

بررسی ویژگی ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی و الکلی خاره‌چسب *Siphonaria carbo*

احمد شادی^{۱*}، امیر وزیری‌زاده^۲، فاطمه آفریدون^۳، خانمناز عبادی^۴

۱- استادیار گروه زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، پست الکترونیکی: shadi@pgu.ac.ir

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش‌های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، پست الکترونیکی: amirvz@yahoo.com

۳- کارشناسی ارشد زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، پست الکترونیکی: afridoon@gmail.com

۴- کارشناسی ارشد زیست فناوری دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، پست الکترونیکی: khanomnaz.ebadi@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۷

* نویسنده مسوول

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۱۳

چکیده

در این مقاله، خواص ضد باکتریایی خاره‌چسب *Siphonaria carbo*، علیه باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، و خواص ضد قارچی آن علیه قارچ *Saprolegnia parasitica* به روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ویژگی آنتی‌اکسیدانی این گونه با روش مالون‌دی‌آلدئید عصاره‌های به دست آمده (خام اتانولی و آبی از دو بافت خیس و خشک) از خاره‌چسب گونه مورد نظر ارزیابی شد. نتایج نشان داد که عصاره اتانولی از بافت خشک دارای کمترین پراکسیداسیون چربی ($30/54 \pm 0/49$) و بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. همچنین عصاره آبی از بافت تر با بیشترین پراکسیداسیون چربی ($44/45 \pm 0/74$)، ضعیف‌ترین اثر آنتی‌اکسیدانی را دارا بود. نتایج بررسی ضد باکتریایی نشان داد که عصاره‌های مورد آزمون، دارای ویژگی ضد باکتریایی معنی‌داری نیستند. این مطالعه نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های زیستی *Siphonaria carbo* وجود دارد. بررسی شیمیایی دقیق‌تر جهت شناسایی ترکیبات موثر که سبب این ویژگی شده‌اند، پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: تولیدات ثانویه، خواص آنتی‌اکسیدانی، فرآورده‌های طبیعی دریا، *Siphonaria carbo*

۱. مقدمه

شکم‌پایان رده سیفوناریا^۱ از نرم‌تنان دریایی هستند که مطالعات کمی روی خواص زیست پزشکی آن‌ها صورت گرفته است. عوامل اکسیدانی به دلیل قدرت تخریب ویژه خود، در بروز بیماری‌های متفاوتی مثل آلزایمر، سرطان، پیری و نارسایی قلبی

جانوران دریایی با داشتن تولیدات ثانویه از مهم‌ترین منابع تولید ترکیبات طبیعی با کارکردهای زیستی محسوب می‌شوند.

¹ Siphonaria

باکتری‌ها توسط عوامل صنعتی هم‌چون آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی در محیط طبیعی با چالش‌های زیستی رو به رو هستند. لذا یکی از مناسب‌ترین اقدامات، جلوگیری از رشد باکتری با کاربرد موادی است که خاصیت ضد باکتریایی طبیعی دارند.

به دلیل وجود خطرات ناشی از استفاده آنتی‌اکسیدان‌ها بر سلامتی و ترکیبات ضد باکتری شیمیایی، می‌بایست این عوامل آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مصنوعی با انواع طبیعی جایگزین گردند. از این رو، تحقیقات متفاوتی روی موجودات مختلف از جمله موجودات دریایی صورت گرفته است. حضور عوامل کشنده یاخته و آنتی‌اکسیدانی باعث جلوگیری از ایجاد بی‌نظمی - های سلولی منتهی به سرطان و یا درمان این بیماری‌ها می‌گردند. محیط‌های دریایی به عنوان یک بوم‌سامانه پیچیده، با موجوداتی همراه است که دارای ترکیبات متفاوتی به منظور دفاع از خود هستند (Indap et al., 1998). این ترکیبات در بسیاری از موارد دارای ویژگی‌های ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند. بنابراین غربال‌گری اولیه موجودات دریایی به ویژه موجودات بومی می‌تواند گام اولیه در یافتن مواد زیست فعال نوین با کاربردهای درمانی باشد (Centella et al., 2017).

