مطالعه‌ی خواص ضد میکروبی ترکیبات فلاونوئیدی اسفنج دریایی *Gelliodes carnosa* (خلیج فارس)

- **محمد صادق خاکشور:** گروه زیست شناسی دریا، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
- **جمیله پازوکی*:** گروه زیست شناسی دریا، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۱

چکیده:

اسفنج دریایی گونه‌ی *Gelliodes carnosa* از آبهای ساحلی استان بوشهر و از عمق ۶-۵ متری جمع آوری و ترکیبات فلاونوئیدی آن طبق روش‌های استاندارد استخراج شد. فعالیت ضد باکتری و ضد قارچی عصاره‌ی فلاونوئیدی بدست آمده به روش دیسک‌گذاری روی ۱۴ میکروارگانیسم بیماریزا (PTCC 1189) *Staphylococcus aureus*، (PTCC 1156) *Bacillus subtilis*، (PTCC 1763) *Escherichia coli*، (PTCC 1310) *Pseudomonas aeroginosa*، (PTCC 1076) *Proteus mirabilis*، (PTCC 5027) *Candida albicans*، (PTCC 5248) *Fusarium solani*، (PTCC 5223) *Aspergillus niger*، *Serattia marcescens*، *Klebsiella pneumonia*، *Saprolegnia parasitica*، *Saprolegnia* sp.، *Fusarium* sp.1 و *Fusarium* sp.2 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت ۵۸درصد از این میکروارگانیسم‌ها توسط عصارههای فلاونوئیدی متوقف گردید. خواص ضد قارچی این ترکیبات نسبت به خواص ضد باکتری آنها کمتر بود. فعالیت بازدارندگی رشد این ترکیبات روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی بود و قطر هاله‌های عدم رشد بدست آمده بین ۱۴-۹ میلیمتر بودند. بیشرین تاثیر این عصاره روی باکتری‌های *B. subtilis* و *P. mirabilis* بترتیب با هاله‌ی عدم رشد ۱۴ و ۱۳ میلیمتر بود. اثر بازدارندگی ترکیبات فلاونوئیدی روی قارچ‌های رشته‌ای به جز قارچ‌های ساپرولگنیه ضعیف بود. با توجه به این نتایج می‌توان اسفنج *Gelliodes carnosa* را بعنوان منبعی جدید برای ترکیبات فلاونوئیدی برای مقابله با برخی عوامل بیماری زا معرفی کرد.

لغات کلیدی: اسفنج‌های دریایی، ضد میکروبی، فلاونوئیدها، خلیج فارس

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: pazooki2001@yahoo.com

مقدمه

از آنجایی که داروهای سنتزی اثرات جانبی مختلفی روی سلامت انسان دارند، لذا علاقه به بررسی و معرفی ارگانیسم‌های با فعالیت دارویی مختلف افزایش یافته است. بعلاوه میکروارگانیسم‌های بیماریزا در برابر اکثر عوامل ضد میکروبی ساخته شده مقاومت نشان می‌دهند که یک نگرانی جدی می‌باشد (۱ ، ۹، ۸ و ۱۱) . به همین دلیل کشف داروهای جایگزین و طبیعی از گیاهان و جانوران خصوصا ارگانیسم های دریایی مورد نیاز می‌باشد (۱۱و ۵). تولیدات طبیعی دارای منابع غنی از عوامل ضد میکروبی با خواص سمی پایین و رنج مناسب و کافی از فعالیت های دارویی می‌باشند که آنها را بدون هیچ گونه دستکاری شیمیایی جهت استفاده های درمانی مناسب می سازد(۹). اقیانوس‌ها نیز به عنوان یک منبع غنی از تولیدات طبیعی با ساختارهای منحصربفرد بوده که بیشترین تجمع مواد تاکنون از بی‌مهرگان دریایی خصوصا اسفنج‌ها گزارش شده است (۶، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۲ و ۲۴). تعداد ترکیبات طبیعی استخراج شده از ارگانیسم‌های دریایی در حال افزایش است، بطوریکه صدها ترکیب جدید هر ساله کشف می‌شوند (۱۳). بررسی عصاره‌های استخراج شده از ارگانیسم‌های دریایی یک روش معمول برای شناسایی ترکیبات با اهمیت زیستی هستند. مطالعات نشان داده است که متابولیت های ثانویه ی تولید شده بوسیله‌ی اسفنج‌ها شامل: ترپن‌ها، استرول هل، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، پلی‌کتیدها، پپتیدها و ... می‌باشند (۱۹و ۲۵). فلاونوئید ها جزو گروه های فنولی تولیدات طبیعی هستند که در اکثر ارگانیسم های دریایی دیده می شوند. خواص ضدمیکروبی، ضدقارچی، ضد ویروسی، ضد التهاب، ضد آلرژی، آنتی اکسیدانی، ضد توموری، سیتوتوکسیتی و... آنها شناخته شده است (۷، ۸، ۱۲، ۱۷و۲۱). جنس *Gelliodes* با ۴۲ گونه گزارش شده یکی از متنوع‌ترین جنس‌های اسفنج‌های دریایی می‌باشد. گزارش پراکنش گونه‌ی *Gelliodes carnosa* (Dendy, 1889) که موضوع این مطالعه می‌باشد از جنوب اقیانوس هند و سریلانکا بوده و تنها در آبهای شور وجود دارد. این جنس در خلیج فارس نیز تاکنون تنها از خلیج نایبند در سال ۲۰۰۹ توسط صفائیان و همکاران گزارش شده است. با توجه به اینکه تاکنون در آبهای خلیج فارس ترکیبات فلاونوئیدی از اسفنج های دریایی گزارش نشده است، در این مطالعه هدف استخراج ترکیبات فلاونوئیدی و بررسی خواص ضد باکتری و ضد قارچی این ترکیبات در محیط آزمایشگاهی بوده است.

