

Study the antimicrobial effect of three marine sponges (*Dysidea* sp.) collected at Persian Gulf on some pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms

Homa Hamayeli, Mehdi Hasanshahian, Abdolhamid Namaki Shoshtari, Majid Askari Hesni

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar of University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2016/12/22
Accepted: 2017/07/24
Available online: 2017/09/12

Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 2017; 11(4): 45-56

Corresponding author:

Dr. Mehdi Hasanshahian

Department of Biology,
Faculty of Science, Shahid
Bahonar of University of
Kerman, Kerman, Iran

Tel: 0989132906971

Email:

hassanshahi@gmail.com

Abstract

Background and Aims: Marine sponges have specific ability to growth in complex conditions deal with microorganisms by production of secondary metabolites. These metabolites can be used to degrade and inhibit the formation of microbial biofilms. Eliminating biofilms is important from the industrial and health aspect.

Materials and Methods: In this study the antimicrobial effects of methanol: dichloromethane (1:1) extracts of three marine sponges in *Dysidea* sp genus collected in 2015 at Persian Gulf, were studied against 6 human pathogenic bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of each extracts was determined. In biofilm level, the destruction of biofilm and inhibition of biofilm production by each extract was carried out separately.

Results: The results of this study showed that the *Dysidea* sp_c have the highest inhibitory effect on planktonic form of studied bacteria. The maximum inhibitory effect on biofilm formation related to extracts of *Dysidea* sp_a in 12.5 mg/mL concentration against *B. cereus* and the minimum inhibitory effect in this concentration against *P. aeruginosa*. The highest destructive biofilm effect of *Dysidea* sp_c extract was observed in 6.25 mg/mL against *K. pneumonia* and lowest destruction in 12.5 mg/mL concentration was recorded against *B. cereus*.

Conclusions: The results obtained in this research confirmed that each marine sponges have different inhibitory effect against tested bacteria. This difference can be related to production of bioactive compounds and symbiosis microorganisms with these sponges.

KeyWords: Sponges, Pathogenic bacteria, Antimicrobial, Extracts, Persian Gulf

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hamayeli H, Hasanshahian M, Namaki Shoshtari A, Askari Hesni M. Study the antimicrobial effect of three marine sponges (*Dysidea* sp) collected at Persian Gulf on some pathogenic bacteria in planktonic and biofilm forms. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (4): 45-56

بررسی اثر ضد میکروبی سه گونه اسفنج دریایی *Dysidea sp.* جمع آوری شده از خلیج فارس بر روی برخی باکتری‌های پاتوژن به صورت منفرد و بیوفیلم هما حمایلی، مهدی حسن شاهیان، عبدالحمید نمکی شوشتری، مجید عسکری حسنی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: اسفنج‌های دریایی باقابلیت تولید برخی متابولیت‌های ثانویه، توانایی زندگی در شرایط پیچیده دریایی و مقابله با میکروارگانیسم‌ها را دارند. از این متابولیت‌ها می‌توان در جهت تخریب و ممانعت از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی استفاده نمود. از بین بردن بیوفیلم‌ها از جنبه صنعتی و سلامتی دارای اهمیت می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه، اثر ضد میکروبی عصاره متانولی: دی کلرومتانی (۱:۱) سه گونه اسفنج دریایی از جنس *Dysidea sp.* جمع‌آوری شده در سال ۱۳۹۴ از خلیج فارس بر روی ۶ باکتری پاتوژن انسانی انجام گردید. در ابتدا با تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) و سپس تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) هر یک از عصاره‌ها مشخص شد. در سطح بیوفیلم میکروبی، آزمون تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده و مهار تشکیل بیوفیلم توسط هرکدام از عصاره‌ها به صورت مجزا انجام پذیرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسفنج *Dysidea sp. c* بیشترین اثر مهارتی را بر روی فرم منفرد باکتری‌های مورد مطالعه داشت. بیشترین اثر مهارتی تشکیل بیوفیلم عصاره *Dysidea sp. a* در غلظت $12/5 \text{ mg/mL}$ بر باکتری *باسیلیوس سرئوس* و کمترین درصد مهار نیز در همین غلظت اما بر باکتری *پسودوموناس آئروزیئوزا* تعیین گردید. بیشترین اثر تخریب بیوفیلم تشکیل‌شده عصاره *Dysidea sp. c* در غلظت $12/5 \text{ mg/mL}$ و بر باکتری *کلیسیلا پنومونیه* بوده و همچنین کمترین این اثر در غلظت $12/5 \text{ mg/mL}$ بر باکتری *باسیلیوس سرئوس* تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق تأیید کردند که هرکدام از گونه‌های اسفنج دریایی فعالیت ضد میکروبی متفاوتی بر علیه باکتری‌های این پژوهش از خود نشان دادند که می‌تواند به دلیل تفاوت در تولید ترکیبات بیواکتیو و یا میکروارگانیسم‌های همزیست با آن‌ها باشد.

کلمات کلیدی: اسفنج، باکتری بیماری‌زا، ضد میکروبی، عصاره، خلیج فارس

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۲
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۰۲
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱
موضوع:
مواد ضد میکروبی

IJMM 1396; 11(4): 45-56

نویسنده مسئول:

دکتر مهدی حسن شاهیان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان،
ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۳۲۹۰۶۹۷۱

پست الکترونیک:

hassanshahi@gmail.com

مقدمه

محصولات طبیعی دریایی شامل طیف گسترده‌ای از مواد شیمیایی مانند ترپن‌ها، پلی‌کتیدها، استروئین‌ها، پپتیدها و آلکالوئیدها با ساختارهای متفاوت هستند (۳).

