



بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Echinometra mathaei*

حامد عبدالله اصلیان*، احسان کامرانی، مرتضی یوسف زادی، موسی کشاورز

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی و جوی، دانشگاه هرمزگان

چکیده

نوع مقاله:

مقاله کوتاه

در این مطالعه اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی بررسی شد. اندامهای مختلف توتیای دریایی شامل خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو به طور جداگانه با استفاده از حلال‌های آن-هگزان، اتیل استات و متانول عصاره‌گیری و اثر آنها بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی شامل *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus aureus faecalis*، *Vibri*، *Shigella flexneri*، *Staphylococcus aureus faecalis* به دو روش انتشار دیسک و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) بررسی گردید. نتایج نشان داد اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد مطالعه و همچنین عصاره اندام‌های مختلف از نظر اثر ضد باکتریایی دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p < 0.05$). همچنین بیشترین اثر ضدباکتریایی مربوط به عصاره اتیل استاتی پوسته بود.

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۳/۰۳/۲۴

اصلاح: ۹۴/۰۶/۲۰

پذیرش: ۹۴/۰۶/۲۵

کلمات کلیدی:

انتشار دیسک

توتیای دریایی

MIC

مقدمه

به دلیل تکامل مداوم میکروب‌های بیماری‌زا و مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و مؤثر ضد میکروبی وجود داشته است. ارگان‌سیم‌های دریایی منبعی بسیار عالی برای ترکیبات فعال زیستی هستند و تاکنون فعالیت ضد میکروبی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Haug *et al.*, 2002). علاوه بر این، انواع مختلفی از فاکتورهای ضد میکروبی از جمله گلیکوزید استروئیدال (Andersson *et al.*, 1989)، استرول‌های پلی‌هیدروکسی‌لات (Lorizzi *et al.*, 1995)، رنگدانه فانتوکونون (Service and Wardlaw, 1984)، لیزوزوم‌ها (Canicatti and Roch, 1989)، پپتیدهای ضد میکروبی (Beauregard *et al.*, 2001) از خارپوستان جدا شده‌اند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که خارپوستان دریایی منبعی بالقوه از آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای توسعه دارویی هستند. بررسی‌ها نشان می‌دهد تفاوت گسترده‌ای در فعالیت ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از ارگان‌های متفاوت و همچنین میان گونه‌های مختلف خارپوستان وجود دارد (Haug *et al.*, 2002).

با توجه به اینکه مطالعه بر روی خارپوستان و اثرات ضدباکتریایی آنها در خلیج فارس و دریای عمان بسیار کم صورت گرفته، امید است این تحقیق بر روی توتیای دریایی *Echinometra mathaei* راه را برای مطالعات بیشتر در این زمینه هموارتر کند.

مواد و روش‌ها

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: hamed.aslian@yahoo.com

نمونه‌های توتیای دریایی از ساحل جزیره ابوموسی (پلاژ ساحلی) در آذر ماه سال ۱۳۹۱ جمع آوری و به صورت زنده به آزمایشگاه منتقل گردید. ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن جدا شود، سپس قسمت‌های خار، پوسته، گناد و فانوس ارسطو به دقت جدا و هرکدام از اندام‌ها به طور جداگانه در ظروف استریل قرار گرفت و برای انجام مراحل بعدی شامل فریز درایر و عصاره‌گیری در فریزر قرار گرفتند و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند (Haug et al., 2002; Mohammadzade et al., 2013).

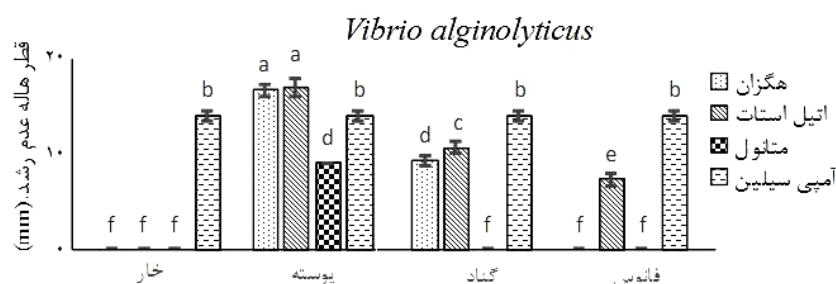
عصاره‌گیری با استفاده از حلال‌های آلی n- هگزان، اتیل استات و متانول و به ترتیب افزایش قطبیت انجام گرفت (Ismail et al., 2008). عصاره به دست آمده را با کمک دستگاه روتاری تغلیظ نموده تا حلال آن جدا گردید (Mohammadzadeh et al., 2013). سه نوع عصاره به دست آمده از هر اندام پس از خشک کردن و توزین، برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