نرم‌تنان به شکل گسترده‌ای در محیط‌های آبی پراکنش یافته‌اند و یکی از متنوع‌ترین گروه‌های جانوری روی کره زمین را تشکیل می‌دهند. این جانداران با نام‌های عمومی حلزون، لیسه، صدف دوکفه‌ای، ماهی مرکب، اختاپوس^۳ و غیره شناخته می‌شوند. در این بین شکم‌پایان (Gastropoda) از تنوع بالایی برخوردار هستند. جنس سیفوناریا، از رده شکم‌پایان خارچه‌چسب (Limpet) به لحاظ حضور چندین خانواده از ترکیبات ضد میکروبی قابل توجه هستند. به طوری که اعضای حاضر در این جنس دارای منابع غنی از پلی‌پروپینوات‌ها، آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌تری و ماکرولیدها هستند (Davies-Coleman et al., 1998; Garson, 1993; Norcross et al., 1995). نرم‌تنان جنس سیفوناریا^۴ (زیررده ریه‌داران و تیره کشکک داران سیفوناریا^۵) به دلیل نداشتن آبشش اولیه به عنوان خارچه‌چسب‌های کاذب^۵ شناخته می‌شوند. این جانداران به صورت هوازی تنفس می‌کنند و دارای پوسته صدفی بوده و گیاه‌خوار هستند (Ansell et al., 1999; Jerez et al., 2006).

نقش دارند (Finkel et al., 2000). همچنین بیماری‌هایی نظیر آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی عروقی، سیستیک فیبروزیس، ناهنجاری‌های متابولیک و غیره از دیگر بیماری‌های مرتبط با عوامل اکسیدانی هستند (Aher et al., 2011). گونه‌های اکسیژن باز فعال شده (ROS^۱) یا رادیکال آزاد ناپایدار، به عنوان مولکول‌های تخریب‌گر روی غشای سلولی، میتوکندری و DNA فعالیت می‌کنند. ROS ها نه تنها رادیکال‌های اکسیژن، بلکه بعضی مشتقات غیر رادیکالی اکسیژن را هم شامل می‌شوند. مشتقاتی مثل پراکسید هیدروژن و اسید هیپوکلوئید نیز از مولکول‌های مخرب هستند (Bandyopadhyay et al., 1999). رادیکال نیتریک اکسید (NO) هم توانایی بالایی برای واکنش‌های زیادی مثل خاصیت اکسیدانی دارد. همچنین این مولکول توانایی خاصی در واکنش با دیگر مولکول‌های غیرآلی مثل اکسیژن، فلزات واسطه و سوپراکسیدها دارد. توانایی نیتریک اکسید در واکنش با ساختارهای DNA مثل بازهای پیریمیدینی و گروه‌های پروستتیک مشابه یا پروتئین‌هایی که منجر به S-نیتروزیلاسیون گروه تیول می‌شوند شناخته شده است. هم چنین نیتراسیون ریشه‌های تیروزین و یا اختلال در خوشه‌های آهن سولفید مثل دمین انگشت روی^۲ یا کمپلکس‌های آهن سولفید نیز به اثبات رسیده است (Blaise et al., 2005; Bogdan., 2001). رادیکال‌های آزاد با شرکت در اکسیداسیون اولیه لیپدها، از کیفیت غذا می‌کاهند. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مثل هیدروکسینوزیل بوتیله شده (BHA) و هیدروکسی تولوئن بوتیله شده (BHT) و ترا بوتیل هیدروکوتینون (TBHQ) به طور گسترده در صنایع غذایی استفاده می‌شوند. اما BHA و BHT در بدن ذخیره شده و باعث تخریب کبد و سرطان‌زایی می‌شوند (Grice, 1988; Qi et al., 2005).

امروزه به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌های بیماری‌زا تبدیل به گونه‌های مقاوم شده‌اند (Lavanya et al., 2011). با توجه به مکانیسم‌های ریزجانداران در مقابله با مواد تحلیل برنده و ضد باکتری شیمیایی، درمان عوامل بیماری‌زای مقاوم شده و یا ذاتا مقاوم، از بزرگترین مشکلات انسان است (Smith et al., 1994). به علاوه، داروها آثار نامطلوبی نیز بر میزبان خود می‌گذارند که شامل افزایش حساسیت و کاهش میکروبی‌های مفید در روده می‌شوند (Idsoe et al., 1968). از بین بردن

³ Octopus

⁴ Siphonaria

⁵ False limpets

¹ Reactive oxygen species

² Zinc finger (Znf) domain

ساعت زیر هود قرار گرفتند. مایع بدست آمده با استفاده از کاغذ واتمن درون قیف استریل فیلتر شد. محلول حاصل درون پتری دیش استریل شده طی مدت ۲ روز در آون با دمای ۳۹-۳۵ درجه سانتی‌گراد به طور کامل خشک گردید. عصاره حاصل به منظور ارزیابی‌های زیستی مورد ارزیابی قرار گرفت (Jamali et al., 2010; Ravi et al., 2012).