اسفنج‌ها از شاخه پوریرفا، از اجدادشان متازواها که در ۸۰۰-۷۰۰ میلیون سال پیش وجود داشته‌اند، تکامل یافته‌اند (۴). پراکنش وسیعی از مناطق جزر و مدی تا هزاران متر از اعماق اقیانوس دارند. آن‌ها موجوداتی فیلتر کننده هستند که از باکتری‌ها تغذیه می‌کنند و با داشتن منافذ کوچک متعدد در سطح، اجازه می‌دهند آب وارد شده و از طریق یکسری از کانال‌ها

بیوتیپ‌های دریایی حدود سه چهارم سطح زمین را اشغال کرده‌اند و تأثیرات بسیار زیادی بر اکوسیستم‌های هم‌جوار و همچنین شرایط اقتصادی، اجتماعی، معیشتی و حتی شرایط درمانی بشر دارند (۱). در طول تاریخ نشان داده شده، که بیشتر فعالیت‌های بیولوژیکی سیاره ما در اقیانوس‌ها شکل گرفته است. تعدادی از ترکیبات فعال بیولوژیکی با میزان متفاوتی از عملکردها، از جمله ضد تومور، ضد سرطان، ضد میکروتوبول، سیتوتوکسیک، محافظت در برابر نور و همچنین خواص آنتی‌بیوتیکی و ضد رسوب، از منابع دریایی امروزه جدانشده است (۲). با توجه به تنوع موجودات دریایی و زیستگاه آن‌ها،

نسبت به باکتری‌های منفرد مشابه خود در برابر فشار اعمال شده از سوی ترکیبات ضد میکروبی، قوی تر و مقاوم تر باشد (۱۰).

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر ضد میکروبی غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج‌های دریایی سه گونه اسفنج از جنس *Dysidea sp.* بر فرم منفرد باکتری‌های پاتوژن و تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)، بررسی اثر غلظت‌های مختلف این عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم و ساختار بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های پاتوژن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسیم‌ها

باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش شامل: باکتری‌های گرم مثبت؛ *باسیلوس سرئوس* (ATCC ۱۲۹۸) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۱۱۸۹) و هم‌چنین باکتری‌های گرم منفی؛ *اشریشیا کلی* (ATCC ۳۵۲۱۸)، *آسینتو باکتر* (ATCC ۱۶۱۱)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۲۷۸۵۳) و *کلبسیلا پنومونیه* (ATCC ۷۰۶۰۳).

جمع‌آوری اسفنج‌های دریایی و عصاره‌گیری

نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در سال ۱۳۹۴ از عمق ۱۰-۱۲ متری جزیره تنب کوچک (*Dysidea sp. a*) و جزیره هنگام (*Dysidea sp. b*) و (*Dysidea sp. c*) واقع در خلیج فارس به روش غواصی (SCUBA) جمع‌آوری و سپس در داخل آب دریا و بر روی یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در شکل ۱ تصاویر مربوط به هرگونه اسفنج نشان داده شده است. شناسایی اسفنج‌ها بر اساس روش Hopper انجام شد (۱۱). در آزمایشگاه نمونه‌های زنده جداسازی و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۲۲- فریز شدند. عصاره‌گیری به روش ماسراسیون تغییر یافته و حلال ترکیبی متانول و دی کلرومتان (۱:۱) انجام شد. هرکدام از اسفنج‌ها ابتدا به قطعات کوچک‌تر برش داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در حلال غوطه‌ور گردیدند. سپس با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک مخلوط صاف گردید. پس از تبخیر حلال در دمای اتاق عصاره مورد نظر به دست آمد (۱۱).

که در آن میکروارگانیسیم‌ها و ذرات خورده شده فیلتر می‌شوند، گردش کند. به این ترتیب اسفنج‌ها دائماً در معرض جمعیت بزرگی از میکروبی‌های موجود در آب، شامل پاتوژن‌های فرصت طلب و میکروارگانیسیم‌های رسوبات هستند. با این حال آن‌ها، اعضاء بسیار موفق تری از موجودات دریایی می‌باشند که از عفونت‌های باکتریایی کمی رنج می‌برند. اگرچه عملکرد اکولوژیکی متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها تاکنون شناخته نشده است اما آن‌ها توانایی تولید ترکیبات شیمیایی غیرمعمول را دارند. به طور عمده سه رده اسفنج به نام‌های *Calcarea* (۵ راسته و ۲۴ خانواده)، *Demospongiae* (۱۵ راسته و ۹۲ خانواده) و *Hexactinellida* (۶ راسته و ۲۰ خانواده) وجود دارند. تاکنون بیش از حدود ۱۵۰۰۰ گونه از آن‌ها شناسایی شده‌اند اما تنوع واقعی آن‌ها احتمالاً بیشتر از این می‌باشد. بسیاری از آن‌ها ساکن محیط زیست دریایی هستند و تنها حدود ۱ درصد در آب‌های شیرین حضور دارند. اغلب گونه‌ها در کلاس *Demospongiae* جای گرفته‌اند (۵، ۶). به دلیل عدم وجود اندام دفاعی فیزیکی در اسفنج‌ها، متابولیت‌های ثانویه نقش عامل دفاعی را برای آن‌ها ایفا می‌کنند. این متابولیت‌ها در پروسه‌های حیاتی موجود نقشی نداشته و در شرایط خاص مانند محدودیت در منابع غذایی و یا رقابت در اکوسیستم مفید واقع می‌شوند. در حقیقت هرگونه اسفنج با توجه به موقعیت زیستی، برنامه خاص تولید متابولیت ثانویه خود را اجرا می‌کند. اغلب زیستگاه‌های اسفنج‌های دریایی دارای بیوماس و باقیمانده غذایی بالا هستند که بنابراین بستر مناسبی به جهت رشد میکروارگانیسیم‌ها فراهم می‌گردد. به این ترتیب یکی از تهدیدکنندگان بقاء اسفنج‌ها، باکتری‌ها هستند و به همین علت آن‌ها ترکیباتی با ویژگی ضد باکتریایی تولید می‌کنند (۸، ۷).