مواد و روشها

جمع‌آوری و شناسایی نمونه: نمونه‌های اسفنجی در تابستان سال ۱۳۸۹ از آبهای دور از ساحل استان بوشهر از عمق ۵ متری جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری در داخل ظروف یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان شروع آزمایش‌ها در دمای ۱۸- سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه‌های اسفنجی در آزمایشگاه با آب شسته و نمک و ذرات نخاله و بی مهره‌های متصل به آن جدا شدند. شناسایی نمونه‌ها نیز با استفاده از مشخصات ظاهری، بافتی و محیطی و همچنین با استخراج اسپیکول از اسفنج و بررسی ویژگی‌های آن صورت گرفت.

استخراج ترکیبات فلاونوئیدی: آزمایشات مورد نظر در آزمایشگاه تحقیقات و بیوتکنولوژی آبزیان دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی انجام شد. ۲۵ گرم از اسفنج خیس را در ابعاد کوچک خورد کرده، در ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد خیسانده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط روی شیکر و با سرعت ۲۴۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس عصاره‌ی بدست آمده را با کاغذ صافی واتمن شماره‌ی ۱ صاف کرده و حجم آن با دستگاه روتاری Ika-Werke (ساخت آلمان) به ۵۰ میلی‌لیتر رسید. به نسبت ۱:۱ به عصاره‌ی حاصله آب مقطر اضافه کرده و حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به عصاره‌ی یکنواخت بدست آمده ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه کرده و پس از ایجاد دو فاز مختلف فاز کلروفرمی را که حاوی ترکیبات با قطبیت پایین بود دور ریخته شد. فاز آبی جدا شده را درون دکانتور ریخته و به نسبت ۱:۱ به آن اتیل استات اضافه گردید. فاز آلی اتیل استاتی که حاوی ترکیبات فلاونوئیدی است را جمع‌آوری کرده و پس از حلال پرانی (تبخیر حلال با استفاده از دستگاه روتاری و به جای ماندن ماده‌ی استخراجی) وزن خشک ترکیبات فلاونوئیدی رسوب شده محاسبه گردید. ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده، مجددا در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول حل شدند (۵ و ۱۷).

تهیه‌ی نمونه‌های باکتریایی و قارچی: در این مطالعه ۲ باکتری گرم مثبت، ۵ باکتری گرم منفی، ۱ مخمر و ۶ قارچ رشته‌ای استفاده شده است.

Bacillus subtilis ،*Staphylococcus aureus* (PTCC, 1189) ،(PTCC, 1156) ،*Escherichia coli* (PTCC, 1763) ،*Proteus mirabilis* (PTCC, 1076) ،*Peudomonas aeroginosa* (PTCC, 1310) *Candida albicans* (PTCC, 5027) ،*Fusarium solani* (PTCC, 5248) و *Aspergillus niger* (PTCC, 5223) از سازمان پژوهش‌های علمی-صنعتی(کلکسیون باکتری و قارچ های زنده) تهیه شدند. همچنین *Serattia marcescens* ، *Klebsiella* pneumonia ، *Fusarium* sp.1 و *Fusarium* sp.2 از آزمایشگاه تحقیقات میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی صنعتی و آزمایشگاه تحقیقات قارچ شناسی و جلبک‌شناسی دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تهیه شدند. اما قارچهای *Sapolegnia parasitica* و *Saprolegnia* sp. از تخم ماهی قزل‌آلا جداسازی شدند. بدینصورت که تخم ماهی قزل‌آلا از مرکز بین‌المللی تکثیر و پرورش ماهیان سرد آبی شهرستان تنکابن جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. تخمها را در اتانول ۳۰ درصد شسته و سپس چند تخم را بصورت گستره روی محیط کشت PDA (Potato Dextros Agar) در آورده و محیط کشت ها به مدت ۲ روز در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در ادامه با چند بار کشت دادن متوالی این قارچهای ایجاد شده از محیط کشت اولیه آن را بصورت خالص در آورده و از آن جهت تست ضد قارچ استفاده شد (۱۸و ۲۴).

