاع شیمیایی خود را تقویت کرده‌اند.

پشت‌آبششیان از جمله خرگوش‌های دریایی و تنبل‌های دریایی به راسته پشت آبششیان[1] و زیررده شکم‌پایان[2] تعلق دارند و از نرمتنانی هستند که توجه بسیاری از پژوهشگران را به ساز و کارهای دفاع شیمیایی خود علاقمند کرده‌اند (Kamiya et al., 2006). این موجودات نرمتنانی کوچک با حرکتی آرام هستند که از طیف وسیعی از جلبک‌ها و اسفنج‌ها تغذیه می‌کنند. اثبات شده است آن دسته از پشت‌آبششیان دریایی که توسط مهاجمان و شکارچیان مورد تعرض قرار نمی‌گیرند، دارای توانایی دفاع از خود توسط مواد شیمیایی هستند. ویژگی سمی بودن این موجودات از گذشته‌های دور توسط دانشمندان روم باستان کشف شده بود. تنبل‌ها و خرگوش‌های دریایی به عنوان منبعی غنی از مواد زیست‌فعال شناخته شده‌اند، که این مواد عموماً از ساختارهای ساده و برگرفته شده از رژیم غذایی آن‌ها و یا تولید شده توسط همزیست‌های آن‌ها، به دست می‌آید (Harrigan and Goetz, 2002). پشت‌آبششیان دریایی از نرمتنانی هستند که صدف در آن‌ها بسیار کوچک شده و در برخی نیز به طور کامل از بین رفته است. همان گونه که از اسم پشت‌آبششیان برمی‌آید، در این جانوران بر عکس بقیه حلزون‌های دریایی که آبشش و مخرج آن‌ها در بالا قرار دارد، آبشش در ناحیهٔ پشت قرار گرفته است (Fox, 2001). بیش‌تر نرمتنان پشت‌آبششی که پوشش سخت صدفی ندارند و دارای مکانیسم‌های دفاع شیمیایی هستند، مواد شیمیایی دفاعی خود را از طریق تولیدات طبیعی و متابولیت‌ها به دست می‌آورند (Pawlik et al., 1988; Rajaganapathi et al., 2001; Vennila et al., 2011; Bano and Ayub, 2012). مطالعات زیادی بر روی تاثیر ترکیبات زیست‌فعال به دست آمده از این مواد شیمیایی

1- Opisthobranchia
2- Gastropoda

در برابر عوامل بیماری‌زای انسانی از جمله عفونت‌های باکتریایی و قارچی، تومورها، آلزایمر و سرطان انجام شده است (Kisugi et al., 1987; Zandi et al., 2007; Farrokhnia et al., 2012).

قارچ کاندیدا به عنوان یک همزیست فرصت‌طلب، از اصلی‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های جدی از جمله کاندیدیازیس واژینال که می‌تواند سبب بیماری در ٪۷۵ از بانوان در طول عمرشان بشود، مطرح است (Sharanappa and Vidyasagar, 2013). این قارچ همچنین می‌تواند احتمال بروز عفونت‌های پوستی، واژنیت و عفونت‌های سیستمیک دستگاه گوارش را به دلیل استفاده بیش از حد و غیرمنطقی از داروهای آنتی‌بیوتیک، عمل‌های جراحی طولانی مدت، زیاد شدن بیماری‌های با نقص سیستم ایمنی در دهه‌های اخیر، افزایش دهد (Molero et al., 1998). قارچ‌های فرصت‌طلب از جمله *Candiad albicans* به عنوان یکی از فراوان‌ترین گونه‌های جدا شده از عفونت‌های دهانی (Kantarcioglu and Yucel, 2002) و سایر گونه‌های کاندیدا با تاثیر مستقیم می‌توانند در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی (از جمله ایدز، سرطان و پیوند گیرندگان اندام‌های مختلف) باعث بروز عفونت‌های سیستمیک شوند. گونه‌های کاندیدا همچنین به عنوان چهارمین عامل عفونت‌های خونی در بیماران بستری در بیمارستان شناخته شده‌اند و مسئول مرگ بیش از ٪۴۰ از آن‌ها هستند (Anaissie et al., 2003).

