



## ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی *Stichodactyla hadooni*

سارا جمشیدی زاده، حمیده عباسی، نرگس امراللهی بیوکی\*

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

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۷/۰۶/۱۲	
اصلاح: ۹۸/۰۲/۱۶	
پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۰	
کلمات کلیدی:	
زیست فعال	
شقایق دریایی	
فعالیت ضد باکتریایی	
<i>Stichodactyla</i>	

در سال‌های اخیر تلاش‌ها به منظور دستیابی به مواد فعال زیستی از موجودات زنده به ویژه آبریان رو به افزایش است. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی مکتی گونه *Stichodactyla hadooni* مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور شقایق‌های دریایی از عمق ۵ تا ۸ متری با عملیات غواصی در سواحل جزیره هرمز جمع‌آوری و عصاره‌گیری از آن‌ها با استفاده از حلال متانول، دی کلرومتان و استون انجام شد. عصاره‌های به دست آمده ابتدا به وسیله دستگاه روتاری تغلیظ و سپس در دستگاه وکیوم فریز درایر به صورت پودر خشک در آمد. از سه سویه باکتری *Vibrio alginolyticus*، *Enterococcus faecalis* و *Klebsiella planticola* برای بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها با روش انتشار دیسک بر آگار استفاده شد. نتایج آزمایش نشان داد که عصاره‌های حل شده در حلال متانول توان ممانعت از تکثیر هر سه سویه باکتری مورد آزمایش و به ویژه باکتری *Vibrio alginolyticus* را دارند. همچنین بررسی اندازه قطر هاله‌های عدم رشد حاصل از عصاره‌های حل شده در DMSO نشان داد که عصاره‌ها در غلظت بالا بر روی باکتری گرم مثبت *Enterococcus faecalis* تأثیر داشته است.

### مقدمه

در سال‌های اخیر توجه زیادی به فعالیت‌های زیستی محصولات طبیعی و استفاده دارویی بالقوه از آن‌ها شده است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که میکروب‌ها یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی در عصر حاضر برای انسان هستند که به منظور مهار و از بین بردن آن‌ها باید از آنتی‌بیوتیک‌ها که هر کدام با مکانیسم‌های متفاوتی عمل می‌کنند، استفاده کرد (Otimenyin *et al.*, 2008). با این حال استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های رایج، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به آن‌ها را افزایش داده است. بنابراین، تحقیقات برای کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید از سایر منابع طبیعی اعم از منابع خشکی و دریایی با هدف جایگزینی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های رایج امری ضروری به شمار می‌رود (Blunt *et al.*, 2009; Otimenyin *et al.*, 2008; Okeke *et al.*, 2005; Cohen and Huband, 1999; Normark and Normark, 2002). در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشأ دریایی بسیار حائز اهمیت است (Kumaravel *et al.*, 2010; Mancini *et al.*, 2007; Nabipour *et al.*, 2009; Franklin and Snow, 2005). به این منظور تولیدات طبیعی جانداران دریایی، به واسطه داشتن ترکیبات فعال زیستی می‌توانند با کاربرد دارویی در زمینه‌های متنوعی از جمله سلامت و بهداشت مورد استفاده قرار گیرند (Viletinck and Apers, 2001). منابع دریایی

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [amrollahi@hormozgan.ac.ir](mailto:amrollahi@hormozgan.ac.ir)

ترکیبات فراوانی را برای کنترل بیماری‌های باکتریایی، قارچی، ویروسی و سرطان فراهم می‌کنند. در دسترس بودن بیشتر این ترکیبات و تهیه آن‌ها از منابع تجدید پذیر، سمیت کمتر و کم‌هزینه بودن تولید اغلب آن‌ها نسبت به ترکیبات شیمیایی سنتزی، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (Viletinck and Apers, 2001).

مطالعات بسیاری نشان داده است که متابولیت‌های ثانویه نرم‌تنان دریایی دارای خواص ضد توموری، سیتوتوکسیک، نورو توکسیک، ضد باکتریایی، ضد ویروس و ضد قارچ می‌باشند (Newman and Cragg, 2004; Thangaraj and Bragadeeswaran, 2012; Thangaraj et al., 2018; Veeruraj et al., 2008). شاخه کیسه‌تنان دریایی شامل جانوران متنوعی است که طیف وسیعی از مواد فعال زیستی را تولید می‌کنند. از این میان فعالیت‌های زیستی مولکول‌های پروتئینی جداسازی شده از شقایق‌های دریایی مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است (Thangaraj et al., 2011). بیش از ۳۲ نوع از شقایق‌های دریایی قادر به تولید پروتئین‌ها و پپتیدهای سیتولیتیکی می‌باشند و دارای تنوع وسیعی از فعالیت‌های زیستی مانند همولیز، سیتوتوکسیک، کاردیوتراپی و غیرقطبی شدن غشا هستند. علی‌رغم قابلیت اکثر موجودات متعلق به شاخه کیسه‌تنان<sup>۱</sup> در تولید سموم گوناگون، مطالعات انجام شده در زمینه‌های بیوشیمیایی و داروشناختی مبتنی بر ارزیابی خواص این ترکیبات، به گروه‌های خاصی از اعضای این شاخه محدود شده است (Anderluh and Maček, 2002). از این‌رو تلاش برای یافتن ترکیبات طبیعی، به‌طور ویژه در میان این شاخه از موجودات دریایی، که کمتر مورد پژوهش قرار گرفته‌اند، به‌عنوان منبعی از مولکول‌های ویژه، به شدت رو به افزایش است. لذا امید است که نتایج تحقیق حاضر بر شقایق دریایی موکتی گونه S. hadooni بتواند راه را برای مطالعات بیشتر در این زمینه هموار نماید. در این پژوهش، هدف بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی S. hadooni بوده است.