آزمایش دیسک‌گذاری: برای شروع آزمایش دیسک‌گذاری باید کلنی‌های تازه و جوانی از باکتری و قارچها تهیه شود. بدین منظور باکتری و قارچهای مورد نظر را بترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از انجام آزمایش روی محیط کشت های مولر هینتون آگار (MHA) و پتیتو-دکستروز آگار (PDA) کشت داده شدند. باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و قارچها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در این مطالعه محیط کشت های نوترینت آگار (NA) جهت کشت و نگهداری باکتری ها، مولر هینتون آگار (MHA) جهت تست دیسک دیفوژن باکتریایی، پتیتو-دکستروز آگار (PDA) برای تست دیسک دیفوژن قارچ ها استفاده شدند. به هر دیسک بلانک ۶ میلی متری ۲۰۰ میکرولیتر (۸۰۰ میکروگرم) از عصاره را تزریق و در دمای محیط خشک گردیدند. از دیسک های آغشته به متانول به عنوان شاهد منفی و دیسک‌های آنتی بیوتیکی Amoxicillin (25µg/disc) بعنوان شاهد مثبت برای باکتری‌ها و آنتی‌بیوتیک Nystatin (30µg/disc) برای قارچها مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری‌ها با غلظت ۰/۵ مک فارلند (حدود $۱/۲ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در میلی‌لیتر) تهیه گردیدند و همچنین قارچها با برداشتن چند کلنی مشابه و حل کردن آن در ۲ میلی‌لیتر آب مقطر غلظتی مشابه به ۰/۵ مک فارلند تهیه و روی محیط کشت‌های MHA و PDA کشت شدند. سپس دیسک های حاوی عصاره به همراه دیسک های شاهد منفی و مثبت و دیسک بلانک با فواصل مشخص روی محیط قرار داده و باکتری‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و قارچها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد کشت شدند. قطر هاله‌های عدم رشد برای باکتری‌ها پس از ۲۴ ساعت و قارچها پس از ۴۸ ساعت در مقیاس میلیمتر اندازه گیری و مورد بررسی قرار گرفت (۲، ۵، ۶، ۷و ۱۶).

آزمون های آماری: از برنامه‌ی SPPS ورژن ۱۹ برای آنالیز داده‌ها و برنامه‌ی Excel ۲۰۰۷ برای رسم نمودارها استفاده شد. نتایج تست اسمیرنو- کلوموگراف نشان داد که داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردار نیستند، به همین خاطر از لگاریتم داده‌ها برای کارهای آماری استفاده شد

نتایج

مقدار ماده‌ی خشک فلاونوئیدی بدست آمده از ۲۵ گرم وزن خشک اسفنج برابر با ۰/۰۴ گرم بود. نتایج تاثیر عصاره‌ی فلاونوئیدی و همچنین شواهد مثبت روی باکتری‌ها و قارچ ها بترتیب در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱: میانگین فعالیت ضد باکتری عصاره‌های فلاونوئیدی اسفنج گونه‌ی *Gelliodes carnosa* (میانگین±انحراف معیار)(۸۰۰ میکروگرم)

باکتری	*Staphylococcus aureus*	*Bacillus subtilis*	*Escherichia coli*	*Serattia marcesc*	*Proteus mirabilis*	*Pseudomonas aeroginisa*	*Klebsiella pnemonia*
عصاره ی فلاونوئیدی	۱۱/۳۳±۱/۱۵	۱٤±۱	۱۰/٦٦±۱/۱۵	۰	۱۳±۱	۰	۰
Amoxicillin(25µg/dis	۱۷	۱٤	۱۸	۱۱	۱۵	۱۳	۱٦

میانگین هاله‌های عدم رشد باکتریایی در مقیاس (میلی‌متر) می‌باشد
قطر منطقه‌ی ممانعتی به همراه قطر دیسک (۶ میلی‌متر) می‌باشد

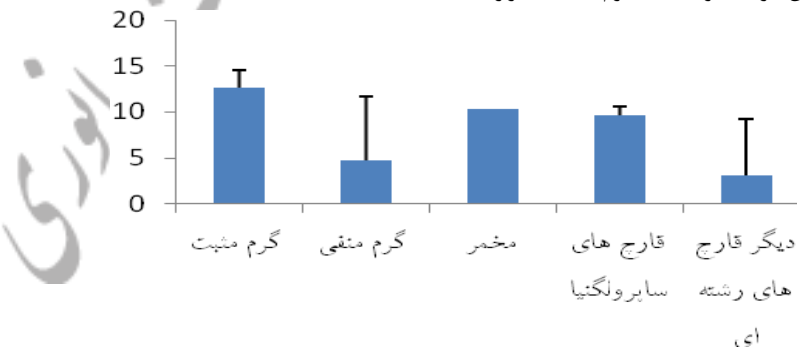
جدول ۲: میانگین فعالیت ضد قارچی عصاره‌های فلاونوئیدی اسفنج گونه‌ی *Gelliodes carnosa* (میانگین±انحراف معیار)(۸۰۰ میکروگرم)

قارچ	*Candida albicans*	*Fusarium solani*	*Fusariu ۱m* sp.	*Fusariu ۲m* sp.	*Aspergillus niger*	*Saprolegnia parasitica*	*Saprolegnia* sp.
عصاره‌ی فلاونوئیدی	۱۰/۳۳±۰/۵۷	۰	۰	۰	۱۲/۳۳±۲/۰۸	۱۰/۳۳±./۵۷	۹±۱
Nystatin (30µg/disc)	۱۰	۱٦	۱۸	۱۷	۱۱	۱۵	۱٦