با وجود مطالعات زیادی که درباره ساکوگلوسان‌ها انجام شده است (Evertsen et al., 2007; Handeler et al., 2009; Shenai-Tirodkar et al., 2012)، مطالعه بر روی تولیدات طبیعی و ترکیبات زیست‌فعال گونه *Plakobranchus ocellatus* بسیار اندک بوده، تقریباً هیچ مطالعه‌ای بر روی ویژگی‌های ضدقارچی این گونه صورت نپذیرفته است. در مطالعه حاضر، برای اولین بار تاثیرات چند عصاره زیست‌فعال استخراج شده از *P. ocellatus* علیه سه گونه قارچ *C. albicans*، *C. parapsilosis* و *C. glabrata* مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های *P. ocellatus* از آب‌های جنوبی جزیره قشم در خلیج فارس (۲۶°۹۰'N و ۵۶°۱۶'E) با غواصی در آب‌های ۵ الی ۱۵

متری در سال ۱۳۹۳ انتخاب و صید شدند. تمام نمونه‌ها اندازه‌ای در حدود ۲ تا ۳ سانتی‌متر داشتند (شکل ۱). نمونه‌ها به دقت و با دست از محیط برداشت شدند و پس از آب‌کشی با آب دریا در محل، به سرعت به تانک نیتروژن مایع منتقل شدند. پس از انتقال به آزمایشگاه، نمونه‌ها در شرایط دمایی ۷۰- درجه نگهداری شدند.

شکل ۱: نمونه *Plakobranchus ocellatus* (مقیاس ۱ سانتی‌متر).

استخراج ترکیبات زیست‌فعال

به دلیل تفاوت‌های موجود در ساختارهای شیمیایی در گونه‌های متنوع، روش مشخص و واحدی برای عصاره‌گیری از جانوران وجود ندارد. در این مطالعه پس از آزمایش چند روش قبلی جهت عصاره‌گیری (Tsukamoto et al., 2005; Bano and Ayub, 2012)، انجام تست‌های مختلف و اعمال شرایط زمانی و دمایی متفاوت، بهترین روش استخراج که پاسخ دهی بهتری به شرایط طراحی شده در این مطالعه داشت، به دست آمد.

عصاره‌ها توسط حلال‌های آلی استونیتریل[1] ۸۰٪ و اتانول[2] ۱۰۰٪ برای ترکیبات غیرپروتئینی همچون ترکیبات قطبی و غیرقطبی و حلال آبی سدیم بافر فسفات[3] برای ترکیبات پروتئینی استفاده شد. جهت استخراج ترکیبات دارای پروتئین خنثی از سدیم بافرفسفات با میزان اسیدیته ۷/۲ استفاده شد.

در مطالعه حاضر کل توده بدنی گونه *P. ocellatus* مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا

1- C_2H_3N
2- C_2H_5OH
3- $NaH_2PO_4.2H_2O$; NaOH

میزان مشخصی از نمونه (۳ گرم از بافت) با دستگاه هموژنایزر (۱۲۷۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۲ دقیقه هموژن، ۳۰ ثانیه توقف و مجدداً با ۱۹۷۰۰ دور در دقیقه هموژن شدند. ترکیب هموژن شده وزن شد و با نسبت ۵ به ۱، حلال آلی یا آبی مورد نظر اضافه و به مدت ۲ دقیقه با ۵۸۰۰ دور در دقیقه هموژن شد. مراحل استخراج عصاره‌های آبی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن، عصاره‌های آلی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با ۹۰ دور در دقیقه و عصاره آبی به مدت دو ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۹۰ دور در دقیقه، شیک[1] شدند. پس از اتمام فرآیند شیک شدن، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز بالایی آن‌ها جدا و باقیمانده وزن شد و دو برابر وزن آن حلال مورد نظر اضافه شد. سانتریفیوژ با شرایط قبل دوباره انجام شد. فاز بالایی مجدداً جدا شد و در نهایت، مجموع ترکیب به دست آمده از فرآیند سانتریفیوژ به مدت ۱۸ ساعت فریز درای شد.