## مواد و روش‌ها

نمونه‌های شقایق دریایی موکتی گونه S. hadooni با عملیات غواصی در سواحل جزیره هرمز (استان هرمزگان) از عمق ۵ تا ۸ متری جمع‌آوری شدند. نمونه‌های زنده در جعبه‌های یخ به آزمایشگاه منتقل شدند و با استفاده از کلید شناسایی و به کمک زیست‌شناس متخصص در این زمینه نوع گونه آن مشخص گردید (Häussermann, 2004). سپس نمونه‌ها با آب مقطر شستشو شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن حذف شود. نمونه‌ها تا زمان انجام مراحل خشک کردن و تغلیظ و عصاره‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Haug et al., 2002; Mohammadzadeh et al., 2013).

نمونه‌ها با قرار گرفتن در ویوم فریز درایر در دمای ۲۴- درجه سانتی‌گراد و فشار ۲/۵ میلی بار خشک شدند و به حالت پودر درآمدند (Ramkumar and Venkateshvaran, 2012). عصاره‌گیری از نمونه‌های پودر شده با استفاده از حلال‌های متانول، دی کلرومتان و استون، به ترتیب افزایش قطبیت، با رعایت کلیه پارامترهای لازم برای حفظ تکرارپذیری (مانند: تعیین درصد آب و وزن خشک عصاره‌ها و تعیین نسبت وزن عصاره به وزن پودر) انجام پذیرفت (Gohari et al., 2005; Murray et al., 2001; Saeidnia and Gohari, 2006). سپس عصاره‌ها با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شدند (Bragadeeswaran et al., 2011). در نهایت ۳ نوع عصاره متفاوت به دست آمد که پس از خشک کردن و توزین، برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

در این آزمایش از ۳ سویه باکتریایی *Vibrio alginolyticus*، *Enterococcus faecalis* و *Klebsiella planticola* استفاده شد. نمونه‌های باکتری در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس نمونه‌های باکتریایی رشد کرده جهت آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری مورد استفاده قرار گرفتند (Yousefzadi et al., 2014). به این صورت که در شرایط کاملاً استریل، باکتری تک کلونی از پلیت کشت، برداشت و در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث (LB) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C دماگذاری شدند تا باکتری رشد کند. در مرحله بعد کدورت سوسپانسیون معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند ( $1/5 \times 10^8$ ) باکتری در