میانگین هاله‌های عدم رشد باکتریایی در مقیاس (میلیمتر) می باشد
قطر منطقه ی ممانعتی به همراه قطر دیسک (۶ میلیمتر) می‌باشد

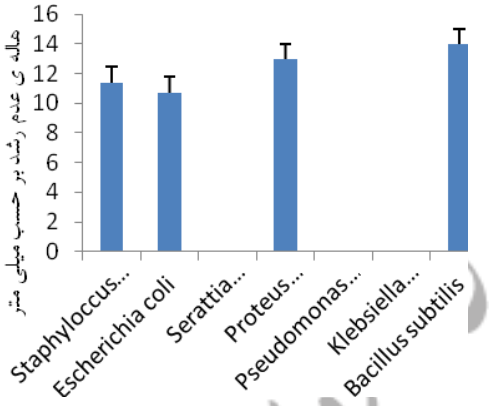
از بین میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد مطالعه حساسیت باکتری‌ها بیشتر از قارچ‌ها بود. بطوریکه میانگین هاله‌ی عدم رشد باکتری‌ها ۶/۹۹ میلیمتر و قارچ‌ها ۵/۹۹ میلیمتر بود. در بین باکتری‌ها نیز باکتری‌های گرم مثبت با میانگین هاله‌ی عدم رشد ۱۲/۶۶ میلیمتر بیشترین حساسیت را از خود نشان دادند. *Candida albicans* و گونه‌های ساپرولگنیا، باکتری‌های گرم منفی و سایر قارچ‌ها بترتیب با میانگین ۱۰/۳۳، ۹/۶۶، ۴/۷ و ۳ میلیمتر هاله‌ی عدم رشد پس از باکتری‌های گرم مثبت قرار داشتند (نمودار ۱). ۱۰۰ درصد باکتری‌های گرم مثبت، گونه‌های ساپرولگنیا و مخمر نسبت به عصاره‌ی فلاونوئیدی حساسیت نشان دادند. درحالیکه ۶۰ درصد باکتری‌های گرم منفی و ۷۵ درصد سایر قارچ‌های رشته‌ای (Fusarium) در برابر ترکیبات فلاونوئیدی از خود مقاومت نشان دادند. اما در کل ۴۲ درصد از میکروارگانیسم‌های پاتوژن مورد مطالعه در برابر ترکیبات فلاونوئیدی حساسیتی از خود نشان ندادند.

اندازه‌ی هاله‌ی عدم رشد بین ۱۴-۹ میلیمتر مشاهده شد.

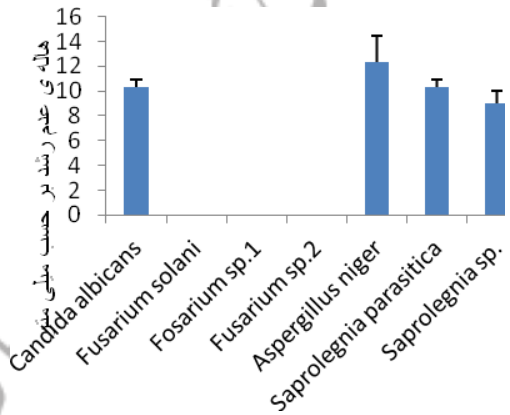


نمودار ۱: میانگین حساسیت میکروارگانیسم‌های پاتوژن در برابر ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده

بیشترین ممانعت رشد روی *B. subtilis*، *P. mirabilis* و *A. niger* به ترتیب با ۱۴، ۱۳و ۱۲/۳۳ میلیمتر بود. سویه‌های *S. marcescens*، *P. aeroginosa*، *K. pneumonia*، *F. solani* و *Fusarium* sp.1 و *Fusarium* sp.2 با عدم تشکیل هاله کمترین حساسیت را از خود نشان دادند. حساسیت باکتری‌ها و قارچ‌های مورد مطالعه در نمودارهای ۲ و ۳ آورده شده است.



نمودار۲: فعالیت ضد باکتری عصاره‌ی فلاونوئیدی اسفنج *Gelliodes carnosa* بر روی ۷ گونه ی باکتریایی



نمودار۳: فعالیت ضد قارچی عصاره‌ی فلاونوئیدی اسفنج *Gelliodes carnosa* روی ۷ گونهی قارچ

بحث

بررسی عصاره‌های استخراج شده از بی‌مهرگان دریایی یک روش معمول برای شناسایی ترکیبات با اهمیت زیستی هستند. حتی میکروارگانیسم‌هایی که در ارتباط با میزبان‌های بی‌مهره‌ی خود هستند نیز بعنوان منبعی از متابولیت‌های زیستی در نظر گرفته می‌شوند (۲۵). با توجه به اینکه اکوسیستم دریایی از تنوع بسیار بالایی نسبت به خشکی برخوردار بوده و ارگانیسم‌های