بیوفیلم‌ها، مکانیسم‌هایی با ساختار پیچیده هستند که از طریق تعدادی از گونه‌های باکتریایی قادر به رشد، تماس نزدیک و اتصال محکم با سطح و بهبود روابط بین سلولی می‌باشند (۹). در حقیقت، با توجه به میکروارگانیسیم و شکل سیستم ضد میکروبی، باکتری در ساختار بیوفیلم می‌تواند بیش از هزار بار



شکل (۱): تصاویر اسفنج‌های دریایی (a) *Dysidea sp.*, (b) *Dysidea sp.*, (c) *Dysidea sp.*

توسط دستگاه الیزا ریدر (Bioteck) ELX_800)) در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین و ثبت شد. کمترین غلظتی از عصاره که رشد باکتری در آن مهار شده بود به‌عنوان MIC انتخاب شد (۱۳). از چاهک‌های تیمار تست MIC، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بر محیط مولر هینتون آگار فاقد عصاره قرار گرفته و به کمک Glass spreader استریل در سطح پلیت پخش شد. پلیتی که از چاهک با کمترین غلظت عصاره آلوده شده و باکتری پس از یک دوره انکوباسیون در آن رشد نکرد به‌عنوان MBC تعیین گردید (۱۴).

تعیین میزان هیدروفوبیسیته سطحی باکتری‌های

مورد مطالعه

یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌ها، میزان هیدروفوبیسیته سطح سلول است. این معیار در باکتری‌های مورد مطالعه با انجام آزمون Bacterial Adhesion To Hydrocarbon بررسی گردید. برای انجام آزمون BATH، ابتدا یک کشت ۲۴ ساعته از باکتری‌ها بر محیط نوترینت آگار انجام شد. سپس یک لوپ از هر باکتری به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر به بافر سالین فسفات استریل وارد و ورتکس انجام شد تا جذب نوری اولیه سوسپانسیون حاصل در طول موج ۶۰۰ نانومتر به مقدار ۰/۳-۰/۲ برسد. سپس به هر لوله مقدار ۲۰۰ میکرولیتر هگزادکان اضافه و ورتکس شدید انجام شد. بعد از آن لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و بدون حرکت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید. از آنجاکه لایه هگزادکان بر روی سوسپانسیون میکروبی قرار گرفت، برای تعیین جذب ثانویه یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون لایه زیرین برداشت شده و جذب نوری آن در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. با توجه به مقادیر جذب‌های اولیه و ثانویه، میزان هیدروفوبیسیته سطحی هر باکتری از فرمول زیر محاسبه شد:

تعیین میزان اثربخشی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

غلظتی معادل ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و حلال متانول و دی‌کلرومتان تهیه گردید. در هر یک از محلول عصاره‌های مورد آزمایش چند عدد دیسک بلانک (پادتن طب) با قطر ۶/۴ میلی‌متر وارد شده و در نهایت دیسک‌ها توسط پنس و در شرایط آسپتیک از محلول عصاره خارج و در پلیت استریل خشک شدند (۱۲). در این مطالعه دیسک‌های آغشته به حلال‌های مصرفی به‌عنوان شاهد برای این آزمایش بودند. کشت چمنی با سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۰/۵ مک فارلند بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت Merck) انجام و دیسک‌های مذکور بر روی پلیت قرار داده شده، انکوبه گردیدند. قطر هاله مهارتی اندازه‌گیری و ثبت گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل

غلظت کشندگی (MBC)

MIC با روش براث دایلوشن و طبق پروتکل Clinical & Laboratory Standards Institute (۲۰۰۳) معین شد. رقت‌های مختلف عصاره شامل ۸ رقت ۵۰، ۱۰۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶ و ۰/۷۸ بوده است. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده اضافه شد. کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر باکتری تهیه گردید. ۵۰ میکرولیتر از کدورت ۰/۵ مک فارلند هر باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون استریل (شرکت Merck) اضافه گردید. از سوسپانسیون حاصل، ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک دارای رقت‌های متفاوت عصاره ریخته شد. هر چاهک دارای تقریباً $2/5 \times 10^4$ سلول باکتری می‌باشد. غلظت نهایی عصاره در هر چاهک به ترتیب ۸۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ mg/mL محاسبه گردید. جذب نوری میکروپلیت پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون

$$\text{Reduction Percent} = \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)} \right] \times 100$$

میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل = C میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد = B

میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده = T

تعیین اثر تخریبی عصاره‌ها بر بیوفیلم‌های تشکیل شده

از روش Nostro و همکاران استفاده شد (۱۹). در این سنجش ابتدا بیوفیلم تشکیل و سپس عصاره‌های مورد بحث بر آن اثر داده شد. به منظور بررسی قابلیت هر عصاره در حذف ساختارهای بیوفیلمی تشکیل شده از رنگ‌آمیزی کریستال ویوله و همانند تعیین اثر مهاری عصاره بر تشکیل بیوفیلم انجام گردید.

یافته‌ها

تعیین میزان اثربخشی عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

در جدول ۱ قطر هاله‌های عدم رشد عصاره‌های سه گونه اسفنج نشان داده می‌شود. در روش دیسک پلیت عصاره اسفنج گونه *Dysidea sp.a* هاله عدم رشد تنها در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آسینتوباکتر* دیده شد. در مورد عصاره اسفنج گونه *Dysidea sp.b* هاله مهاری در رابطه با تمامی باکتری‌های مورد آزمون به جز *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. عصاره اسفنج گونه *Dysidea sp.c* بر هر ۶ باکتری مورد مطالعه دارای اثر بوده است.

$$\text{BATH} = \frac{\text{OD}_1 - \text{OD}_2}{\text{OD}_1} \times 100$$

در این فرمول OD_1 مقدار جذب نوری اولیه و OD_2 مقدار جذب نوری ثانویه سوسپانسیون میکروبی در طول موج ۶۰۰ نانومتر است. طبق فرمول هرچه میزان OD_2 کمتر از OD_1 باشد BATH بزرگ‌تر خواهد بود (۱۵).