در مدت ۱۵ دقیقه از زمان تنظیم کدورت سوسپانسیون باکتری با استاندارد ۰/۵ مک فارلند عمل تلقیح باکتری به محیط کشت انجام شد. عصاره تزریقی بر روی دیسک، حاوی ۲۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر عصاره بود. (امیری و همکاران، ۱۳۹۰). به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی و مقایسه نتایج آنها از آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین به عنوان کنترل مثبت در این پژوهش استفاده گردید. در نهایت نتایج آزمون انتشار دیسک با نتایج آنتی بیوتیک کنترل مقایسه شدند. در این پژوهش جهت تعیین حداقل غلظت بازدارنده از روش رقت‌های متوالی در لوله آزمایش برای عصاره‌های توتیا در دامنه بین ۲۰/۲۵- میلی گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد. برای تهیه عصاره طوری عمل شد که غلظت عصاره ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر بود (Yousefzadi et al., 2013).

برای ترسیم نمودار از نرم افزار Excell 2013 استفاده گردید و تجزیه و تحلیل داده های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 19 انجام شد. بررسی اختلاف معنی داری بین اندام‌های مختلف توتیای دریایی توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One Way Anova) انجام گرفت و مقایسه داده‌ها در سطح معنی داری ($P < 0/05$) بررسی شد.

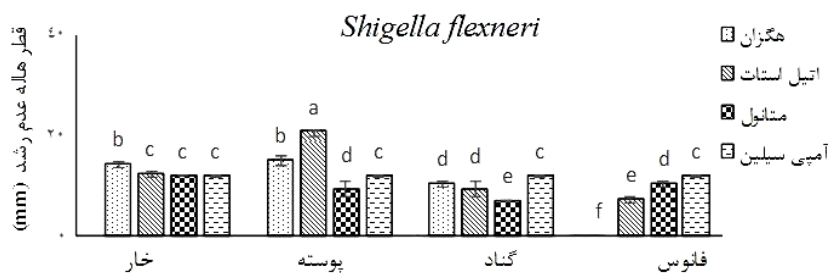
نتایج

عصاره اتیل استاتی پوسته استخراج شده از توتیای *Echinometra mathaei* بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر باکتری گرم منفی *Vibrio alginolyticus* نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. عصاره‌های اتیل استات و هگزانی پوسته، اثر ضد باکتریایی بیشتری را نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نشان دادند. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد ($P < 0/05$) (شکل ۱).



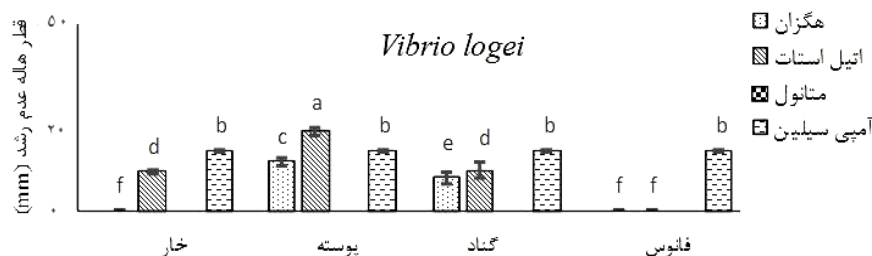
شکل ۱. اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Vibrio alginolyticus*.

نتایج مطالعات نشان داد که عصاره اتیل استات پوسته توتیای دریایی گونه *E. mathaei* بیشترین اثر ضد باکتری را بر باکتری گرم منفی *Shigella flexneri* داشته است. همچنین عصاره هگزانی پوسته نسبت به عصاره متانولی دارای اثر ضد باکتری بیشتری بود. عصاره اتیل استاتی و هگزانی پوسته و خار نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را بر باکتری *Shigella flexneri* از خود نشان دادند. اثر عصاره های اتیل استاتی، هگزانی و متانولی در قیاس با هم دارای اختلاف معنی داری بودند ($P < 0/05$) (شکل ۲).