۲-۳ عصاره‌گیری از بافت خشک

در این روش ابتدا مقدار ۵۰ گرم از نمونه‌های بدون صدف، پس از وزن کردن به پتری دیش استریل شده منتقل شدند و برای مدت ۹۶ ساعت در آون با دمای ۵۵-۵۰ به مدت ۹۶ ساعت تحت شرایط خشک شدن قرار گرفتند. سپس نمونه‌های خشک شده، با هاون چینی استریل کوبیده شده و به صورت پودر درآمد. در ادامه عصاره‌گیری با استفاده از پودر حاصله انجام گرفت.

۲-۴ آزمون‌های ضد میکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها، باکتری‌های *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus* و قارچ *Saprolegnia parasitica* در نظر گرفته شدند. باکتری *E. coli* با کد ATCC10536 و *S. aureus* با کد ATCC 25923 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران و قارچ *S. parasitica* جداسازی شده از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان از مرکز تحقیقات ماهیان سردابی یاسوج تهیه شدند. کلیه محیط‌های کشت بر اساس دستور کارخانه سازنده (Merk-Germany) تهیه و توسط اتوکلاو استریل شدند. به منظور حذف آلودگی برای سنجش پتانسیل ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره‌های مورد نظر، ابتدا عصاره‌های مذکور از فیلترهای سرسنگی ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون عبور داده شدند. سپس با ایجاد چاهک بر محیط کشت مولر هیتون آگار برای تست میکروبی و ساب‌رودکستروز آگار به منظور سنجش اثر ضد قارچ به روش ساعتی، غلظت‌های متفاوت عصاره‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی اثر ضد باکتریایی در چهار عصاره به دست آمده از *Siphonaria carbo*، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته هر باکتری در محیط مولر هیتون مایع، سوسپانسیون میکروبی آماده گردید. سپس با استفاده از لوپ، روی سطح محیط مولر هیتون آگار که جامد است، کشت یکنواخت و پوشاننده

Siphonaria carbo یکی از گونه‌های بومی سواحل خلیج فارس به ویژه در استان بوشهر است که در مناطق صخره‌ای جزر و مدی زندگی می‌کنند. قطر صدف این گونه تا ۴ سانتی‌متر بوده و رنگ آن مایل به قهوه‌ای است. مجرای دهانی آن کوتاه و ماهیچه‌ای بوده و اسفنکتر توسعه یافته است. این گونه دارای مری و غده‌های بزاقی است و سیستم تناسلی در هموسل قرار دارد (Simone and Seaba, 2017). در این مطالعه، به منظور غربالگری اولیه، ویژگی‌های زیست پزشکی، خواص ضد باکتریایی و آنتی-اکسیدانی عصاره‌های الکلی و آبی این خارچسب مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱ نمونه‌برداری

خارچسب *Siphonaria carbo* از مناطق جزر و مدی صخره‌ای بوشهر در منطقه بهمی گردآوری گردید. به منظور حفظ ترکیبات زیست فعال این شکم‌پا، نمونه‌ها روی یخ به آزمایشگاه اکولوژی دانشگاه خلیج فارس انتقال یافتند. سپس پوسته نمونه‌ها جدا گردیدند و چندین بار شست و شو یافتند تا هر گونه گل و لای اضافی خارج گردد. در ادامه، حلزون‌ها جهت نگهداری تا ادامه آزمایش‌ها در دمای ۲۰- نگهداری شدند (Simone and Seaba, 2017).