<sup>1</sup> Cnidaria

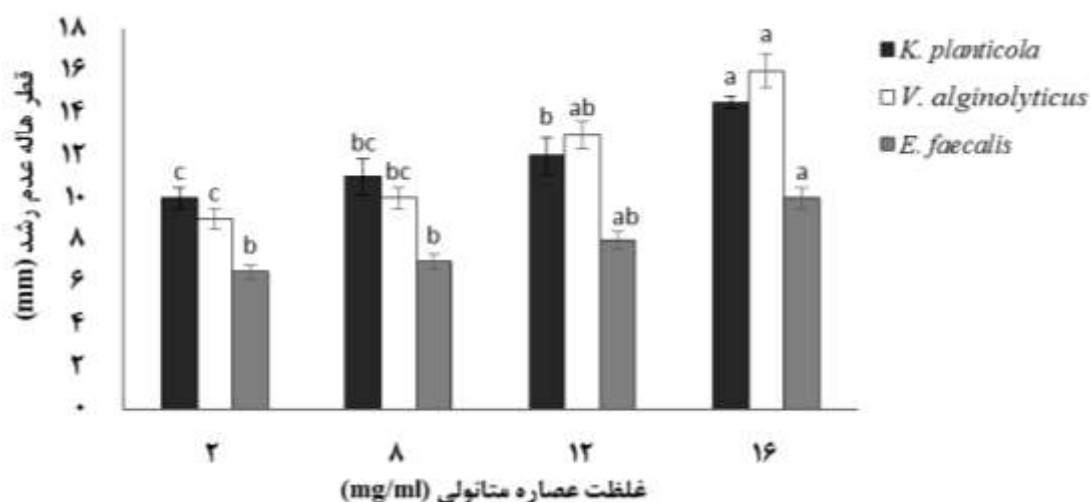
میلی‌لیتر) تنظیم گردید و پس از گذشت ۱۵ دقیقه از زمان تنظیم کدورت، تلقیح دیسک با هر یک از عصاره‌ها انجام شد به این ترتیب که محلول حاوی سوسپانسیون میکروبی بر روی پلیت‌های مولر هینتون آگار با سوپ استریل شده در کنار شعله به صورت یکنواخت کشت داده شد. دیسک‌های آماده استریل (پادتن طب) توسط پنس استریل شده روی محیط کشت باکتریایی قرار داده شدند. غلظت‌های ۲، ۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ها به دو صورت: حلال مربوط به هر فراکشن و حلال DMSO آماده شد و به میزان ۲۰ لاند (۲۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت سه بار تکرار به دقت به دیسک‌های بلانک (با قطر ۶ میلی‌متری) تزریق شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷-۳۵ دماگذاری شدند. پس از گذشت زمان دماگذاری، قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها در هر نمونه با استفاده از کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و نتایج اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ها بر اساس حلال‌های مربوط به هر فراکشن و حلال DMSO ثبت شد.

در این پژوهش به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضد باکتریایی و مقایسه نتایج آن‌ها در هر یک از نمونه‌ها از آنتی بیوتیک جنتامایسین به عنوان کنترل مثبت و از حلال‌های مربوط به هر فراکشن و DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد (Tomczyk et al., 2008).

نتایج حاصل از بررسی قطر هاله‌ها به صورت نمودار آماری به وسیله نرم افزار Excell 2013 ترسیم گردید و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار Spss 19 انجام شد. بررسی اختلاف معنی‌داری بین عصاره‌های مختلف و در سویه‌های مختلف باکتری با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت و مقایسه داده‌ها در سطح معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بررسی شد.

## نتایج

ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی، استونی و دی کلرومتان بافت شقایق موکتی در غلظت‌های ۲، ۸، ۱۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با توجه به هاله عدم رشد باکتری بر اثر حلال‌های مربوط به هر فراکشن (کنترل منفی) نشان داد که این عصاره‌ها به استثنای عصاره متانولی اثر ضد باکتریایی در برابر هیچ یک از سه سویه‌ی باکتری نداشتند (شکل ۱). بر این اساس قطر هاله عدم رشد حلال متانول به عنوان کنترل منفی، در سه سویه باکتری *Vibrio alginolyticus*، *Klebsiella planticola* و *faecalis Enterococcus* به ترتیب ۷، ۱۱ و ۶ میلی‌متر بود (جدول ۱) که نشان می‌دهد عصاره متانولی بیشترین اثر ضد باکتریایی را بر باکتری گرم منفی *Vibrio alginolyticus* نسبت به سایر عصاره‌ها داشته است. به طوری که قطر هاله عدم رشد باکتری در غلظت‌های ۱۲ و ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این عصاره از آنتی بیوتیک جنتامایسین بیشتر بوده است. اما در سویه‌های دیگر با وجود مشاهده اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی، قطر هاله عدم رشد، حتی در بالاترین غلظت مورد مطالعه، از قطر هاله آنتی بیوتیک جنتامایسین کمتر بوده است (شکل ۱).



شکل ۱. اثر ضد باکتریایی غلظت‌های متفاوت عصاره متانولی *S. hadooni* بر ۳ سویه باکتری مورد آزمون

جدول ۱. نتایج بررسی قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها بر اثر حلال متانول و آنتی بیوتیک جنتامایسین

قطر هاله کنترل (mm)			
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	
۶±۰/۴	۱۱±۰/۵	۷±۰/۴	حلال متانول
۵±۰/۵	۵/۵±۰/۶	۴±۰/۵	جنتامایسین

پس از اطمینان حاصل کردن از نرمال بودن داده‌ها با بررسی نتایج آزمون آماری کلموگوروف - اسمیرنوف، آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. نتایج این آزمون نشان داد که اثر ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی بر باکتری *Klebsiella planticola* اختلاف معنی‌داری نداشته است ( $P > 0/05$ ) (شکل ۱).