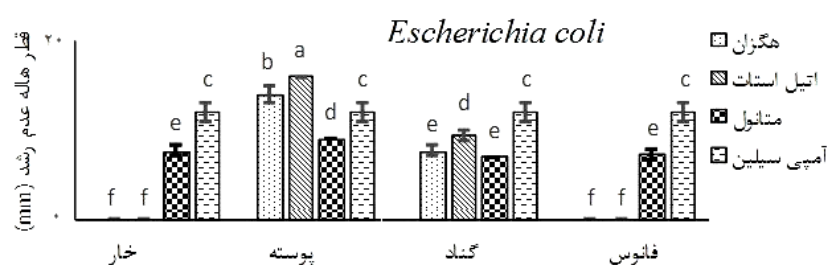
شکل ۲. اثر ضد باکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Shigella flexneri*

عصاره ایتیل استاتی پوسته استخراج شده از توتیای دریایی *E. mathaei* بیشترین خاصیت ضد باکتری را بر باکتری گرم منفی *Vibrio logei* به نسبت سایر عصاره‌ها نشان داد. عصاره ایتیل استاتی پوسته نسبت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری را نشان داد. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳. اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Vibrio logei*

عصاره ایتیل استات و هگزانی پوسته توتیای دریایی *E. mathaei* بر باکتری گرم منفی *Scherichia coli* دارای اثر ضد باکتری قابل ملاحظه‌ای بودند، به طوری که نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین اثر ضدباکتریایی بیشتری از خود نشان دادند. اثر عصاره اندام‌ها بر باکتری مورد مطالعه دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.05$) (شکل ۴).

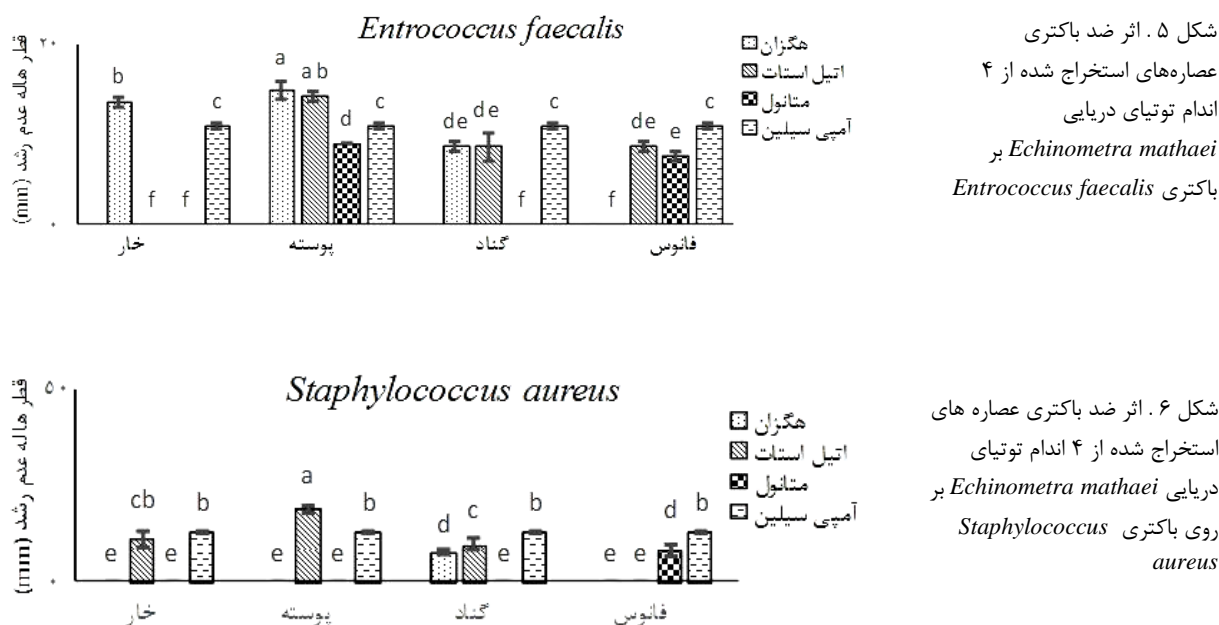


شکل ۴. اثر ضدباکتری عصاره‌های استخراج شده از ۴ اندام توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر روی باکتری *Scherichia coli*