۲-۲ عصاره‌گیری از بافت تر

عصاره‌گیری به منظور جدا کردن ترکیبات قابل حل در یک محلول و یا جدا کردن برخی ترکیبات از یک مخلوط جامد صورت می‌گیرد. استخراج ترکیبات آلی بافت‌های گیاهی یا جانوری، به کمک روش‌های مختلفی از جمله خیساندن، هضم کردن و دم کردن انجام می‌گردد (Jamali et al., 2010). در پژوهش حاضر از روش خیساندن به منظور جداسازی ترکیبات و خشک کردن استفاده شد. به منظور عصاره‌گیری در هر بار عصاره گرفتن، با نسبت ۴:۱ مقدار ۲۵۰ گرم نمونه تر با حلال‌های آب و اتانول ۹۶ درصد به نمونه‌ها اضافه گردید و بعد از ۷۲-۹۶ ساعت مخلوط شدند و توسط شیکر هم زده شدند، سپس ظرف دربردارنده نمونه با فویل آلومینیومی پوشیده شدند و به مدت ۹۶

۱- بوتانول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانش شدند (Ohkawa et al., 1979).

۲-۶ آنالیز آماری

تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای مقایسه میانگین توانایی ضد باکتریایی و ضد قارچی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها (P= ۰/۰۵) به کار رفت. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار از آزمون چند دامنه‌ای دانکن، با استفاده از بسته نرم افزاری Mini Tab، نسخه ۱۶ به منظور تعیین غلظت بهینه استفاده گردید.

۳. نتایج و بحث

حضور ترکیبات ضد باکتریایی در بسیاری از جانوران دریایی به عواملی نظیر محیط زندگی جاندار و نوع تغذیه‌ی آن‌ها بستگی دارد (Gooding et al., 2009). بنابراین، وجود ترکیبات زیست فعال موثر در یک گونه یا جنس در یک گستره جغرافیایی، موید وجود همان ویژگی‌ها در سایر نقاط نیستند. تفاوت فصل‌ها نیز می‌تواند روی اثربخشی ترکیبات ثانویه موجود موثر باشند. عدم مشاهده تاثیر ضد باکتریایی قوی در عصاره‌های استخراجی از گونه مورد مطالعه نسبت به سایر گونه‌های فاقد پوشش سخت خارجی، در برخی مطالعات دیگر هم مشاهده شده است. این امر را می‌توان به نقش محافظتی بالای پوشش صدفی در برابر عوامل بیماری‌زا نسبت داد (Mohammadzadeh et al., 2013). در واقع بررسی مکانیسم‌های دفاعی موجودات می‌تواند تا حدودی اثرات مورد انتظار را برای ما روشن سازد. اگرچه برخی گونه‌های مشابه دارای اثرات ضد باکتریایی مناسبی بوده‌اند و ترکیبات زیست فعال مهمی از آنها شناسایی و جداسازی شده‌اند، اما در این غربالگری اولیه تاثیر ضد میکروبی بالایی مشاهده نشد. بررسی مطالعه حاضر نشان‌دهنده وجود سطوحی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در گونه مورد نظر بود. بنابراین آنالیزهای دقیق و بررسی‌های جزئی‌تر می‌تواند ماهیت این ترکیبات زیست‌فعال را روشن ساخته و در راستای دستیابی به ترکیبات نوین دریایی به ویژه مواد ضد سرطان راه‌گشا باشند. جانوران دریایی و ترکیبات زیست فعال موجود در آن‌ها، منبع وسیع و قابل دسترسی بوده که می‌توان در جهت یافتن ترکیبات دارویی نوین از آن‌ها استفاده نمود. جنس سیفوناریا از جنس‌هایی است که نسبت به سایر

پلیت صورت گرفت. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر توسط بور در سطح محیط کشت ایجاد گردید و عصاره‌های مورد ارزیابی با نمونه بردار^۱ در آن‌ها تزریق شدند. به نحوی که در این مرحله ۱۰۰ میکرو لیتر از غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در چاهک ریخته شدند و به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کشت داده شدند. در این آزمون از دیسک کاغذی تتراسایکلین در چاهک وسط پلیت به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (Bano and Ayub, 2012; Murray et al., 1995). برای انجام آزمون ضد قارچی، ابتدا از کشت ۲۴ ساعته قارچ *Saprolegnia parasitica* کشت تازه‌ای در محیط سابوردکستروز^۲ مایع به روش چشمی کدورت معادل نیم - مک‌فارلند^۳، سوسپانسیون قارچی تهیه گردید. سپس مطابق با روش گفته شده در مورد باکتری‌ها مراحل کار صورت گرفت و از مالاشیت گرین^۴ به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. قارچ مورد نظر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شد. میزان بافت مورد استفاده ۵۰ گرم بود (Murray et al., 1995). کلیه تیمارها با سه بار تکرار انجام شدند.