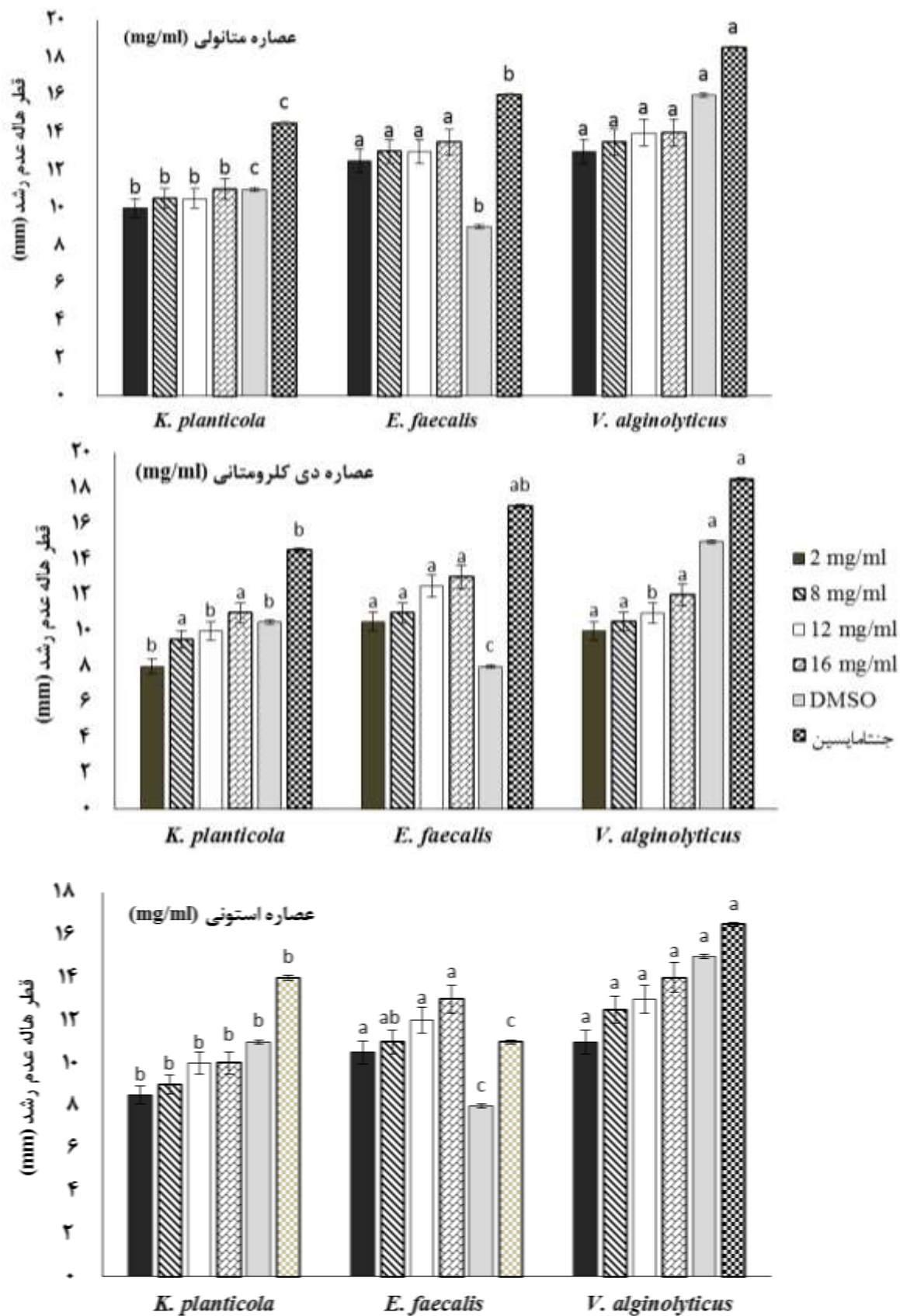
عصاره‌های حل شده در DMSO، اثر ضد باکتریایی قابل توجهی از خود نشان ندادند و با در نظر گرفتن قطر هاله DMSO به عنوان کنترل منفی، هر سه نوع عصاره استخراجی از شقایق موکتی فقط بر روی باکتری گرم مثبت *Enterococcus faecalis* تأثیر اندکی داشتند (شکل ۲). نتایج ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی عصاره متانولی بر اساس آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در بین قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های مورد آزمایش، تفاوت معنی‌داری وجود نداشته است ( $P > 0/05$ ).

نتایج حاصل از اثر ضدباکتریایی عصاره استونی نشان داد که میان قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های *Enterococcus faecalis* و *Vibrio alginolyticus* حاصل از این عصاره تفاوت معنی‌داری وجود داشته است. همچنین این تفاوت در میان قطر هاله‌های عدم رشد باکتری *Enterococcus faecalis* در اثر عصاره دی کلرو متانی معنی‌دار بوده است ( $P < 0/05$ ).