بی‌مهره و خصوصا ارگانیسم‌های بدون صدف دائما در معرض مهاجمین و پاتوژن‌های مختلف می‌باشد، منطقی به نظر می‌رسد که این بی مهره‌ها حاوی ترکیبات دفاعی مختلف در بدن خود باشند. به همین خاطر توجه به محیط دریایی برای استخراج ترکیبات جدید برای مبارزه با بیماری‌های مختلف افزایش یافته است (۱۰). طی سالهای گذشته ترکیبات و ساختارهای با فعالیت زیستی بالا از ارگانیسم‌های دریایی تهیه شده است که ۳۳ درصد از این ترکیبات متعلق به اسفنج‌ها می‌باشند (۱۸و ۲۱). از بین باکتری‌ها و قارچ‌هایی که غالبا باعث ایجاد بیماری در انسان می‌شوند می‌توان به *S. aureus* ، *C. albicans* و *A. niger* اشاره کرد (۲۴). به همین خاطر سعی شده است تا این میکروارگانیسم‌های بیماریزا نیز در این مطالعه استفاده شوند. نتایج تست دیسک دیفوژن نشان داد که مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات فلاونوئیدی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بود. این مسئله توسط McCaffrey and Endean در سال ۱۹۸۵ و Amade و همکاران (۱۹۸۷) که در زمینه‌ی بررسی خواص ضد میکروبی تولیدات طبیعی دریا فعالیت داشتند اشاره شده است. Hendra و همکاران (۲۰۱۱) با آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی و بررسی فعالیت ضد میکروبی اندام های مختلف گیاه *Phaleria macrocarpa* نتایج مشابه با این مطالعه بدست آوردند (۱۱). مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی به علت حضور یک غشای خارجی در اطراف آنها است که دسترسی عوامل ضد میکروبی به اهدافشان در داخل سلول باکتریایی را محدود می‌کند (۱۱). اما Basile و همکاران (۱۹۹۶)،Hernandez و همکاران (۲۰۰۰) با تحقیق در زمینه‌ی خواص ضد میکروبی ترکیبات فلاونوئیدی گیاهان دارویی و Cushnie و همکاران (۲۰۰۳) نتایج متفاوتی را نشان دادند و مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در برابر ترکیبات فلاونوئیدی را گزارش کردند. با این وجود تاثیر کمتر ترکیبات آنتی بیوتیکی روی باکتری‌های گرم منفی محدود به ترکیبات فلاونوئیدی نمی‌باشد (۱۱). با این وجود Cai و همکاران (۲۰۱۰) دریافتند که ترکیبات فلاونوئیدی بیشتر روی باکتری‌های گرم منفی موثرند. اما برخی دیگر از مطالعات نیز مقاومت برابر ی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت را در برابر ترکیبات فلاونوئیدی گزارش کرده‌اند (۲۰). اهمیت درمانی این ترکیبات به این خاطر است که این ترکیبات بصورت انتخابی مانع رشد یک باکتری یا قارچ مشخص شده و روی دیگر میکروارگانیسم‌ها اثر ندارد (۲). در مطالعات گذشته گزارش شده است که وجود خاصیت ضد میکروبی به علت حضور عوامل شیمیایی مختلف از جمله روغن‌های ضروری، فلاونوئید ها، ترپنوئیدها، آلکالوئید ها، تانین ها ، پلی‌فنول‌ها و دیگر ترکیبات طبیعی یا گروههای هیدروکسیل آزاد می‌باشد که در گروه ترکیبات با خاصیت ضد میکروبی طبقه‌بندی می‌شوند (۲۱). در این مطالعه نشان داده شد که بطور میانگین مقاومت قارچها (۵/۹۹ میلیمتر) در برابر ترکیبات فلاونوئیدی نسبت به باکتری‌ها (۶/۹۹ میلیمتر) بیشتر است. اما بطور موردی هاله‌ی عدم رشد بعضی از قارچها از بعضی از باکتری‌ها بیشتر بود. به عنوان مثال قارچهای *C. albicans* ، *A. niger* و *S. parasitica* هاله‌های عدم رشد بیشتری نسبت به *F.solani* ، *Fusarium* sp.1 و *Fusarium* sp.2 داشتند. مقاومت بیشتر قارچها را می‌توان به تفاوت‌های ساختاری ارگانیسم‌های یوکاریوت و پروکاریوت ارتباط داد (۲۲). رنج هاله‌های عدم رشد در این مطالعه بین ۱۴-۹ میلیمتر بود. حساسترین ارگانیسم‌ها نسبت به ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده *B. subtilis* (۱۴ میلیمتر)، *Proteus mirabilis* (۱۳ میلیمتر)، *A. niger* (۱۲/۳۳ میلیمتر) و *Staphylococcus aureus* (۱۱/۳۳ میلیمتر) بودند. میکروارگانیسم‌های *S.marcescens* ،*K. pneminia* ،*F. solani* ،*Fusarium* sp.1 و *Fusarium* sp.2 بدون هیچگونه هاله‌ی عدم رشد کمترین حساسیت را نشان دادند. این نتایج با مطالعات Pepeljnjak و همکاران در سال ۲۰۰۵ که روی فعالیت ضد میکروبی فلاونوئیدهای گیاه گونه‌ی *Plargonium radula* صورت گرفت مطابقت دارد (۱۷). اما مطالعات Basile و همکاران (۱۹۹۹) با نتایج این مطالعه در تضاد می‌باشد، زیرا آنها نشان دادند که *P. aeroginosa* بیشترین حساسیت و *S. aureus* و *P. mirabilis* هیچ حساسیتی نسبت به ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده نشان ندادند. Hernandez و همکاران (۲۰۰۰) نیز نشان دادند که ترکیبات فلاونوئید بیشترین تاثیر را روی *P. aeroginosa* و *E. coli* و کمترین تاثیر را روی *B. subtilis* داشتند که در تضاد با نتایج این مطالعه می‌باشد. در بسیاری از دیگر مطالعات صورت گرفته این ترکیبات را روی *S. aureus* آزمایش کرده و نتایج قابل