تعیین اثر مهاری عصاره‌ها بر تشکیل بیوفیلم

در این پژوهش از روش میکروپلیت تیترا استفاده شد. چاهک‌های تیمار حاوی مقدار برابری از رقت‌های عصاره‌های اسفنج و سوسپانسیون میکروبی و چاهک کنترل حاوی سوسپانسیون میکروبی بود. سوسپانسیون میکروبی معادل کدورت ۱ مک فارلند تهیه گردید. با توجه به نتایج به دست آمده از میزان اثربخشی عصاره‌ها در مراحل قبل، سه رقت متوالی ۲۵ mg/mL، ۱۲/۵، ۶/۲۵ از عصاره‌های دریایی مورد آزمایش تهیه و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به چاهک‌های تیمار عصاره میکروپلیت ۹۶ خانه وارد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به چاهک‌های تیمار افزوده گردید. غلظت نهایی هر عصاره در چاهک معادل ۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱ محاسبه گردید. میکروپلیت مذکور به صورت بدون حرکت انکوبه گردید (۱۶). پس از گذشت زمان انکوباسیون میکروپلیت بارنگ آمیزی کریستال ویوله بررسی شد. جذب نوری چاهک‌ها به وسیله دستگاه الیزا ریدر و در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۱۷). درصد کاهش بیوفیلم از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به فرمول محاسبه شد (۱۸).

جدول ۱: قطر هاله عدم رشد عصاره‌ها به روش انتشار دیسک

انتشار دیسک		اسفنج‌ها	
<i>Dysidea sp.c</i>	<i>Dysidea sp.b</i>	<i>Dysidea sp.a</i>	اسفنج‌ها
۱۰±۰/۸ SD	-	۱۱±۱/۳ SD	استافیلوکوکوس اورئوس
۱۵±۰/۶ SD	۱۷±۱/۱ SD	-	باسیلوس سرئوس
۱۴±۱/۲ SD	۱۰±۰/۷ SD	-	پسودوموناس آئروژینوزا
۷±۰/۹ SD	۸±۰/۵ SD	-*	اشریشیا کلی
۱۵±۰/۸ SD	۱۳±۰/۶ SD	-	کلبسیلا پنومونیه
۹±۱/۳ SD	۱۲±۱/۲ SD	۹±۱/۶ SD	آسینتو باکتر

*: عدم مشاهده هاله مهاری

است. همان طور که در این جدول دیده می شود، بیشترین غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی مربوط به عصاره اسفنج *Dysidea sp.a* می باشد.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی

حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی هر یک از عصاره های اسفنج به طور جداگانه بر روی باکتری های پاتوژن بررسی شد. نتایج حاصله از این آزمون در جدول (۲) آمده

جدول ۲: مقادیر MIC و MBC باکتری های مورد بررسی

آسینتوباکتر		کلبسیلا پنومونیه		اشریشیا کلی		سودوموناس آئروژینوزا		باسیلوس سرئوس		استافیلوکوکوس اورئوس		باکتری نمونه دریایی
MBC mg/mL	MIC mg/mL	MBC mg/mL	MIC mg/mL	MBC mg/mL	MIC mg/mL	MBC mg/mL	MIC mg/mL	MBC mg/mL	MIC mg/mL	MBC mg/mL	MIC mg/mL	
۴۰	۱۰	۸۰	۴۰	۴۰	۲۰	۸۰	۴۰	۸۰	۴۰	۴۰	۲۰	<i>Dysidea sp.a</i>
۲۰	۵	۲۰	۱۰	۲۰	۱۰	۴۰	۲۰	۸۰	۴۰	۸۰	۴۰	<i>Dysidea sp.b</i>
۲۰	۱۰	۱۰	۵	۴۰	۱۰	۴۰	۲۰	۸۰	۴۰	۸۰	۲۰	<i>Dysidea sp.c</i>

تعیین اثر مهاری عصاره ها بر تشکیل بیوفیلم

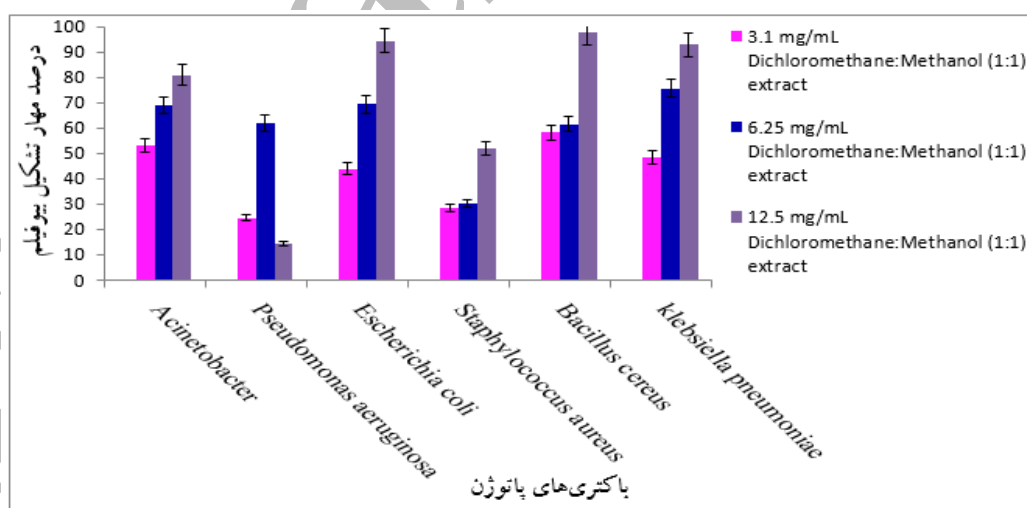
عصاره اسفنج *Dysidea sp.a*

توانایی هر یک از غلظت های مختلف عصاره این اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری های مورد مطالعه در شکل (۲) آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم این عصاره در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری *باسیلوس سرئوس* و کمترین درصد مهار نیز در همین غلظت اما بر باکتری *پسودوموناس آئروژینوزا* تعیین گردید.