## بحث

در این مطالعه خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های آلی شقایق دریایی گونه *Styrodactylla haddoni* از جزیره هرمز در مقابل سه گونه باکتری بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. در این میان، تنها عصاره‌های متانولی اثر ضد باکتریایی اندکی از خود نشان دادند. تفاوت نتایج حاصل از خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها بر روی سویه‌های باکتریایی اهمیت تأثیر حلال‌های به کار برده شده (استون، دی کلرومتان و متانول) را در زمان عصاره‌گیری و تهیه غلظت‌های مختلف عصاره‌ها را ناشکار می‌سازد. به عبارت دیگر حلال‌های به کار برده شده در ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی به روش تلقیح دیسک، تأثیرات متفاوتی روی خاصیت عصاره‌ها می‌گذارند و این امر نشان‌دهنده تأثیر بسیار مهم حلال‌ها است.

تأثیر مربوط به سه فراکشن عصاره شقایق دریایی موکتی حل شده در DMSO به این صورت بود که هر سه عصاره متانولی، استونی و دی کلرومتانی تأثیر اندکی بر باکتری گرم مثبت *Enterococcus faecalis* در غلظت‌های بالا از خود نشان دادند ولی هیچ‌گونه تأثیری بر باکتری‌های گرم منفی *Vibrio alginolyticus* و *Klebsiella planticola* نداشتند. دلیل این امر می‌تواند وجود لایه‌های چربی متعدد و ساختار لیپوپلی‌ساکاریدی به شکل لایه اضافی در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی و به دنبال آن کاهش نفوذ ترکیبات مؤثر موجود در عصاره به داخل سلول باکتری باشد (Kandhasamy and Arunachalam, 2008). از طرف دیگر این احتمال وجود دارد که عصاره‌های حل شده در حلال DMSO، توانایی جدا ساختن ترکیبات فعال زیستی موجود در نمونه را ندارند، تا آن ترکیبات بتوانند با عبور یا تخریب این لایه غشای اضافی، به اندام‌های حساس باکتری آسیب برسانند و موجب عدم رشد و در نهایت مرگ باکتری شوند. یافته‌های این تحقیق تا حدودی مشابه نتایجی است که Thangaraj و Bragadeeswaran در مطالعات خود به دست آورده‌اند (Thangaraj and Bragadeeswaran, 2012; Bragadeeswaran et al., 2011; Thangaraj et al., 2011). آن‌ها خواص ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی از شقایق دریایی *Stichodactyla* را بر چند سویه باکتری مورد بررسی قرار دادند. بر اساس مشاهدات آن‌ها عصاره متانولی



شکل ۲. اثر ضد باکتریایی غلظت‌های متفاوت عصاره *S. haddoni* بر ۳ سویه باکتری مورد آزمون

استخراجی از این جنس، بزرگ‌ترین هاله عدم رشد را در برابر باکتری *Staphylococcus aureus* تشکیل داد و بر باکتری‌های *Pseudomonas areuginosa* و *Escherichia coli* تأثیری نداشته است. Gunasundari و همکاران (۲۰۱۳) خاصیت ضدباکتریایی موکوس شقایق دریایی *Heteractis magnifica* از سواحل مانداپام هند را بر جنس‌های مختلف باکتریایی از جمله *Enterobacter*، *Flavobacterium* و *Vibrio* به روش انتشار دیسک بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که کمترین اثر ضدباکتریایی عصاره‌ها بر باکتری‌های گرم منفی با قطر هاله عدم رشد ۱/۵ میلی‌متر و بیشترین تأثیر آن‌ها بر باکتری *Flavobacterium* با قطر هاله عدم رشد ۱۳ میلی‌متر بوده است (Gunasundari et al., 2013). Thangaraj و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضد باکتریایی عصاره ۳ نوع شقایق (*Stichodactyla haddoni*، *Heteractis aurira* و *H. crispa*) را بر باکتری‌هایی از جنس‌های مختلف از جمله *Vibrio* و *Klebsiella* مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نیز نشان داد که عصاره‌ها بیشترین اثر را بر باکتری‌های گرم مثبت داشته‌اند و در این میان بیشترین قطر هاله عدم رشد باکتری (۵/۱ میلی‌متر) مربوط به عصاره *S. haddoni* بوده است؛ در حالی که بر باکتری گرم منفی *Vibrio cholera* هیچ‌گونه اثری نداشته است (Thangaraj et al., 2018).