قبول و همسویی با این تحقیق بدست آمده (۵،۶ و۱۱). اما *S. aureus* نسبت به بسیاری از ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از گیاهان دارویی نیز مقاومت نشان داده است (۲۱). اگر فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فلاونوئیدی که از ارگانیسم‌های گیاهی و جانوری تهیه شده‌اند را مورد بررسی قرار دهیم تفاوت‌هایی را بین نتایج مختلف مشاهده می‌کنیم که می‌تواند دلایل مختلفی داشته باشد. یکی از عواملی که احتمال می‌رود باعث ایجاد این تفاوت ها شود تکنیک استخراج است (۲۶). تا کنون برای استخراج ترکیبات فلاونوئیدی تکنیک‌های مختلفی بطور گسترده استفاده شده است. روش‌های سنتی استخراج مانند دما دادن، جوشاندن یا رفلکس جهت استخراج ترکیبات شیمیایی مانند فلاونوئیدها از ارگانیسم‌های زنده مورد استفاده قرار می‌گیرد. با این وجود نقایصی که این روش‌ها دارند میزان استخراج فلاونوئید را کاهش می‌دهند. از این نقایص می‌توان به یونیزه شدن، هیدرولیز و اکسید شدن ترکیبات فلاونوئیدی طی استخراج اشاره کرد. روش‌های نوینی مانند supercritical carbondioxide extraction، subcritical water extraction، ultrasonic assisted extraction و microwave extraction نیز بعنوان روش‌های جایگزین برای روش‌های سنتی مورد توجه قرار گرفته اند (۳و ۸). استفاده از هر کدام از این روش‌ها در میزان فعالیت عصاره‌ی بدست آمده موثر است. قطبیت حلال‌های مورد استفاده نیز در نوع گروه فلاونوئیدی استخراجی تاثیرگذار هستند، زیرا فلاونوئیدها حاوی رده‌های با قطبیت متفاوت می‌باشند (۳). با توجه به مطالب ذکر شده و حلال‌های استفاده شده در این مطالعه می‌توان احتمال داد که ترکیب فلاونوئیدی استخراج شده از اسفنج *Gelliodes carnosa* قطبیت بالایی داشته باشند. همچنین بررسی‌های متکی به میزان پخش ترکیبات فلاونوئیدی روی محیط کشت نیز ممکن است مقدار حقیقی از فعالیت ضد میکروبی ترکیب را حاصل نکند، زیرا ممکن است یک ترکیب فلاونوئیدی با قدرت ضد میکروبی بالا سرعت پراکنش کمی روی محیط کشت داشته باشد (۸ و ۹). با این وجود عوامل دیگری نیز در این تفاوت‌های مشاهده شده نقش دارند. از این عوامل می‌توان به مقدار باکتری یا قارچ تلقیح شده، مقدار و نوع براساس یا آگار، اندازه‌های چاهک‌ها، اندازه‌ی دیسک‌های کاغذی، سویه‌های مورد مطالعه خصوصا باکتری‌های مورد استفاده اشاره کرد (۸). Cai و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای تاثیر فاکتورهای مقدار و غلظت حلال، دما و زمان را روی میزان استخراج ترکیبات آلکالوئیدی از گیاه *Opuntia milpa alta* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که بیشترین بازده در شرایط غلظت ۹۰ درصد حلال اتانول، نسبت ۲۵ به ۵ حلال به مواد اولیه، دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و مدت زمان ۶ ساعت بدست آمد (۴). در زمان استخراج و استفاده از حلال‌ها اگر رسوب ترکیبات فلاونوئیدی اتفاق بیفتد باعث کاهش تماس بین سلول‌های باکتریایی و مولکول‌های فلاونوئید شده و ممکن است به اشتباه باعث گزارش عدم اثر ضد باکتریایی شود (۸) نوع عملکرد ضد میکروبی گروه‌های مختلف فلاونوئیدی نیز در میزان فعالیت ضد میکروبی آنها تاثیرگذار می‌باشد. مطالعه‌ی مروری Cushnie و همکاران (۲۰۰۵) روی نوع فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فلاونوئیدی نشان داد که برخی ترکیبات فلاونوئیدی به شدت بر روی سنتز DNA در باکتری *Proteus vulgaris* و سنتز RNA در *S. aureus* تاثیر می‌گذارد. سنتز پروتئین و لیپید نیز در مقادیر کمتر تحت تاثیر ترکیبات فلاونوئیدی قرار می‌گیرند. همچنین ترکیبات فلاونوئیدی باعث تخریب غشای پلاسمایی باکتری‌ها نیز می‌شوند. این مطالعات نشان داد که باکتری‌ها با تحرک خود مکان مناسب برای اتصال و آلوده کردن میزبان را پیدا می‌کنند. ترکیبات فلاونوئیدی با کاهش تحرک باکتری‌ها باعث کاهش بیماریزایی آنها می‌شوند. همچنین در دیگر مطالعه‌ی صورت گرفته روی *E. coli* و *S. aureus* گزارش کردند که این ترکیبات باعث اختلال در زنجیره‌ی تولید انرژی در غشای میتوکندری می‌گردد و از آنجایی که برای جذب ترکیبات مورد نیاز باکتری نیاز به انرژی دارد، از این طریق باعث از بین رفتن باکتری می‌شوند (۸). در این تحقیق فعالیت باکتریوستاتیک ترکیبات فلاونوئیدی استخراج شده از اسفنج *Gelliodes carnosa* به اثبات رسید که هم راستا با نتایج مطالعه‌ی و attanachaikusopon و Phumkhachorcn روی برگهای گیاه *Psidium guajava* در سال ۲۰۱۰ می‌باشد. استفاده از ترکیبات ضد میکروبی با خواص باکتریوستاتیک ممکن است اثرات جانبی کمتری نسبت به ترکیبات ضد میکروبی با خواص باکتریوسیدال داشته باشد.