۲-۵ آزمون آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هر چهار عصاره مورد نظر از روش MDA (مالون‌دی‌آلدئید) استفاده گردید. هر نمونه با سه بار تکرار آزمایش شد. در ارزیابی میزان پراکسیداسیون لیپیدها، مولکول مالون‌دی‌آلدئید به عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها است. کاهش تولید MDA نشان‌دهنده مهار پراکسیداسیون لیپید و خاصیت آنتی‌اکسیدان می‌باشد. مولکول‌های MDA در شرایط اسیدی و دمای بالا با تیوباربیتوریک اسید (TBA) واکنش داده و مجموعه 2 MDA-TBA را با رنگ ارغوانی تشکیل می‌دهند که شدت رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. عصاره‌ها با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. مقدار ۱ میلی‌لیتر از عصاره‌ها با ۳ میلی‌لیتر TBA ۰/۲٪ و ۲/۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۰/۰۵ مول مخلوط شدند. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند و به مدت ۵ دقیقه در یخ خنک شدند. مواد رنگی موجود با استفاده از

¹ Sampler

² Sabouraud Dextrose

³ 0.5 McFarland

⁴ Malachite green

ترکیب مالون‌دی‌آلدهید یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی است که از پراکسید شدن آراشیدونیک اسید حاصل می‌گردد. این ترکیب فرآورده نهایی تجزیه لیپیدها توسط گونه‌های فعال اکسیژن است (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۱) مالون‌دی‌آلدهید با ماکرومولکول‌هایی مانند اسیدهای آمینه، پروتئین و اسید نوکلئیک واکنش نشان می‌دهد (Pryor et al., 1976). وجود اسیدهای چرب غیراشباع در غشا سلولی و حساسیت لیپیدها به تهاجم رادیکال‌های آزاد در فرآیند پراکسیداسیون چربی موجب مرگ سلولی می‌گردند (هاشمی و همکاران، ۲۰۱۱). به واسطه حضور احتمالی ترکیبات قطبی در عصاره‌های آبی نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی حلزون دریایی *Siphonaria carbo* مشاهده شده است.

تاکنون مطالعات انجام شده روی جنس سیفوناریا منجر به شناسایی چندین مولکول به عنوان ترکیبات شناخته‌شده دارای ویژگی‌های زیست‌پزشکی جانور معرفی گردیده‌اند (Bromley et al., 2012). برای مثال ترکیبات زیستی مسوول بعضی خواص زیست‌پزشکی موجود در *Siphonaria japonica* شامل کلسترول و استئاریک اسید هستند (Bromley et al., 2012). به دلیل وجود کلسترول در دیواره سلولی جانورانی نظیر شکم‌پایان، نقش آنتی-اکسیدانی این ترکیب می‌تواند دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر در عصاره الکلی باشد (Britton, 1984; Manker et al., 1989). با توجه به مقاومت‌های دارویی موجود در زمینه باکتری و قارچ‌های بیماری‌زا، آزمون‌های ضد باکتریایی و قارچی به منظور یافتن منابع آنتی‌بیوتیک طبیعی صورت می‌گیرند. در بررسی‌های انجام شده با استفاده از شکم‌پایان، اثرات متفاوت ضد باکتریایی و ضد قارچی مشاهده شده است. این تفاوت‌ها به دلیل نوع گونه مورد بررسی، منطقه جغرافیایی، رژیم متفاوت غذایی و نوع عصاره-گیری هستند (Bano and Ayub, 2012). پکتیناتون یک آنتی-بیوتیک پلی پروپیونات با حلقه y-هیدروکسی-a پیرون است که از خارچسب *Siphonaria pectinata* جدا شده و دارای اثر ضد باکتریایی است (Biskupiak et al., 1983). Ravi و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه روی اثر ضد باکتری عصاره‌های استونی و متانولی دو شکم‌پای *Hemifusus pugilinus* و *Natica didyma* روی باکتری‌های *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus*، *Bacillus subtilis* و *Enterobacter aerogenes* اثرات ضد باکتریایی معنی‌داری گزارش شدند ($P < 0.05$). قوی‌ترین اثر مربوط به عصاره متانولی شکم‌پای *Neverita didyma* نسبت به

گونه‌های دریایی مانند خیار دریایی و یا اسفنج، پژوهش‌های نسبتاً اندکی روی آنها انجام شده ولی دستاوردهای ارزشمندی داشته‌اند که بررسی روی آنها منجر به شناسایی و تعیین اثر چندین ترکیب زیست فعال شده است (Carballeira et al., 2001; McQuaid et al., 1999; Paul et al., 1997).