ارزیابی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های *P. ocellatus*

فعالیت ضدقارچی عصاره‌های خام *P. ocellatus* با استفاده از روش انتشار چاهکی[2] بر محیط کشت سابورود دکستروز آگار علیه قارچ‌های *Candida albicans* (PTCC: 5027 ATCC 10231)، *C. parapsilosis* (PTCC: 5297 DSM 11226) و *C. glabrata* (IBRC-M: 30005) مورد بررسی قرار گرفت.

تمام گونه‌های کاندیدا پس از تخلیه از آمپول‌های لیوفیلیزه به محیط کشت سابورود دکستروز آگار و پس از رقیق‌سازی با نیم میلی لیتر آب مقطر استریل با روش کشت خطی، کشت داده شدند. تمام مراحل در شرایط استریل انجام گرفت. کلونی‌های هر قارچ در محیط کشت سابورود دکستروز آگار به صورت جداگانه در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت شدند. بعد از دو بار انجام پاساژ قارچ‌ها، محتویات پلیت‌ها با یک میلی لیتر آب مقطر به خوبی مخلوط شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از هر مخلوط به یک محیط کشت سابورود دکستروز آگار جدید اضافه شد. پلیت‌ها به خوبی تکان داده شدند تا زمانی که مایع بر روی محیط کشت تا حدودی خشک شود. پس از آن،

1- Shake

2- Well Diffusion

تعدادی چاهک توسط بورر استریل به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت جهت اثردهی عصاره‌های ضدقارچی ایجاد شد.

به منظور دستیابی به طیف موثر غلظت‌های عصاره‌های نمونه، هفت غلظت ۳۰۰، ۶۰۰، ۹۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۳۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها طراحی و طبقه‌بندی شد. عصاره‌های آلی در ۳۰ میکرولیتر از حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و عصاره‌های آبی در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل، حل شدند. تمام عصاره‌ها به چاهک‌ها افزوده شدند و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت اثردهی بر قارچ‌های کشت داده شده انجام شد.

تیمار کنترل

سه داروی آنتی‌بیوتیک رایج در درمان عفونت‌های قارچی کتوکونازول، فلوکونازول و نیستاتین هر کدام به میزان ۳۰ میکروگرم بر لیتر به منظور استفاده برای کنترل مثبت و حلال دی‌متیل‌سولفوکساید و آب مقطر استریل به منظور کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج که دربرگیرنده قطر ممانعتی ایجاد شده در فعالیت ضدقارچی بودند به صورت میانگین± انحراف از معیار بیان شدند. پس از انجام تست نرمالیته کولموگروف- اسمیرونف، برای تحلیل داده‌ها از تست آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16.0 تحت ویندوز با سطح شباهت ۹۵٪ ($P<۰/۰۵$)، استفاده شد.

نتایج

اثردهی عصاره‌های استخراج شده از گونه *P. ocellatus* در غلظت‌های تعیین شده، واکنش و فعالیت ضدقارچی را در اکثر غلظت‌ها به همراه داشت. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان پاسخ دهی به تست عصاره‌های اثر داده شده مربوط به دو عصاره استونیتریلی و بافرفسفاتی بود که در پاسخ به دو قارچ *C. albicans* و *C. parapsilosis* به ثبت رسید (جدول ۱).

عصاره‌های با غلظت ۶۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰µg/mL علیه قارچ *C. albicans* و *C. parapsilosis* و عصاره‌های با غلظت ۹۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰µg/mL برای قارچ *C. glabrata* بیش‌ترین پاسخ را در این مطالعه

نشان دادند (شکل ۲) و بین غلظت‌های ذکر شده اختلاف معنادار مشاهده شد (P<۰/۰۵).