طبق آزمایشات صورت گرفته مشخص شد که عصاره هگزانی و ایتیل استاتی پوسته و عصاره هگزانی خار بر باکتری گرم مثبت *Entrococcus faecalis* اثر ضد باکتری بیشتری نسبت به سایر عصاره‌ها دارد. همچنین عصاره هگزانی و ایتیل استات به دست آمده از پوسته و عصاره هگزانی خار نسبت به آنتی بیوتیک صنعتی آمپی سیلین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری از خود نشان داد. اثر عصاره اندام‌های مختلف بر باکتری *E. faecalis* دارای اختلاف معناداری بود ($P < 0.05$) (شکل ۵).

عصاره ایتیل استاتی پوسته توتیای دریایی *Echinometra mathaei* بر باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* بیشترین اثر ضد باکتری را نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد. از بین تمام عصاره‌ها، عصاره ایتیل استات پوسته نسبت به آمپی‌سیلین اثر

ضد باکتری بیشتری را نشان داد. بین اثر عصاره‌های اندام‌های مختلف بر باکتری مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$) (شکل ۶).



نتایج آزمون انتشار دیسک نشان داد که بین اثر عصاره قسمت‌های مختلف توتیای دریایی بر باکتری‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) و بین اندام‌های مورد مطالعه در این پژوهش، پوسته خاصیت ضدباکتری بیشتری نسبت به دیگر اندام‌ها دارد و اندام‌ها از نظر خاصیت ضد باکتری دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$). همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های مورد مطالعه، مربوط به عصاره اتیل استات پوسته بر باکتری گرم منفی *Shigella flexneri* و *Vibrio logei* به مقدار ۰/۵ میلی گرم بر لیتر ملاحظه گردید. در صورتی که عصاره هگزانی و عصاره اتیل استاتی پوسته بر باکتری *Vibrio alginolyticus* دارای اثر ضد باکتری ضعیف تری می باشد و حداقل غلظت بازدارندگی ۲ میلی گرم در لیتر می‌باشد. در غلظت ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر که حداقل غلظت در این مطالعه بود، هیچ کدام از عصاره‌ها اثر بازدارندگی رشد بر باکتری‌های مورد مطالعه نداشتند.

جدول ۱. حداقل غلظت بازدارنده رشد عصاره‌های مورد استفاده بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی

غلظت mg/ml				باکتری	عصاره پوسته
۰/۲۵	۰/۵	۱	۲		
+	+	+	MIC	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ان- هگزان
+	+	+	MIC	<i>Vibrio alginolyticus</i>	اتیل استات
+	+	MIC	-	<i>Escherichia coli</i>	
+	+	MIC	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	
+	MIC	-	-	<i>Shigella flexneri</i>	
+	MIC	-	-	<i>Vibrio logei</i>	

+ رشد باکتری در محیط کشت
- عدم رشد باکتری در محیط کشت

بحث

در این مطالعه اثر ضدباکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از *Echinometra mathaei* بر روی باکتری‌های پاتوژن انسانی بررسی شد. در بررسی و سنجش اثر ضد باکتریایی در اکثر آزمایشات صورت گرفته از دو روش انتشار از دیسک و رقیق سازی محیط کشت استفاده می‌شود که به عنوان دو روش مناسب در این راستا کاربرد دارند (Haug et al., 2002).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اندام‌های مختلف توتیای دریایی (خار، پوسته، گناد، فانوس ارسطو) دارای خاصیت ضد باکتریایی می‌باشند و بین اثر ضدباکتری اندام‌های مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$) (شکل ۱ تا ۶) که این یافته‌ها مشابه نتایجی است که Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲ به دست آوردند. به این صورت که اثر ضد باکتری عصاره‌های مختلف استخراجی از توتیای دریایی *Tripneustes gratilla* را بر باکتری‌های *Salmonella*، *Escherichia coli*، *Shigella sonnei*، *typhi*، *Penicillium spp.*، *Pseudomonas aeruginosa* مورد بررسی قرار دادند. طبق مطالعات ایشان فعالیت ضد باکتریایی در اندام‌های مختلف متفاوت بود؛ اثر ضد باکتریایی به طور عمده در عصاره گنادی و روده و به مقدار بسیار کم و بدون اثر در خار و محوطه دهانی دیده شد. اثر ضد باکتریایی هم در عصاره متانولی و هم در عصاره کلروفورمی در اندام‌های گناد و روده مشاهده شد.