وجود لایه پپتیدوگلیکانی در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت، که ساختار ساده‌تری نسبت به باکتری‌های گرم منفی دارند، موجب می‌شود تا این نوع باکتری‌ها در مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی حساسیت بیشتری داشته باشند (McDonnell and Russell, 1999). مطالعات نشان داده است که خواص ضد باکتریایی عصاره بی‌مهرگان به ترکیبات گلیکوزیدی و ساپونین موجود در آن‌ها و همچنین قطبیت ساختار شیمیایی آن‌ها مربوط می‌شود. Ivanchina و همکاران (۲۰۱۱)، Avilov و همکاران (۲۰۰۷)، Maier و همکاران (۲۰۰۱) این نظریه را تأیید می‌کنند (Avilov et al., 2007; Ivanchina et al., 2011; Maier et al., 2001). علاوه بر این در مطالعه حاضر مشخص شد که عصاره متانولی دارای خاصیت ضد باکتریایی بیشتری نسبت به عصاره‌های استونی و دی کلرومتانی است. مطالعات انجام شده توسط Uma و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که حضور استرول‌ها در عصاره قطبی خاصیت ضد باکتریایی آن را به طور قابل توجهی بالا می‌برد (Uma and Parvathavarthini, 2010)، بنابراین با توجه به این نظریه این احتمال نیز وجود دارد که استرول‌ها نقش تعیین‌کننده‌ای در خاصیت ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی داشته باشند. در مطالعه انجام شده توسط John و همکاران (۲۰۱۵) نیز مشخص شد که عصاره قطبی شقایق دریایی *Anthopleura elegantissima* و *S. haddoni* دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد (John et al., 2015). فعالیت ضدباکتری تشخیص داده شده ممکن است به مواردی چون سازوکار ایمنی ذاتی، رژیم غذایی و همزیستی باکتریایی در محیط زیست شقایق دریایی نیز مربوط باشد (Haug et al., 2002; Strahl et al., 2002).

علاوه بر مکانیسم ایمنی ذاتی و همزیستی باکتریایی، لیزوزوم‌ها نیز ممکن است نقش مهمی را در مکانیسم دفاعی موجودات دریایی ایفا کنند (Canicatti and Roch, 1989; Stabili and Pagliara, 1994; Stabili et al., 1996; Strahl et al., 2002).

از سوی دیگر، با توجه به گزارش‌های Borbon و همکاران (۲۰۱۶) عصاره *S. haddoni* فعالیت خوبی در برابر باکتری‌های گرم منفی نشان داده است که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود (Borbón et al., 2016). نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره استونی *Anthopleura nigrescens* دارای اثر ضدباکتریایی قابل توجهی مقابل باکتری گرم منفی *Proteus vulgaris* بود. همچنین نتایج مطالعه انجام شده توسط Williams و همکاران (۲۰۰۷) در سواحل جنوب شرقی هند مبنی بر ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف *S. haddoni* نشان داد که، عصاره متانولی شقایق موکتی، هیچ اثری بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Pseudomonas sp.* نداشته است؛ در حالی که در برابر *Klebsiella pneumoniae* اثر مهارکنندگی بر رشد داشته و این خاصیت بر باکتری *Vibrio parahaemolyticus* به طور قابل توجهی مشاهده شده است (Williams et al., 2007). نتایج مشابهی در مطالعه Balaji (۲۰۰۹) و Rajak (۲۰۰۹) مبنی بر اثر ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی از جمله *S. haddoni* در مقابل باکتری‌های گرم منفی گزارش شده است. لذا چنین به نظر می‌رسد این مسئله که در بعضی مطالعات، باکتری‌های گرم مثبت به عنوان گونه‌های حساس‌تر شناخته می‌شوند

Balaji, 2009; ) و در برخی دیگر خلاف این موضوع اثبات می‌شود (Gunasundari et al., 2013; Thangaraj et al., 2018) Borbón et al., 2016; Rajak, 2009; Williams et al., 2007) می‌تواند ناشی از ویژگی‌های فردی و سویه‌ای باکتری‌ها باشد. نتایج تأثیر ضد باکتریایی عصاره شقایق دریایی موکتی در حلال‌های مربوط به هر فراکشن شامل متانول، استون و دی‌کلرومتان به این صورت بود که، عصاره متانولی در هر سه سویه باکتری تأثیر ضد باکتریایی متوسطی را از خود نشان داد، ولی عصاره‌ی استونی و دی‌کلرو متانی بر هیچ کدام از باکتری‌ها اثر نداشتند. این نشان می‌دهد که، متانول حلال مناسبی برای استخراج مواد فعال زیستی موجود در شقایق دریایی می‌باشد. وجود شرایط بوم‌شناختی متفاوت در محیط‌های آبی مختلف و به تبع آن، تفاوت در شرایط فیزیولوژیک موجودات منجر به تفاوت در فعالیت ضد باکتریایی عصاره این گونه در خلیج فارس، با دیگر پهنه‌های آبی شده است که دور از انتظار نیست.

در این مطالعه مشاهده شد که عصاره‌های مختلف به دست آمده از این گونه شقایق دریایی خاصیت ضد باکتریایی قابل توجهی در مقابل سویه‌های مورد استفاده در این آزمون نشان ندادند. لذا به نظر می‌رسد سویه‌هایی از باکتری در دریا وجود دارند که می‌توانند به عنوان عامل بیماری‌زا در شقایق‌های دریایی مطرح شوند.