تعیین میزان هیدروفوبیسیتته سطحی باکتری های

مورد مطالعه

مقادیر BATH به دست آمده برای هر باکتری به این شرح می باشد: *آسینتوباکتر* (۰/۶۸/۱۲)، *باسیلوس سرئوس* (۰/۶/۲۵)، *استافیلوکوکوس سرئوس* (۰/۴۲/۱۲)، *سودوموناس آئروژینوزا* (۰/۲۶/۶۳)، *اشریشیا کلی* (۰/۹/۱۵) و *کلبسیلا پنومونیه* (۰/۲۲/۰۳).

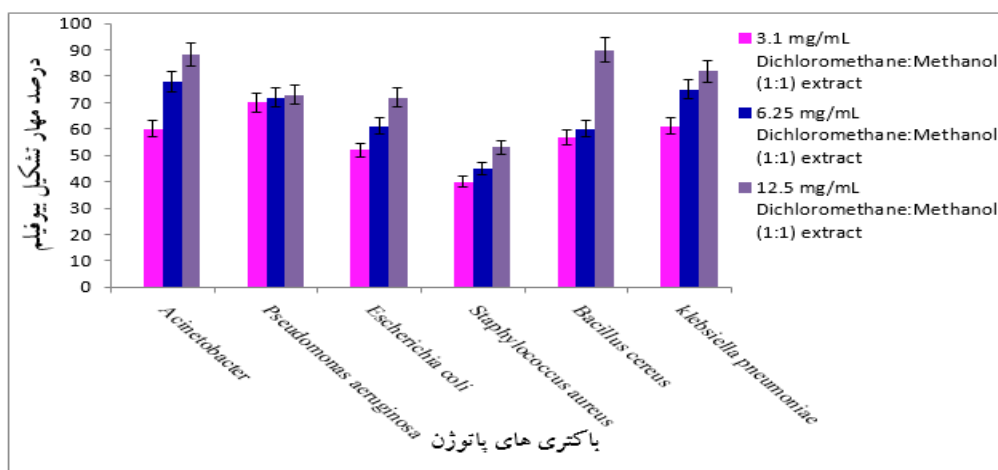


شکل ۲: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea sp.a* بر تشکیل بیوفیلم باکتری های مورد مطالعه

عصاره اسفنج *Dysidea sp.b*

۱۲/۵ mg/mL بر باکتری باسیلوس سرئوس و نیز کمترین درصد مهاری از بین باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۳/۱ mg/mL بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس اعمال شده است.

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این گونه اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه در شکل (۳) مشاهده می‌گردد. در نتیجه اطلاعات به دست آمده در این آزمون، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصاره این اسفنج در غلظت

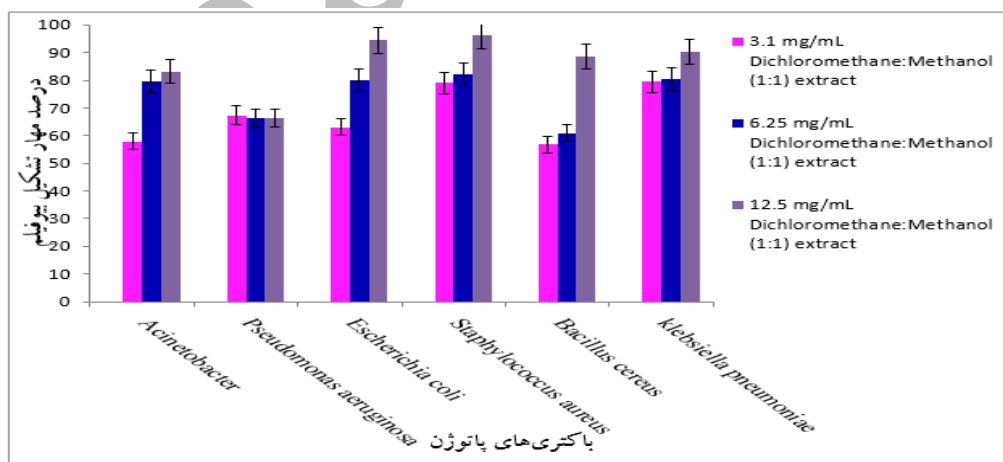


شکل ۳: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea sp.b* بر تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه

۱۲/۵ mg/mL بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و نیز کمترین درصد مهاری از بین باکتری‌های مورد مطالعه در غلظت ۳/۱ mg/mL بر باکتری باسیلوس سرئوس اعمال شده است.