نتایج مربوط به آزمایش فعالیت ضدقارچی علیه قارچ *C. albicans* نشان داد که فعالیت ضدقارچی در تمام عصاره‌های آلی و آبی علیه این قارچ دیده می‌شود. البته برای تمام غلظت‌ها قابل تعمیم نبود.

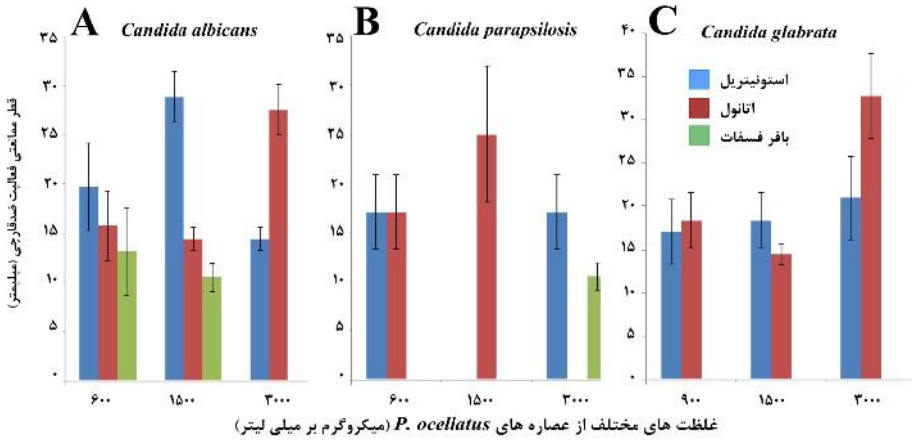
قارچ *C. parapsilosis* تقریباً در مقابل تمام غلظت‌های عصاره سدیم بافرفسفاتی مقاومت نشان داد، به غیر از غلظت ۳۰۰۰µg/mL که کم‌ترین میزان قطر ممانعتی ایجاد شده در مقابل این قارچ بود (جدول ۱).

قارچ *C. glabrata* مقاوم‌ترین قارچ در بین سه قارچ مورد مطالعه بود. عصاره اتانولی ضعیف‌ترین ترکیب با تنها یک اثر در غلظت ۲۵۰۰µg/mL بود و کم‌ترین میزان فعالیت ضدقارچی را علیه *C. glabrata* داشت (جدول ۱).

جدول ۱: قطر ممانعتی ایجاد شده (میلی‌متر) در اثر فعالیت ضدقارچی عصاره‌های استخراج شده از *P. ocellatus* (میانگین ± انحراف معیار).

غلظت عصاره‌ها (µg/mL)	۳۰۰	۶۰۰	۹۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۵۰۰	۳۰۰۰
C. albicans							
استونیتریل	۳۰/۱۸±۸/۴۹	۱۹/۶۸±۴/۴۲	-	۲۸/۸۷±۲/۶۱	۲۴/۹۳±۶/۹۶	۱۵/۷۵±۳/۴۶	۱۴/۴۳±۱/۱۶
اتانول	-	۱۵/۷۵±۳/۴۶	-	۱۴/۴۳±۱/۱۶	-	-	۲۷/۵۶±۲/۵۷
بافرفسفات	-	۱۳/۱۲±۴/۳۹	-	۱۰/۵±۱/۴۰	۹/۱۸±۲/۲۴*	-	-
C. parapsilosis							
استونیتریل	-	۱۷/۰۶±۳/۷۴	-	-	۳۵/۱۲±۵/۷۶**	۱۴/۴۳±۱/۱۶	۱۷/۰۶±۳/۷۴
اتانول	۳۱/۵±۵/۴۳	۱۷/۰۶±۳/۷۴	۲۶/۲۵±۲/۷۲	۲۴/۹۳±۶/۹۶	-	-	-
بافرفسفات	-	-	-	-	-	-	۱۰/۵±۱/۴۰
C. glabrata							
استونیتریل	۳۴/۱۲±۴/۹۳	-	۱۷/۰۶±۳/۷۴	۱۸/۳۷±۳/۱۷	-	-	۲۱/۰۰±۴/۷۹
اتانول	-	-	-	-	-	۱۴/۴۳±۱/۱۶	-
بافرفسفات	-	-	۱۸/۳۷±۳/۱۷	۱۴/۴۳±۱/۱۶	-	۱۷/۰۶±۳/۷۴	۳۲/۸۱±۴/۹۳