در این مطالعه اثر عصاره هگزانی، اتیل استاتی و متانولی با یکدیگر متفاوت و از نظر اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت دارای اختلاف معنی‌داری بود ($P < 0.05$). طبق نتایج حاصل، عصاره اتیل استات و هگزانی اثر ضد باکتریایی به مراتب بهتری نسبت به عصاره متانولی داشتند، در صورتی که در مطالعه Abubakar و همکاران در سال ۲۰۱۲، عصاره متانولی دارای اثر ضد باکتریایی هتری بود. در مطالعه‌ای که Uma و Parvathavarthini در سال ۲۰۱۰ انجام دادند عصاره هگزانی توتیای دریایی گونه *Temnopleurus alexandri* را از نظر خاصیت ضد باکتری بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها مشخص کرد که عصاره هگزانی این گونه دارای خاصیت ضد باکتریایی است.

در بین اندام‌های مورد مطالعه در این تحقیق، اندام پوسته دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی بود (شکل ۱ تا ۶). این یافته مشابه نتایجی است که Shankarlal و همکاران در سال ۲۰۱۱ به دست آوردند، به این صورت که فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پوسته توتیای دریایی *Salmacis virgulata* را مورد بررسی قرار داده و دریافتند که عصاره پوسته گونه مورد مطالعه دارای خواص ضد باکتریایی می‌باشد. عصاره متانولی پوسته خاصیت ضد باکتری را در برابر باکتری *Proteus vulgaris* نشان داد که در مقایسه با باکتری *Proteus mirabilis* اثر بیشتر بود. در حالی که عصاره متانولی در این تحقیق در غلظت کم هیچ گونه اثری بر باکتری‌های *Salmonella typhi* و *Vibrio cholera* نداشت.

Uma و همکاران در سال ۲۰۱۴ خاصیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکی توتیای دریایی *Temnopleurus alexandri* را بر باکتری‌های گرم مثبت *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis*، *Enterococcus faecalis* و باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae* و *proteus vulgaris* مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج مطالعات ایشان عصاره هیدروالکلی گونه مورد مطالعه اثر ضد باکتریایی مناسبی را بر باکتری‌های مورد مطالعه به خصوص باکتری گرم منفی *E. coli* داشته است که در حداکثر غلظت تزریقی عصاره هیدروالکلی اثری هم‌تراز با اثر آنتی بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشت.

با توجه به اینکه در مطالعه حاضر عصاره هگزانی (غیر قطبی) دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی بود و در مطالعات Uma و Parvathavarthini در سال ۲۰۱۴ نیز عصاره هیدروالکی (غیر قطبی) دارای خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی بود و آنالیز شیمیایی آنها حضور استرول‌ها را تأیید کرده بود، این احتمال وجود دارد که در توتیای دریایی *Echinometra mathaei*، نیز استرول‌ها نقش تأیید کننده‌ای در خاصیت ضد باکتریایی گونه مورد مطالعه داشته باشند.