عصاره اسفنج *Dysidea sp.c*

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این گونه اسفنج در مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه در شکل (۴) مشاهده می‌گردد. در نتیجه اطلاعات به دست آمده در این آزمون، بیشترین اثر مهاری تشکیل بیوفیلم عصاره این اسفنج در غلظت



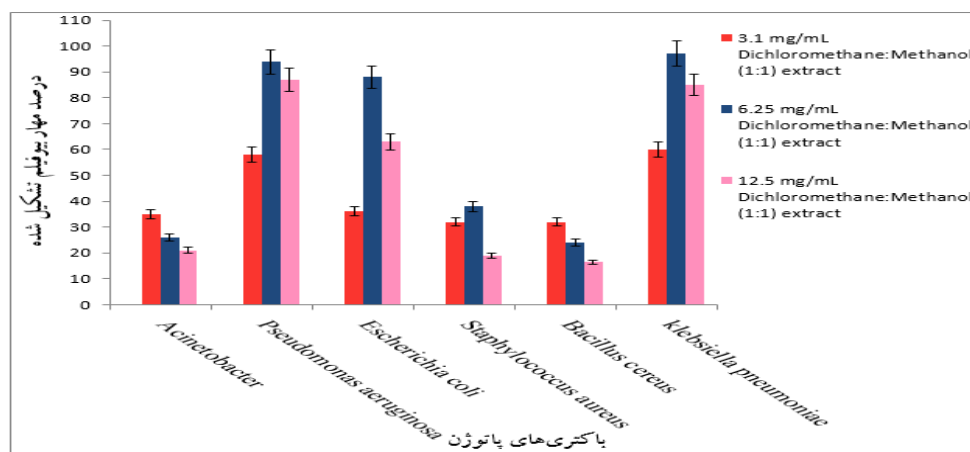
شکل ۴: مقایسه اثر مهاری عصاره *Dysidea sp.c* تشکیل بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه

(۵) نشان شده است. طبق نتایج به دست آمده، این عصاره دریایی در غلظت ۶/۲۵ mg/mL بر باکتری کلبسیلا پنومونیه بیشترین و در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری باسیلوس سرئوس کمترین اثر تخریبی بیوفیلم تشکیل شده را داشته است.

تعیین اثر تخریبی عصاره‌ها بر بیوفیلم‌های تشکیل شده

عصاره اسفنج *Dysidea sp. a*

قابلیت هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره این اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد مطالعه در شکل

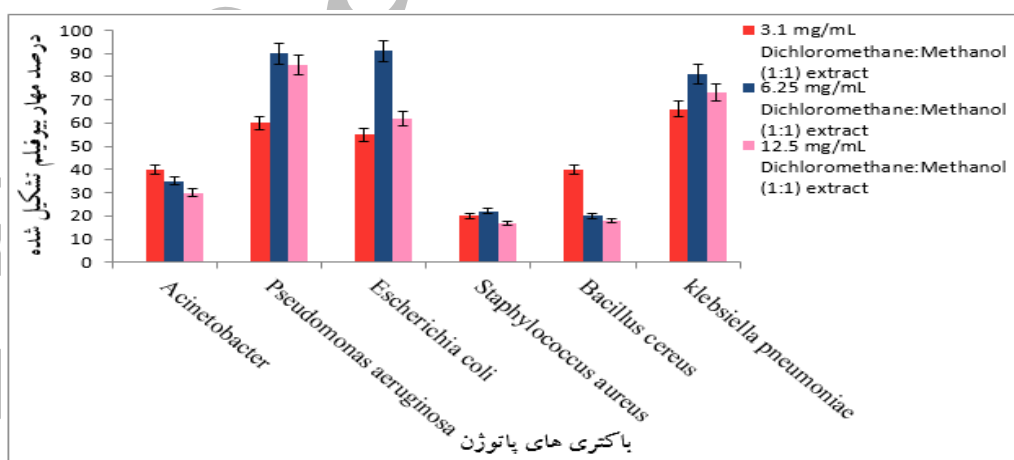


شکل ۵: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea sp. a* بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های مورد مطالعه

تخریب بیوفیلم تشکیل شده در غلظت ۶/۲۵ mg/mL و بر باکتری اشیریشیا کلی بوده و همچنین کمترین اثر در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس تعیین گردید.

عصاره اسفنج *Dysidea sp. b*

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد مطالعه در شکل (۶) مشاهده می‌گردد. با توجه به اطلاعات کسب شده بیشترین اثر

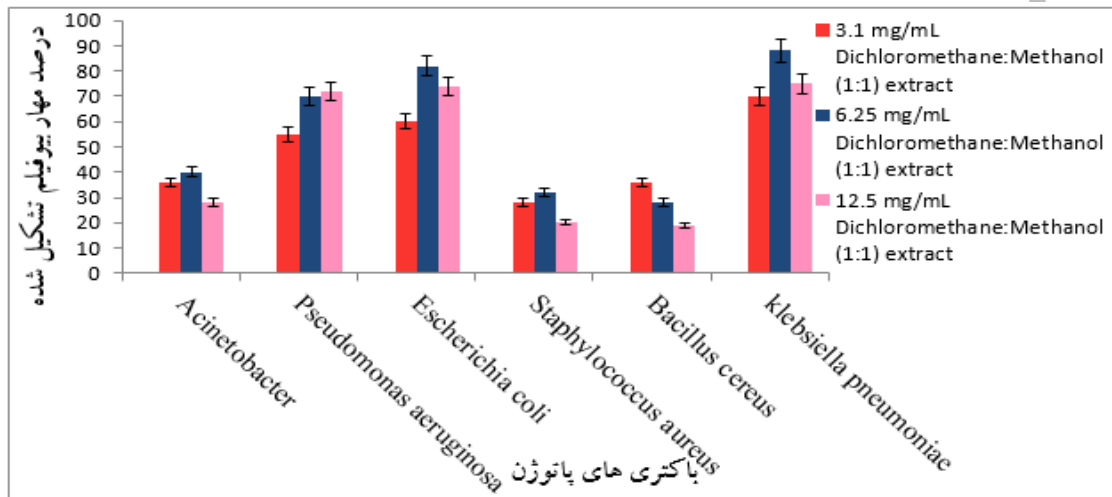


شکل ۶: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea sp. b* بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های مورد مطالعه

عصاره اسفنج *Dysidea sp. c*

تخریب بیوفیلم تشکیل شده در غلظت ۶/۲۵ mg/mL و بر باکتری کلسیلا پنومونیه بوده و همچنین کمترین اثر در غلظت ۱۲/۵ mg/mL بر باکتری باسیلوس سرئوس تعیین گردید.