– : بدون فعالیت ضدقارچی؛ *: کم‌ترین؛ **: بیش‌ترین.



شکل ۲: تفاوت بین فعالیت‌های ضدقارچی در غلظت‌های پرتکرار علیه قارچ‌های کاندیدا.

عصاره‌های استونیتریلی قوی‌ترین فعالیت‌های ضدقارچی را علیه هر سه قارچ به ترتیب با قطرهای ۳۰/۱۸ میلی‌متر برای قارچ *C. albicans*، ۳۵/۱۲ میلی‌متر برای قارچ *C. parapsilosis* و ۳۴/۱۲ میلی‌متر برای قارچ *C. glabrata* داشتند. از بین تست‌های مثبت نیز نیستاتین و فلوکونازول قوی‌ترین فعالیت ضدقارچی را در مقابل *C. glabrata* و *C. albicans* با قطر ۱۶/۳۳ میلی‌متر داشتند (جدول ۲).

جدول ۲: قطر ممانعتی ایجاد شده در اثر فعالیت ضدقارچی تست‌های مثبت در مواجهه با قارچ‌های کاندیدا (میانگین ± انحراف معیار)

	سویه‌های قارچی		
تست مثبت*	*C. albicans*	*C. parapsilosis*	*C. glabrata*
نیستاتین	۱۴/۶۷±۰/۳۴	۱۱/۳۱±۰/۱۲	۱۶/۳۳±۱/۵۴
فلوکونازول	۱۶/۲۳±۰/۱۴	۱۱/۳۳±۰/۵۵	۸/۳۳±۰/۴۳
کتوکونازول	۱۱/۳۳±۰/۷۶	۱۵/۶۷±۰/۵۸	۹/۰۰±۰۰/۰

غلظت تست‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده: ۳۰µl/mL

بحث

رابطه مستقیمی بین افزایش بیماری‌های نقص سیستم ایمنی و افزایش عفونت‌های قارچی در دهه‌های اخیر پیدا شده است. همچنین رشد قابل لمسی در علاقه دانشمندان به استخراج ترکیبات طبیعی و متابولیت‌های ثانویه از موجودات دریایی احساس می‌شود (Periyasamy et al., 2012). خرگوش‌ها و راب‌های دریایی[1] از جمله جانوران دریایی هستند که جهت استخراج ترکیبات زیست‌فعال بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Williams et al., 1986; Sadhasivam et al., 2013; Ramya et al., 2014). بیش‌تر این جانوران فاقد پوشش سخت و صدفی هستند و توانایی فرار سریع از دست شکارچیان را ندارند، حرکت آن‌ها بسیار آرام است، اما جهت جبران این نقایص مجهز به مکانسیم دفاع شیمیایی هستند.