در این مطالعه کلیه عصاره‌ها جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی بر باکتری‌های *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و قارچ *Saprolegnia parasitica* به روش چاهک‌گذاری در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های استخراجی دارای اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی نبودند ($P < 0.05$). در بررسی حاضر بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده مربوط به عصاره اتانولی خشک با کمترین میزان پراکسیداسیون چربی ((انحراف استاندارد \pm میانگین) 0.49 ± 0.54) و کمترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به عصاره آبی‌تر بود که دارای بیشترین میزان پراکسیداسیون چربی ((انحراف استاندارد \pm میانگین) 0.74 ± 0.44) می‌باشد ($P < 0.05$). فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو عصاره دیگر در بین این مقادیر قرار داشت که به ترتیب برای عصاره‌های آبی خشک و اتانولی تر (میانگین 1.15 ± 0.42 و میانگین 0.74 ± 0.32) بودند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون دانکن، ن‌آنیشت‌رنش‌لغات در این زمینه چسب مشاهده شد. ان دریایی بررسی کنونی به منظور ارزیابی برخی ویژگی‌های زیست پزشکی خارچسب دریایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی در مقایسه با عصاره‌های آبی، بیشتر است ($P < 0.05$). احتمالاً ترکیبات استخراج شده به آسانی با اتانول ترکیب می‌گردند. همچنین به دلیل کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های آبی احتمالاً این ترکیبات در آب غیرمحلول‌تر و غیرقطبی هستند. نتایج ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: نتایج ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف استخراجی از خارچسب دریایی

عصاره	تعداد نمونه	میانگین غلظت (nmol MDA/ml)	انحراف استاندارد	ضریب تغییرات (%)
آبی خشک	۳	۴۲/۷۶۵	۱/۱۵۳	۲/۷
آبی تر	۳	۴۴/۴۵۳	-/۷۴۱	۱/۶۷
اتانولی تر	۳	۳۲/۹۲۷	-/۷۴۱	۲/۲۵
اتانولی خشک	۳	۳۰/۵۴	-/۴۹۴	۱/۶۲

عصاره‌های استخراج شده از خارچه چسب مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان آن مربوط به عصاره اتانولی است. پیشنهاد می‌شود بررسی بیوشیمیایی دقیق برای تعیین ترکیبات موثر بر ویژگی آنتی‌اکسیدانی این گونه انجام گردد.

منابع

- هاشمی، ع؛ شمس، س؛ براتی، م؛ صمدانی، ع، ۲۰۱۱. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره متانولی گیاهان آویشن شیرازی، مورد و اسپند بروی سوش های استاندارد و ایزوله های بالینی پسودوموناس آئروژینوزا حاوی بتالاکتاماز با طیف وسیع. مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک، سال چهاردهم. شماره ۴. صفحات ۱۱۲-۱۰۴.
- Aher, V.D.; Wahi, A.; Pawdey, A.M.; Sonawane, A., 2011. Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue. *International Journal of Current Pharmacological Reserach*, 3(1): 810.
- Ansell, A.D.; Gibson, R.N.; Barnes, M., 1999. The biology of siphonariid limpets (Gastropoda: Pulmonata). *Oceanography and Marine Biology, An Annual Review*, 37: 245-314.
- Bandyopadhyay, U.; Das, D.; Banerjee, R.K., 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science-Bangalore*, 77: 658-666.
- Bano, A.; Ayub, Z., 2012. Antibacterial and antifungal activity in three species of *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata) collected from rocky ledge of Mubarak Village, Karachi. *Pakistan Journl of Zoology*, 44: 1493-1497.
- Biskupiak, J.E.; Ireland, C.M., 1983. Pectinatone, a new antibiotic from the mollusc *Siphonaria pectinata*. *Tetrahedron Letters*, 24(30): 3055-3058.
- Blaise, G.A.; Gauvin, D.; Gangal, M.; Authier, S., 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*, 208(2): 177-192.
- Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in Cell Biology*, 11(2): 66-75.
- Britton, K.M., 1984. The Onchidiacea (Gastropoda,