توانایی هر یک از غلظت‌های مختلف عصاره اسفنج در تخریب ساختارهای بیوفیلمی باکتری‌های مورد مطالعه در شکل (۷) مشاهده می‌گردد. با توجه به اطلاعات کسب شده بیشترین اثر



شکل ۷: مقایسه اثر تخریبی عصاره *Dysidea sp. c* بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های مورد مطالعه

بحث

اسفنج علیه پاتوژن‌های انسانی مانند *پسودوموناس آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس* و *ویبریو کلره* را نشان دادند (۲۳). در این تحقیق نیز اغلب عصاره‌های بررسی شده دارای اثر ضد میکروبی علیه هر ۶ پاتوژن انسانی، از جمله باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* بوده‌اند. گمان می‌رود تفاوت در آزمون‌ها و بررسی‌های مختلف به نوع حلال و روش عصاره‌گیری و نیز همچنین گونه و جنس اسفنج دریایی بررسی شده بستگی دارد.

در سال ۲۰۱۴ Manjusha و همکاران در طی تحقیق بر روی یک گونه اسفنج به این نکته اشاره داشتند که اجتماعات باکتریایی اسفنج‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر پاتوژن‌های چشم انسان هستند (۲۴). در این مطالعه به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های همزیست با اسفنج‌های مورد بررسی پرداخته نشده است. به همین دلیل نمی‌توان به‌طور قطع اظهار نمود که اثرات ضد میکروبی مشاهده شده منحصر به ترکیبات بیواکتیو تولید شده توسط اسفنج دریایی می‌باشد و این احتمال نیز وجود دارد که میکروارگانیسم‌های همزیست با آن‌ها مسبب بروز این اثرات ضد میکروبی باشند. همان‌گونه که Muller و Thakur موفق به جداسازی باکتری *سودوموناس* از

در بررسی که توسط Muller و همکاران انجام گرفت، مشخص گردید که از ۵۰۰ گونه اسفنج که مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته بودند بیش از ۵۰۰۰ ترکیب با خواص بیولوژیک جداسازی و شناسایی شده است (۲۰).

مطابق با این پژوهش، Kelman و همکاران در بررسی فعالیت ضد میکروبی اسفنج صخره *Amphimedon viridis* از دریای سرخ، از حلال دی‌کلرومتان: متانول به جهت عصاره‌گیری و جداسازی میکروارگانیسم‌های همزیست با اسفنج استفاده نمودند (۲۱). Nazemi و همکاران در بررسی اسفنج *Iophon laevistylus* از جزیره Faro در خلیج فارس نشان دادند که عصاره آبی این اسفنج هیچ‌گونه فعالیت آنتی‌باکتریایی نداشته، اما عصاره متانولی و دی‌اتیل اتری فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *باسیلوس* داشته است (۲۲). همچنین نتایج به‌دست آمده این بررسی در روش دیسک دیفیوژن، گویای این مطلب است که استفاده از حلال قطبی: غیر قطبی به جهت عصاره‌گیری مطلوب می‌باشد. Boobathy و همکاران فعالیت متوسطی از عصاره متانولی و آبی یک‌گونه

اسفنج دریایی *Dysidea sp.* گردیدند که این باکتری در شرایط بازی تولید رنگدانه‌ای با خاصیت ضد باکتریایی می‌کند (۵).

تابه حال باکتری‌های *باسیلوس*، *ویبریو*، *سودوآلتروموناس*، *سودوموناس*، *استریپتومایسز دریایی* و *سیتوفاگا* جدا شده از آب دریا، رسوبات، جلبک‌ها و بی‌مهرگان دریایی برای تولید عوامل فعال زیستی شناسایی شده هستند. آن‌ها قادر به تولید مشتقات ایندول (کوئین وان و ویولاکتین)، آلکالوئیدها (پرودیجینین و آمین تامی)، پلیین، ماکرولیدها، پپتیدها و تریپنوئیدها می‌باشند (۲۵).

در حالی که میزان MIC اسفنج‌های جنس *Dysidea sp.* در محدوده ۴۰-۵ mg/mL نشان داده شده است، Govinden و همکاران با بررسی خصوصیات ضد باکتریایی اسفنج‌های دریایی از آب‌های ماریتیوس و با استفاده از حلال ترکیبی متانول و دی کلرومتان (۱:۱) چنین اظهار می‌دارند که عصاره خام اسفنج دریایی مورد بحث بیشترین میزان MIC را در محدوده غلظت ۲/۵۵-۵/۰۹ mg/mL نشان دادند که احتمالاً به این دلیل است که عصاره حاوی مخلوطی از ترکیبات فعال و غیرفعال می‌باشد بنابراین MIC بالاتر مورد انتظار است. این پژوهش فرضیه غنای شیمیایی اسفنج‌ها را تأیید می‌کند و بیان می‌دارد که طیف گسترده‌ای از فعالیت ضد میکروبی این اسفنج‌ها احتمالاً به دلیل حضور سسترتترین‌ها، تری‌ترین‌ها، آلکالوئیدها و تانن‌های شناسایی شده در عصاره می‌باشد (۲۶).

Nursyam و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی یک گونه اسفنج به نام *Geodia sp.* در اندونزی اثرات ضد میکروبی قابل قبولی علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نمودند. با آنالیز GCMS از این نمونه اسفنج ترکیباتی مانند نرپنوئید، آستروئید و اسید چرب شناسایی گردید. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که عصاره اسفنج تازه نسبت به عصاره اسفنج خشک شده دارای اثر ضد میکروبی بیشتری بوده است که نشان می‌دهد برخی از ترکیبات مؤثر در عصاره قابل تبخیر می‌باشند (۲۷). ما در این پژوهش عصاره‌گیری را از هر سه نمونه اسفنج *Dysidea sp.* تازه انجام دادیم که می‌توان نتیجه گرفت اثرات نشان داده شده احتمالاً در بیشترین و بهترین وضعیت بوده‌اند.