در این مطالعه برای اولین بار پتانسیل ضدقارچی در ترکیبات استخراج شده از *P. ocellatus* به عنوان یک پشت‌آبششی که از آب‌های خلیج فارس صید شده، مورد بررسی قرار گرفت. حلال‌های استونیتریلی، اتانولی و سدیم بافرفسفاتی به عنوان حلال‌های آلی و آبی برای استخراج ترکیبات زیست‌فعال و آزمایش آن‌ها در مقابل قارچ‌های بیماری‌زای *Candida* مورد استفاده قرار گرفتند. فعالیت ضدقارچی در هر سه نوع عصاره با مقادیر متفاوت به ثبت رسید. به طور واضحی مشخص شد که عصاره‌های آلی و آبی استخراج شده از *P. ocellatus* فعالیت ضدقارچی قابل ذکری را علیه *C. albicans* داشتند. درباره دو قارچ دیگر، عصاره‌های اتانولی در مقابل قارچ *C. parapsilosis* عملکرد بهتری داشت در حالی که در مقابل قارچ *C. glabrata* ضعیف‌ترین عصاره بودند. در مقابل، عصاره‌های استخراج شده توسط سدیم بافرفسفات در مقابل قارچ *C. parapsilosis* ضعیف‌ترین بودند ولی در مقابل قارچ *C. glabrata* عملکرد بهتری را نشان دادند (جدول ۱). بیش‌ترین و کم‌ترین قطر ممانعتی ایجاد شده توسط عصاره استونیتریلی در مقابل قارچ *C. parapsilosis* و عصاره بافرفسفاتی در مقابل قارچ *C. albicans* هر دو در غلظت ۲۰۰۰µg/mL به ثبت رسید.

با مقایسه غلظت‌های دارای تعداد پاسخ بیش‌تر، مشخص شد عصاره‌های اتانولی و استونیتریلی در برابر هر سه قارچ در این غلظت‌ها پاسخ نشان داده در حالی که عصاره

1- Sea Slug

بافرفسفاتی در مقابل قارچ‌های *C. parapsilosis* و *C. glabrata* تقریباً بی اثر بود (شکل ۲). فعالیت ضدقارچی در گونه *Elysia grandifolia* در مقابل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که این گونه دارای فعالیت ضدقارچی خوبی با ایجاد قطر ممانعتی ۱۶ الی ۲۴ میلی‌متر است (Ashour et al., 2006). در مطالعه حاضر فعالیت ضد قارچی بهتر و قدرتمندتری با قطرهای ۱۸/۳۰، ۳۵/۱۲ و ۳۴/۱۲ میلی‌متر که متعلق به عصاره‌های استونیتریلی گونه *P. ocellatus* بود به ثبت رسید (جدول ۱). در حالی که بیش‌ترین فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های اثر داده شده بر قارچ‌های هدف در مطالعه حاضر ۱۶/۶۷ میلی‌متر برای فلوکونازول و کتوکونازول در مقابل قارچ‌های *C. albicans* و *C. parapsilosis* و ۱۶/۳۳ میلی‌متر برای نیستاتین در مقابل قارچ *C. glabrata* بود (جدول ۲). قارچ *C. glabrata* به عنوان مقاوم‌ترین قارچ نسبت به عصاره‌های استخراج شده از *P. ocellatus* و داروهای آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در این مطالعه شناخته شد. *C. glabrata* نسبت به داروهای ضدقارچی آزولی مقاوم بود و این مقاومت را در طول درمان نیز نشان می‌دهد (Silva et al., 2012). علاوه بر این، با توجه به حضور فاکتور دما در روند عصاره‌گیری، تا حد زیادی احتمال حضور برخی ترکیبات موثر، در هر کدام از عصاره‌ها بیش‌تر می‌شود. در عصاره‌های فعال بافرفسفاتی به دلیل ثابت نگه داشتن دما در ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط بافری، احتمال حضور ترکیبات پروتئینی فعال بیش‌تر شد اما در عصاره‌های آلی با بالا بردن دما تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد، 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. با این کار می‌توان احتمال حضور ترکیبات زیست‌فعال متنوع را با پایه‌های آلی و آبی افزایش داد. در نتیجه اثربخشی آن‌ها بر عوامل بیماری‌زا در شرایط مختلف، بیش‌تر می‌شود.