فعالیت ضدباکتری تشخیص داده شده ممکن است به دلیل مکانیسم ایمنی ذاتی باشد. همچنین ممکن است به علت همزیستی باکتریایی در محیط زیست موجود زنده بوده باشد (Strahl et al., 2002). همچنین ممکن است فعالیت ضدباکتریایی با رژیم غذایی در ارتباط باشد (Haug et al., 2002). همان طور که گفته شد اندام پوسته نسبت به سایر اندام‌ها دارای خاصیت آنتی باکتریایی قابل توجهی بود، به طوری که عصاره هگزانی و اتیل استاتی پوسته بر روی باکتری‌های مورد مطالعه، اثر به مراتب بهتری نسبت به آنتی‌بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین داشت (شکل ۶-۱). Service و همکاران در سال ۱۹۸۴ طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که پوسته توتیای دریایی *Echinus esculentus* حاوی رنگدانه *Echinochrome A* می‌باشد که این رنگدانه دارای خواص ضد باکتریایی هم بر باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی است.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره اتیل استاتی پوسته توتیا بر باکتری‌های پاتوژن انسانی مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که عصاره اتیل استاتی پوسته توتیا بر باکتری *V. Logei* و *S. flexneri* با غلظت ۰/۵ میلی گرم بر لیتر اثر بازدارندگی

به مراتب بهتری نسبت به بقیه عصاره‌ها بر باکتری‌های مورد آزمایش داشتند (جدول ۱). از عوامل موثر در فعالیت‌های ضد میکروبی، لیزوزوم‌ها نیز ممکن است نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی در خارپوستان ایفا کنند. فعالیت بالای شبه لیزوزومی در عصاره طبیعی مایع سلومی با داشتن خاصیت آنتی‌باکتریایی در چندین گونه از خارپوستان گزارش شده است (Canicatti and Roch, 1989; Stabili and Pagliara, 1994) با توجه به اینکه عصاره‌های اتیل استاتی و هگزانی پورته در این آزمایش اثر ضد باکتریایی بهتری نسبت به آنتی بیوتیک صنعتی آمپی‌سیلین نشان دادند نیاز به خالص سازی برای شناسایی ترکیب یا ترکیبات شیمیایی موجود در آن وجود دارد.

منابع

- امیری، ت.، جوانبخت، م. ج. ۱۳۹۰. استاندارد آزمایش حساسیت میکروبی به روش انتشار دیسک در آگار. فصلنامه دامپزشکی. سال اول، شماره ۲، صفحات ۴۴-۲۲.
- 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.
- Andersson, L., Bohlin, L., Iorizzi, M., Riccio, R., Minale, L., Moreno-Lopez, W. 1989. Biological activity of some saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars. Toxicon. 27: 179-188.
- Beauregard, K.A., Truong, N.T., Zhang, H.Y., Lin, W.Y., Beck, G. 2001. The detection and isolation of novel antimicrobial peptide from echinoderm *cucumaria frondosa*. Advances in Experimental Medicine and Biology. 484: 55-62.
- Haug, T., kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology. 81: 94-102.
- Lorizzi, M., Bryan, P., McClintock, J., Minale, L., Palagiano, E., Maurelli S., Riccio, R., Zollo, F. 1995. Chemical and biological investigation of the polar constituents of the starfish *Luidia clathrata*, collected in the Gulf of Mexico. Journal of Natural Products. 58: 653-671.
- Ismail, H., Lemriss, S., Ben Aoun, Z., Mhadhebi, L., Dellai, A., Kacem, Y., Boiron, P., Bouraoui, A. 2008. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean Sea cucumber, *Holothuria polii*. Mycologie Médicale. 18: 23-26.
- Mohammadzadeh, F., Ehsanpor, M., Afkhami, M., Mokhlesi, A., Khazzali, S. 2013. Evaluation of antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of *Holothuria scabra* from the North Coast of the Persian Gulf. Jornal de Mycologie Medicale. 23: 225-229.
- Service, M., Wardlaw, A.C. 1984. Echinochrome-A as a bactericidal substance in the coelomic fluid of *Echinus esculentus* (L.). Comparative biochemistry and physiology. 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., Pagliara, P. 1994. Antibacterial protection in *Marthasterias glacialis* eggs-characterization of lysozyme-like activity. Comparative biochemistry and physiology. B 109: 709-713.
- Strahl, E.D., Dobson, W.E., Lundie, J.R. 2002. Isolation and Screening of brittle star- associated bacteria for antibacterial activity. Current Microbiology. 44: 450-459.
- 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. 4(1) :1-4
- Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., Biniiaz, M. 2013. Toxicity of essential oil *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. Journal of Immunotoxicology. 10(3): 1-6.