روش‌های مختلفی برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف وجود دارد، اما رایج‌ترین روش انتشار دیسک است که در مطالعه حاضر از آن استفاده شد. اگرچه این روش مزیت‌های زیادی دارد، اما با محدودیت‌هایی روبرو است زیرا تنها مهار رشد باکتری را نشان می‌دهد و این به معنی شناسایی ترکیبات مؤثر بر از بین رفتن باکتری نمی‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی بر خواص ضد میکروبی بی‌مهرگان دریایی در برابر باکتری‌ها، نشان می‌دهد که بسیاری از موجودات دریایی ساختارهای متنوعی از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که می‌تواند کاربرد دارویی داشته باشد (Prabhu and Bragadeeswaran, 2013). لذا پژوهش حاضر مستلزم آنالیز شیمیایی و شناسایی ترکیب یا ترکیبات فعال زیستی در عصاره شقایق دریایی و ارزیابی اثرات ضد باکتریایی آن‌ها بر سویه‌های گوناگون باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از روش‌های کارآمد آزمایشگاهی است تا راهکارهای درمانی جدید برای بیماری‌های باکتریایی اتخاذ گردد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی روش‌های تست باکتریایی دیگری نیز در کنار این روش بررسی گردد.

## منابع

- Anderluh, G., Maček, P. 2002. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (*Anthozoa: Actiniaria*). *Toxicon*. 40(2): 111-124.
- Avilov, S.A., Kalinin, V.I., Silchenko, A.S., Aminin, D.L., Agafonova, I.G., Stonik, V.A., Collin, P.D., Woodward, C. 2007. Process for isolating sea cucumber saponin Frondoside A, and immunomodulatory methods of use, Google Patents.
- Balaji, D. 2009. Pharmacological properties of sea anemone *Heteractis magnifica* and *Stichodactyla haddoni*. M. Sc., Thesis, Centre of Advanced Study in Marine Biology, Annamalai, 108 p.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Hu, W.-P., Munro, M.H., Northcote, P.T., Prinsep, M.R. 2009. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 32(2): 116-211.
- Borbón, H., Váldez, S., Alvarado-Mesén, J., Soto, R., Vega, L. Antimicrobial properties of sea anemone *Anthopleura nigrescens* from pacific coast of Costa Rica. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 6(5): 418-421.
- Bragadeeswaran, S., Thangaraj, S., Prabhu, K., Raj Sophia Rani, S. 2011. Antifouling activity by sea anemone (*Heteractis magnifica* and *H. aurora*) extracts against marine biofilm bacteria. Submission article platform-Latin American Journal of Aquatic Research. 39(2): 385-389.
- Canicatti, C., Roch, P. 1989. Studies on *Holothuria polii* (*Echinodermata*) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. *Experientia*. 45(8): 756-759.
- Cohen, M.A., Huband, M.D. 1999. Activity of clinafloxacin, trovafloxacin, quinupristin/dalfopristin, and other antimicrobial agents versus *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 33(1): 43-46.