فعالیت ضدقارچی در مقابل قارچ‌های کاندیدا در مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌های استخراج شده از *P. ocellatus* به ویژه عصاره‌های استونیتریلی می‌توانند به عنوان پتانسیل برای مطالعات بیش‌تر در آینده جهت تولید ترکیبات ضدقارچی علیه عفونت‌های قارچی معرفی شود. این یافته بسیار قابل

ملاحضه است و به عنوان پایه‌ای برای مطالعات بیش‌تر برای تشخیص داروهای جدید علیه این عوامل بیماری‌زا نقش ایفا می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تلاش و کمک آقایان دکتر رنجبر و مهندس غواصی در طول نمونه‌برداری در جزیره قشم و همچنین آقای مهندس رسا و سرکارخانم مهندس قدیری که در طول فرآیند آزمایشگاهی زحمات شایانی را متحمل شدند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Anaissie E.J., Ginnis M.C. and Pfaller M.A. 2003. Clinical Mycology. United Kingdom. 196P.

Ashour M., Edrada R., Ebel R., Wray V., Watjen W., Padmakumar K., Muller W.E.G., Lin A.H. and Proksch P. 2006. Kahalalide Derivatives from the Indian sacoglossan mollusk *Elysia grandifolia*. Journal of Natural Products, 69(11): 1547–1553.

Bano A. and Ayub Z. 2012. Antibacterial and antifungal activity in three species of *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata) collected from rocky ledge of Mubarak Village, Karachi. Pakistan Journal of Zoology, 44(6): 1493–1497.

Evertsen J., Burghardt I., Johnsen G. and Wagele H. 2007. Retention of functional chloroplasts in some sacoglossans from the Indo-Pacific and Mediterranean. Marine Biology, 151: 2159–2166.

Farrokhnia M., Nabipour I. and Bargahi A. 2012. A theoretical study of dactylyne stereoisomers: A marine natural product from *Aplysia dactylomela*. Journal of Theoretical and Computational Chemistry, 11(4): 833–853.

Fox R. 2006. Invertebrate anatomy online, *Aplysia brasiliana* sea hare, Lander University. Retrieved July 3, 2006, from http://www.lander.edu/rsfox/310aplysiaLab.html.

Handeler K., Grzymbowski Y.P., Krug P.J. and Wagele H. 2009. Functional chloroplasts in metazoan cells- a unique evolutionary strategy in animal life. Frontiers in Zoology, 6(28): 1–18.

Harrigan G.G. and Goetz G. 2002. Symbiotic and dietary marine microalgae as a source of bioactive molecules-experience from natural products research. Journal of Applied Phycology, 14(2): 103–108.

Kamiya H., Sakai R. and Jimbo M. 2006. Bioactive molecules from sea hares. Progress in Molecular and Subcellular Biology, 43: 215–239.

Kantarcioglu A.S. and Yucel A. 2002. The presence of fluconazole-resistant *Candida dubliniensis* strain among *Candida albicans* isolated from immunocompromised or otherwise debilitated HIV negative Turkish patients. Revista Iberoamercana Mycologia, 19: 44–48

Kisugi J., Kamiya H. and Yamazaki M. 1987. Purification

and characterization of Aplysianin E, an antitumor factor from sea hare eggs. Cancer Research, 47: 5649–5653.

Molero G., Diez-Orejas R., Navarro-Garcia F., Monteoliva L., Pla J., Gil C., Sanchez-Perez M. and Nombela C. 1998. *Candida albicans*: genetics, dimorphism and pathogenicity. International Microbiology, 1: 95–106.

Pawlik J.R., Kernan M.R., Molinski T.F., Harper M.K. and Faulkner D.J. 1988. Defensive chemicals of the Spanish dancer nudibranch *Hexabranchus sanguineus* and its egg ribbons: Macrolides derived from a sponge diet. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 119: 99–109.

Periyasamy N., Srinivasan M. and Balakrishnan S. 2012. Antimicrobial activities of the tissue extracts of *Babylonia spirata* Linnaeus, 1758 (Mollusca: Gastropoda) from Thanzhanguda, southeast coast of India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(1): 36–40.

Rajaganapathi J., Rajagopal K. and Edward J.K.P. 2001. Antifungal and cytotoxic effects of methanol extracts of three marine mollusks. Indian Journal of Experimental Biology, 39: 85–86.