این مطالعه نشان داد که ارگانیسم‌های دریایی و بخصوص اسفنج‌های دریایی می‌توانند به عنوان یک منبع قابل توجهی از متابولیت‌های جدید و با خواص ضد باکتری و ضد قارچی باشند و پیشنهاد می‌شود که اسفنج *Gelliodes carnosa* به عنوان منبعی از متابولیت های ثانویه با خواص ضد میکروبی قابل توجه مد نظر قرار گیرد.

منابع

1- Amade, P., Charroin, C., Baby C. and Vacelet, J., 1987. Antimicrobial activities of marine sponges from the Mediterranean Sea, France. Mar. Biol., Vol. 94, No. 2, pp.271-275.

2-Basile, A., Giordano, S., López-Sáez, A. and Cobianchi, R. C.,1999. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses, Spain. Phytochem., Vol. 52, No. 8, pp.1479-1482.

3-Bhadoriya, U., Tiwari, S., Mourya, M. and Ghule, S., 2011. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Zanthoxylum Budrunga* W. optimization of extraction process, India. Asian J. Pharm. Life Scie., Vol. 1, No. 1, pp.81-86.

4-Cai, W.; Gu, X. and TaNG, J., 2010. Extraction, Purification, and Characterisation of the Flavonoids from Opuntia milpa alta Skin, China. Czech J. Food Sci., Vol. 28, No. 2, pp.108-116.

5-Chaturvedi, A., Singh, S. and Nag, T., 2010. Antimicrobial activity of flavonoids from in vitro tissue culture and seeds of Gossypium species, India. *RomanianBiotechnological Letters.*, Vol. 15, No. 1, pp.4959-4963.

6-Chellaram, C., 2009. Bioactive Potential of Coral Associated Gastropod, *Trochus tentorium* of Gulf of Mannar, Southeastern India, India. J. Med. Sci., Vol. 9, No. 5, pp.240-244.

7-Collee, J.G., Fraser, A.G., Marmion, B.P. and Simmons, A., 1999. Mackie & McCartney practical medical microbiology, Churchill livingstone

8-Cushnie, T. and Lamb, A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids, UK. *International journal of antimicrobial agents.*, Vol. 26, No. 5, pp. 343-356.

9-Cushnie, T., Hamilton, V. E. S. and Lamb, A. J., 2003. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports, UK. Microbiol. Res., Vol. 158, No. 4, pp.281-289.

10-Devi, P., Wahidulla, S., Kamat, T. and D'Souza, L., 2011. Screening marine organisms for antimicrobial activity against clinical pathogens, India. Ind. J. of Ma. Sci., Vol. 40, No. 3, 338P.

11-Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A., Shukor, M. Y. and Oskoueian, E., 2011. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) boerl Fruit, Malaysia. Inter. J. Molec. Sci., Vol. 12, No. 6, pp.3422-3431.

12-Hernandez, N., Tereschuk, M. and Abdala, L., 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi Del Valle, Tucuman, Argentina. J. Ethnopharmacol., 73:317–322.

13-Hussain, S.M. and Ananthan, G., 2009. Antimicrobial activity of the crude extracts of compound Ascidians, *Didemnum candidum* and *Didemnum psammathodes* (Tunicata: Didemnidae) from Mandapam (South East Coast of India), India. *Curr.* Res. J. Biol. Sci., Vol. 1, No. 3, pp.168-171.

14-McCaffrey, E. and Endean, R., 1985. Antimicrobial activity of tropical and subtropical

madrasensis Sebastian, India. Ind. J. Sci. Technol., Vol. 3, No. 3, pp.303-304.