باکتری اشرفیاکولی با قطر هاله عدم رشد (۱۹/۳±۰/۳۹ میلی‌متر) بوده است (Ravi et al., 2012). در بررسی دیگری با استفاده از عصاره شکم‌پای *Hemifusus pugilinus* اثر ضد باکتریایی معنی‌دار بالایی روی *Staphylococcus aureus* با استفاده از عصاره متانولی آن مشاهده گردید (P<۰/۰۵) (Dhinakaran et al., 2011). همچنین در یکی از معدود پژوهش‌های انجام شده در سواحل پاکستان (Bano and Ayub, 2012)، با بررسی اثرات ضد باکتریایی انجام شده روی سه گونه از جنس *Siphonaria*، عصاره‌های مختلف سه گونه خارچه چسب سیفوناریا (*S. ashgar*، *S. belcheri* و *S. kurracheensis*) اثرات ضد باکتریایی معنی‌داری روی چندین گونه باکتری بیماری‌زا داشته‌اند. اما برخی دیگر از عصاره‌ها مانند عصاره هگزان، هگزان-کلروفورم گونه *S. ashgar* و عصاره هگزان، کلروفورم، عصاره آبی و آبی-متانولی *S. belcheri* و عصاره هگزان، کلروفورم، متانولی-کلروفورم، متانولی-آبی، کلروفورم-متانولی هیچ فعالیت ضد باکتریایی نداشته‌اند (Bano and Ayub, 2012). همچنین Bano و Ayub (۲۰۱۲) گزارش نمودند که هیچ کدام از ۳ گونه ذکر شده، اثر ضدقارچی روی *Aspergillus*، *C. glabrata*، *Candida albicans*، *Fusarium solani*، *Microsporium canis flavus* نشان ندادند. در پژوهش کنونی اثر ضد باکتریایی معنی‌داری مشاهده نشد. اثرات ضد باکتریایی در بین عصاره‌های مختلف و گونه‌های مختلف متفاوت است، که این تفاوت را می‌توان به تفاوت میزان ترکیبات موثر مانند پلی‌پروپیونات‌ها در بین گونه‌های مختلف و عصاره‌های مختلف نسبت داد. میزان ترکیبات پلی‌پروپیونات تابع رژیم غذایی هستند و تفاوت‌های بین گونه نیز زیاد است. بنابراین تفاوت‌های گونه‌ای و نوع عصاره‌گیری و حتی فصل نمونه‌برداری می‌توانند روی میزان اثر ضد باکتریایی عصاره‌های استخراجی موثر باشند (Jerez et al., 2006; Bromley et al., 2012).

۴. نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بررسی متابولیت‌های ثانویه جانداران دریایی، بررسی کنونی به منظور ارزیابی برخی ویژگی‌های زیست‌پزشکی خارچه چسب دریایی *Siphonaria carbo* انجام شد. نتایج به دست آمده نشان دادند، هیچ‌کدام از عصاره‌های استخراجی دارای اثر ضد باکتریایی و ضد قارچی بالایی برای ادامه مطالعات در این زمینه نبودند. ولی ویژگی آنتی‌اکسیدانی در

- hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. *Food and Chemical Toxicology*, 26(8): 717-723.
- Idsoe, O.; Guthe, T.; Willcox, R.R.; De Weck, A.L., 1968. Nature and extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bulletin of the World Health Organization*, 38(2): 159-188.
- Indap, M.M.; Pathare, S.P., 1998. Cytotoxicity and bioactivity of some marine animals. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 27(3&4): 433-437.
- Jamali, S.; Emtiazjoo, M.; Teymoori toolabi, L.; Zeynali, S.; Kaypoor, S.; Sardari, S.; Ramezani, A.; Azarang, P., 2010. Antibacterial effect of the Persian Gulf sea cucumber *Holothuria* sp. extracts on three strain of *Escherichia coli*. *Pathobiology Research*, 12(2): 37-49.
- Jerez, J.; Cueto, M.; Díaz-Marrero, A.R., 2006. The chemistry of marine pulmonate gastropods. In *Molluscs* Springer, 105-131PP.
- Lavanya, R.; Veerappan, N., 2011. Antibacterial potential of six seaweeds collected from Gulf of Mannar of southeast coast of India. *Advances in Biological Research*, 5(1): 38-44.
- Manker, D.C.; Faulkner, D.J.; Stout, T.J.; Clardy, J., 1989. The baconipyrones. Novel polypropionates from the pulmonate *Siphonaria baconi*. *The Journal of Organic Chemistry*, 54(22): 5371-5374.
- McQuaid, C.D.; Cretchley, R.; Rayner, J.L., 1999. Chemical defence of the intertidal pulmonate limpet *Siphonaria capensis* (Quoy and Gaimard) against natural predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 237(1): 141-154.
- 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*
- Pulmonata*) of Hong Kong with a worldwide review of the genera. *Journal of Molluscan Studies*, 50(3): 179-191.
- Bromley, C.L.; Popplewell, W.L.; Pinchuck, S.C.; Hodgson, A.N.; Davies-Coleman, M.T., 2012. Polypropionates from the South African marine mollusk *Siphonaria oculus*. *Journal of Natural Products*, 75(3): 497-501.
- Carballeira, N.M.; Cruz, H.; Hill, C.A.; De Voss, J.J.; Garson, M., 2001. Identification and total synthesis of novel fatty acids from the siphonarid limpet *Siphonaria denticulata*. *Journal of Natural Products*, 64(11):1426-1429.
- Centella, M.H.; Arévalo-Gallegos, A.; Parra-Saldivar, R.; Iqbal, H.M.N., 2017. Marine-derived bioactive compounds for value-added applications in bio-and non-bio sectors. *Journal of Cleaner Production*, 168: 1559-1565.
- Davies-Coleman, M.T.; Garson, M.J., 1998. Marine polypropionates. *Natural Product Reports*, 15(5): 477-493.
- Dhinakaran, A.; Sekar, V.; Sethubathi, G.V; Suriya, J., 2011. Antipathogenic activity of marine Gastropoda (*Hemifusus pugilinus*) from Pazhayar, South East Coast of India. *International Journal of Environmental Sciences*, 2(2): 524.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809): 239-247.
- Garson, M.J., 1993. The biosynthesis of marine natural products. *Chemical Reviews*, 93(5): 1699-1733.
- Gooding, R.A.; Harley, C.D.G.; Tang, E., 2009. Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23): 9316-9321.
- Grice, H.C., 1988. Safety evaluation of butylated

- Li, Z., 2005. Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37(4): 195-199.
- Ravi, C.; Karthiga, A.; Venkatesan, V., 2012. Isolation and biomedical screening of the tissue extracts of two marine gastropods *Hemifusus pugilinus* (Born, 1778) and *Natica didyma* (Roding, 1798). *Asian Fisheries Science*, 25: 158-169.
- Simone, L.R.L.; Maria Inês, G.L., 2017. Shell and body structure of the plesiomorphic pulmonate marine limpet *Siphonaria pectinata* (Linnaeus, 1758) from Portugal (Gastropoda: Heterobranchia: Siphonariidae). *Folia Malacologica*, 25(3): 147-164.
- Smith, P.; Hiney, M. P.; Samuelsen, O.B., 1994. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 273-313.
- Association of the United Kingdom, 93(5): 1401-1405.
- Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H.; Morgan, D.R., 1995. *Manual of clinical microbiology* (6th edn). *Trends Microbiol*, 3: 449-449.
- Norcross, R.D.; Paterson, I., 1995. Total synthesis of bioactive marine macrolides. *Chemical Reviews*, 95(6): 2041-2114.
- Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2): 351-358.
- Paul, M.C.; Zubía, E.; Ortega, M.J.; Salvá, J., 1997. New polypropionates from *Siphonaria pectinata*. *Tetrahedron*, 53(6): 2303-2308.
- Pryor, W.A.; Stanley, J.P.; Blair, E., 1976. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: II. A suggested mechanism for the formation of TBA-reactive materials from prostaglandin-like endoperoxides. *Lipids*, 11(5): 370-379.
- Qi, H.; Zhang, Q.; Zhao, T.; Chen, R.; Zhang, H.; Niu, X.;