Ramya M.S., Ravichandran S. and Anbuchezhian R. 2014. In vitro antioxidant properties of marine Sea Slug *Armina babai* from Pazhayaar, southeast coast of India. International Journal of Natural Products Research, 4(4): 105–109.

Sadhasivam G., Muthuvel A., Vitthal W.M., Pachaiyappan A., Kumar M. and Thangavel B. 2013. In vitro antibacterial, alpha-amylase inhibition potential of three nudibranchs extracts from south east coast of India. Journal of Coastal Life Medicine, 1(3): 186–192.

Sharanappa R. and Vidyasagar G.M. 2013. Anti-Candida activity of medicinal plants. Areview. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(4): 9–16.

Shenai-Tirodkar P., Desai N.M. and Jagtar T.G. 2012. Ecological observations and GC-MS analysis of methanolic extract of sacoglossan *Elysia bangtawaensis* (Swennen). An International Quarterly Journal of Life Sciences, 7(3): 457–461.

Silva S., Negri M., Henriques M., Oliviera R., Williams D.W. and Azeredo J. 2011. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance Federation of

European Microbiological Societies. FEMS Microbiology Reviews, 36(2): 288–305.

Tsukamoto S., Yamashita Y. and Otha T. 2005. New cytotoxinc and antibacterial compounds isolated from the sea hare, *Aplysia krodai*. Marine Drugs, 3(2): 22–28.

Vennila R., Rajesh Kumar R.K., Kanchana S., Arumugam M. and Balasubramanian T. 2011. Investigation of antimicrobial and plasma coagulation property of some molluscan ink extracts: Gastropods and cephalopods. African Journal of Biochemistry Research, 5(1): 14–21.

Williams D.E., Ayer S.W. and Andersen R.I. 1986. Diaulusterols A and B from the skin extracts of the dorid nudibranch *Diaulula sandiegensis*. Canadian Journal of Chemistry, 64: 1527–1529.

Zandi K., Farsangi M.H., Nabipour I., Soleimani M., Khajeh K.H., Hassan Sajedi R. and Jafari S.M. 2007. Isolation of a 60 kDa protein with in vitro anticancer activity against human cancer cell lines from the purple fluid of the Persian Gulf sea hare, *Aplysia dactylomela*. African Journal of Biotechnology, 6(11): 1280–1283.

Aquatic Physiologyand Biotechnology

Vol. 2, No. 4, Winter 2015

Evaluation the organic and aqueous compounds extracted from the Persian Gulf gatsrpod (*Plakobranchus ocellatus*: Gastropoda: Opisthobranchia) against infectious *Candida*

Leila Yavari[1], Eelia Etemadi-Deylami[2]*

Received: September 2014 Accepted: January 2015

Abstract

In the present study, antifungal activity of *Plakobranchus ocellatus* collected from the southern waters of Qeshm Island in the Persian Gulf against *Candida albicans*. *C. parapsilosis* and *C. glabrata*, has been investigated. Acetonitrile, ethanol and phosphated buffer saline (PBS) as organic and aqueous extracts were prepared from the whole body tissue. The effects of seven concentrations of the extracts were tested through well-diffusion method. Maximum and minimum inhibition zones were estimated for acetonitrile and PBS extracts both in 2000 concentration (µg/ml) against *C. parapsilosis* and *C. albicans*, respectively. The most effects of extracted compounds were seen in 600, 900, 2000 and 3000 (µg/ml) concentrations. The aqaous extract compared with organic extract had a low effect that can be indicating a little amount of antifungal compounds with nature of protein and temperature-sensitive. In conclusion, it could be said to obtain the bioactive compounds in extracts with more inhibition diameter purification and extraction of secondary metabolites is necessary.

Key words: *Antifungal*, Plakobranchus ocellatus, Candida, *Persian Gulf.*

1- Ph.D. Student in Marine Biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran.

2- M.Sc. in Marine Biology, Department of Medical Mycology, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: eelia.e.d.c@gmail.com