- Franklin, T.J., Snow, G.A. 2005. Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action. Springer Science & Business Media.
- Gohari, A.R., Hadjiakhoondi, A., Sadat-Ebrahimi, E., Saeidnia, S., Shafiee, A. 2005. Cytotoxic terpenoids from *Satureja macrantha* CA Mey. Daru Journal of Pharmaceutical Sciences. 13(4): 177-181.
- Gunasundari, V., Kumar, T., Kumaresan, S., Balagurunathan, R., Balasubramanian, T. 2013. Isolation of aliphatic-antibiotic compounds from marine invertebrate, *Heteractis magnifica* 'Quoy & Gaimard, 1833' against captive marine ornamental fish pathogens.
- Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø.M., Stensvåg, K. 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). Journal of Invertebrate Pathology. 81(2): 94-102.
- Häussermann, V. 2004. Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals exemplified by Chilean sea anemones; including guidelines for sampling, preservation and examination. journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 84(5): 931-936.
- Ivanchina, N.V., Kicha, A.A., Stonik, V.A. 2011. Steroid glycosides from marine organisms. Steroids. 76(5): 425-454.
- John, S., Velmurugan, S., Nagaraj, D., Kumaran, S., Pugazhvendan, S. 2015. Antimicrobial activity of sea anemone *Stichyodactyla hadonii* and *Anthopleura elegantissima* extracts against human pathogens. Int International Journal of Advanced Research in Biological Sciences. 2(6): 27-35.
- Kandhasamy, M., Arunachalam, K. 2008. Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India. African journal of Biotechnology. 7(12).
- Kumaravel, K., Ravichandran, S., Balasubramanian, T., Siva Subramanian, K., Bilal, A. 2010. Antimicrobial effect of five seahorse species from Indian coast. British Journal of Pharmacology and Toxicology. 1(2): 62-66.
- Maier, M.S., Roccatagliata, A.J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A.M., Pujol, C.A., Damonte, E.B. 2001. Two new cytotoxic and virucidal trisulfated triterpene glycosides from the Antarctic sea cucumber *Staurocucumis liouvillei*. Journal of Natural Products. 64(6): 732-736.
- Mancini, I., Defant, A., Guella, G. 2007. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents). 6(1): 17-48.
- McDonnell, G., Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical Microbiology Reviews. 12(1): 147-179.
- Mohammadzadeh, F., Ehsanpor, M., Afkhami, M., Mokhlesi, A., Khazaali, A., Montazeri, S. 2013. Antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of a sea cucumber *Holothuria leucospilota*, from the north coast of the Persian Gulf. journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 93(5): 1401-1405.
- Murray, A.P., Muniain, C., Seldes, A.M., Maier, M.S. 2001. Patagonicoside A: a novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. Tetrahedron. 57(47): 9563-9568.
- Nabipour, I., Najafi, A., Bolkheir, A.R. 2009. Anticancer and cytotoxic compounds from seashells of the Persian Gulf. Tibb-i junub. 12(3): 231-237.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. Journal of Natural Products. 67(8): 1216-1238.
- Normark, B.H., Normark, S. 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. Journal of Internal Medicine. 252(2): 91-106.
- Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A., Klugman, K.P. 2005. Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. The Lancet infectious diseases. 5(8): 481-493.
- Otimenyin, O., Sunday, U.M., Ogbonna, A. 2008. Antimicrobial and hypoglycemic effects of *Momordica balsamina*. Linn. Journal of Natural Products. 1: 03-09.
- Prabhu, K., Bragadeeswaran, S. 2013. Biological properties of brittle star *Ophiocnemis marmorata* collected from Parangipettai, Southeast coast of India. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 5(10): 110-118.

- Rajak, R.C. 2009. Pharmacological and biomedical properties of sea anemone toxin from *Paracondactylis indicus* and *Paracondactylis sinensis*. M. Sc., Thesis. Parangipettai, India: Centre of Advanced Study in Marine. 116 p.
- Ramkumar, S., Venkateshvaran, K. 2012. Bioactivity of venom extracted from the sea anemone *Anthopleura asiatica* (Cnidaria: Anthozoa): Toxicity and Histopathological studies. International Journal of Fisheries and Aquaculture. 4(4): 71-76.
- Saeidnia, S., Gohari, A. 2006. Cytotoxicity of *Achillea talagonica* Boiss. and *A. tenuifolia* Lam. International Journal of Biology and Biotechnology (Pakistan).
- Stabili, L., Pagliara, P. 1994. Antibacterial protection in *Marthasterias glacialis* eggs: characterization of lysozyme-like activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. 109(4): 709-713.
- Stabili, L., Pagliara, P., Roch, P. 1996. Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 113(3): 639-644.
- Strahl, E., Dobson, W., Lundie, Jr.L. 2002. Isolation and screening of brittlestar-associated bacteria for antibacterial activity. Current microbiology. 44(6): 450-459.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S. 2012. Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 18(1): 53-61.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., Gokula, V. 2018. Bioactive Compounds of Sea Anemones: A Review. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 25(4): 1405-1416.
- Thangaraj, S., Bragadeeswaran, S., Suganthi, K., Kumaran, N.S. 2011. Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 1(1): 43-46.
- Tomczyk, M., Leszczyńska, K., Jakoniuk, P. 2008. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. Fitoterapia. 79(7-8): 592-594.
- Uma, B., Parvathavarthini, R. 2010. Antibacterial effect of hexane extract of sea urchin, *Temnopleurus alexandri* (Bell, 1884). International Journal of PharmTech Research. 2(3): 1677-1680.
- Veeruraj, A., Arumugam, M., Ajithkumar, T., Balasubramanian, T. 2008. Isolation and biological properties of neurotoxin from sea anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). International Journal of Toxicology. 5(2): 1-7.
- Viletinck, A., Apers, S. 2001. Biological screening methods in the search for pharmacologically active natural products. Bioactive Compounds from Natural Sources (Tringali, C., ed.), Taylor and Francis, New York, USA: 1-30.
- Williams, G.P., Babu, S., Ravikumar, S., Kathiresan, K., Prathap, S.A., Chinnapparaj, S., Marian, M., Alikhan, S.L. 2007. Antimicrobial activity of tissue and associated bacteria from benthic sea anemone *Stichodactyla haddoni* against microbial pathogens. Journal of Environmental Biology. 28(4): 789-793.
- Yousefzadi, M., Riahi-Madvar, A., Hadian, J., Rezaee, F., Rafiee, R., Biniiaz, M. 2014. Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. Journal of Immunotoxicology. 11(1): 50-55.