15-Natarajan, K.; Sathish, R.; Regupathi, T. and Riyaz, A., 2010. Antibacterial activity of crude extracts of marine invertebrate *Polyclinum madrasensis* Sebastian, India. Ind. J. Sci. Technol., Vol. 3, No. 3, pp.303-304.

16-Penecilla, G.L. and Magno, C.P., 2005. Antibacterial activity of extracts of twelve common medicinal plants from the Philippines, Philippines. Med. Plan. Res., Vol. 5, No.16, pp.3975-3981.

17-Pepeljnjak, S., Kalodera, Z. and Zovko, M., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids from Pelargonium radula (Cav.) L'Hérit, Croatia. Acta pharmaceutica-zagreb., Vol. 55, No. 4, 431P.

18-Qaralleh, H., Idid, S., Saad, S.; Susanti, D.; Taher, M. and Khleifat, K., 2010. Antifungal and Antibacterial Activities of Four Malaysian Sponge Species (Petrosiidae), Malaysia. J. Med. Mycol., pp.1-6.

19-Ramasamy, M.S. and Murugan, M., 2005. Potential antimicrobial activity of marine molluscs from tuticorin, Southeast coast of India against 40 biofilm bacteria, India. J. Shellfish Res., Vol. 24, No. 1, pp.243-251.

20-Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P., 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of Psidium guajava, Thailand. J. med. Res., Vol. 4, No. 5, pp.393-396.

21-Saravanakumar, A., Venkateshwaran, K., Vanitha, K., Ganesh, M., Vasudevan, M. and Sivakumar, T., 2009. Evaluation of antibacterial activity, phenol and felavenoid, Erode. Pak. J. Pharm. Sci., Vol. 22, No.3, pp.282-286.

22-Selvin, J. and Lipton, A., 2004. Dendrilla nigra, a marine sponge, as potential source of antibacterial substances for managing shrimp diseases, India. Aquaculture, Vol. 236, No. 4, pp.277-283.

23-Shafaghat, A. and Salimi, F., 2008. Extraction and Determining of Chemical Structure of Flavonoids in *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz. Bip. from Iran, Iran. J. Sci. (Islamic azad university., Vol. 18, No. 68, pp. 39-42.

24-Sionov, E., Roth, D., Sandovsky-Losica, H.,Kashman, Y., Rudi, A., Chill, L., Berdicevsky, I. and Segal, E., 2005. Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge Dysidea herbacea, Israel. J. Infect., Vol. 50, No. 5, pp.453-460.

25-Thakur, N.L. and Anil, A., 2000. Antibacterial activity of the sponge *Ircinia ramosa*: Importance of its surface-associated bacteria, India. J. Chem..l ecol., Vol. 26, No. 1, pp.57-71.

26-Veličković, D.T., Nikolova, M. T., Ivancheva, S. V., Stojanović, J.B. and Veljković, V.B., 2007. Extraction of flavonoids from garden (*Salvia*

officinalis L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration, Bulgarian. . Serbian Chemi. Soc., Vol. 72, No. 1, pp.73-80.

فصلنامه علمی-پژوهشی محیط زیست جانوری

Antimicrobial activity of flavonoid compounds from marine sponge *Gelliodes carnosa*(Persian Gulf)

- **Mohammad Sadegh Khakshoor:** Marine Biology group, Faculty of Bio-sciences, Shahid Behshti University, Tehran, Iran
- **Jamileh Pazooki*:** Marine Biology group, Faculty of Bio-sciences, Shahid Behshti University, Tehran, Iran

Received: April 2012 Accepted: October 2012

Keywords: Marine sponges, Antimicrobial, Flavonoids, Persian Gulf

Abstract

The sponge *Gelliodes carnosa* were sample from offshore Bushehr in the depth of 5-6m and flavonoid compounds extract from them with standard methods. This component were examined against fourteen microorganisms *Staphylococcus aureus* (PTCC 1189), *Bacillus subtilis* (PTCC 1156), *Escherichia coli* (PTCC 1763), *Pseudomonas aeroginosa* (PTCC 1310) ،*Proteus mirabilis*(PTCC 1076), *Candida albicans* (PTCC 5027), *Fusarium solani* (PTCC 5248), *Aspergillus niger* (PTCC 5223), *Serattia marcescens*, *Klebsiella pneumonia*, *Saprolegnia parasitica, Saprolegnia* sp., *Fusarium* $sp._1$. and *Fusarium* sp_2. Results showed that this compounds presented activity against 58% of pathogens. Antibacterial activity of flavonoid compounds was more than antifungal activity. A Garm negative bacterium was more resistance than garm positive bacteria. The range of created halos was between 9-14mm. Among the tested microorganisms, the B. *subtilis* and P. *mirabilis* had the highest sensitivity towards flavonoid compounds respectively whit 14 and 13mm. The growth inhibition of these compounds on the filamentous fungi except saprolegnia was weak. Based on the present finding, it could be inferred that the *Gelliodes carnosa* as an source for flavonoid compounds for combat with some microbial diseases.

* Corresponding author's email: pazooki2001@yahoo.com