Salehi و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی پروتئین‌های بیواکتیو اسفنج به عنوان عامل ضد باکتریایی چنین بیان می‌دارد

که، کاهش در فعالیت ضد میکروبی هنگامی که با دیگر غلظت‌های عصاره مقایسه می‌شود احتمالاً به دلیل ذخیره‌سازی ایجاد می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین بیواکتیو بی‌ثبات است و در غلظت‌های پائین پروتئین (۴۰-۴۰۰ mg/mL) فعالیت ضد باکتریایی کمی را نشان می‌دهد (۲۸). همانند آنچه ما در اغلب نتایج حاصل از اثر مهاری هر ۳ عصاره *Dysidea sp.* بر تشکیل بیوفیلم میکروبی مشاهده کردیم از میان سه غلظت مورد آزمون، کمترین اثر مهاری مربوط به کمترین غلظت یعنی ۳ mg/mL بوده است.

Nazemi و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی اثر ضد میکروبی عصاره دی اتیل اتر از اسفنج *Dysidea pallescens* در خلیج فارس، MBC برابر ۱۰ mg/mL را برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش نموده‌اند (۲۹). اسفنج‌های دریایی مورد بررسی در این پژوهش دارای MBC برابر ۸۰-۴۰ mg/mL در رابطه با باکتری مذکور بوده‌اند. این تفاوت در میزان MBC احتمالاً به دلیل تفاوت در حلال مصرفی و یا گونه مورد آزمون بوده است.

تفاوت در کلیه نتایج به دست آمده این سه گونه اسفنج دریایی در سطح منفرد و بیوفیلم، نشان‌دهنده تفاوت در میزان فعالیت ضد میکروبی آن‌ها در برابر باکتری‌های مختلف می‌باشد که می‌تواند به دلیل تفاوت در ارگانسیم‌های همزیست باشد. چنانکه Newbold و همکاران نیز ضمن بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره اسفنج دریایی کارائیب چنین اظهار می‌دارند که، الگوی فعالیت ضد میکروبی ۱۵ تا از ۱۶ گونه اسفنج بررسی شده متفاوت بوده است و اعلام می‌دارند که گونه‌های مختلف، متابولیت ضد باکتری مشابهی تولید نمی‌کنند (۷). Pazoiki و Khakshoor با بررسی خود بر روی فعالیت باکتری‌سیدال و ضد قارچی عصاره‌های متفاوت از یک گونه اسفنج از خلیج فارس بیان می‌دارند، باکتری‌های گرم مثبت (۷۲٪) نسبت به باکتری‌های گرم منفی (۶۵٪) به بسیاری از عصاره‌ها حساس‌تر بوده‌اند (۳۰).

ضمن این پژوهش کمترین اثر تخریبی هر سه عصاره دریایی بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مشاهده گردید. هیچ‌گونه پژوهشی مبنی بر فعالیت ضد میکروبی عصاره اسفنج‌های دریایی بر ساختار بیوفیلمی پاتوژن‌های انسانی یافت نشد. به نظر می‌رسد مطالعه

تمامی دوستان، همکاران و عزیزانی که ما را در انجام و ارتقاء کیفی این پژوهش یاری دادند، اعلام نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

پیش رو اولین گزارش از اسفنج‌های دریایی خلیج فارس در این حیطه کاری باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب و دفاع شده در دانشکده علوم دانشگاه باهنر کرمان استخراج شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از مسئولین و اساتید دانشگاه باهنر کرمان، هیئت‌داوران پایان‌نامه و

References

- Bhatnagar I, Kim S. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Mar. Drugs* 2010; 8 (10):2673-2701.
- Hardoim CCP, Costa R. Microbial Communities and Bioactive Compounds in Marine Sponges of the Family Irciniidae. *Mar. Drugs* 2014; 12(10):5089-5122.
- PremAnanda T, Bhata AW, Yogesh S, UpalRoyb S, Siddharthb J, Sarmaa SP. Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol Res* 2006; 161(3): 252-262.
- Jimeno J, Faircloth G, Fernández Sousa-Faro JM, Scheuer P, Rinehart K. New marine derived anticancer therapeutics- Ajourney from the sea to clinical trials. *Mar. Drugs* 2004; 2(1): 14-29.
- Thomas TRA, Kavlekar DP, Loka Bharathi PA. Marine Drugs from Sponge-Microbe Association. *Mar. Drugs* 2010;8 (4): 1417-1468.
- Newbold RW, Jensen PR, Fenical W, Pawlik JR. Antimicrobial activity of Caribbean sponge extracts. *Aquat Microb Ecol* 1999; 19: 279-284.
- JavanbakhtYousefi S, Ghasemi FM, Amir Mozaffari N. Biological evaluation of bioactive substances produced in bacteria isolated from coastal waters of the Caspian. *J. Biolog. Sci* 2009;3 (4): 2008-5982.
- Amraouia BEI, Biardb JF, Urizc MJ, Rifaia S, Fassouane A. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. *J Mycol Med* 2010;20 (1): 70-74.
- Simoes M, Simoes L, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT -FST* 2010; 43: 573-583.
- Srey S, Jahid IK, Sang-Do HA. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 2013;31 (2):572-585.
- Hooper JNA, Soest RWM. *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges the End of a Beginning*. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* 2004; 68 : 19-38.
- Andrews JM. BSAC standardized disc susceptibility testing method. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:713-28.
- Rotilie CA, Fass RJ, Prior RB, Perkins RL. Microdilution Technique for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1975; 7(3): 311-315.
- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Methods for testing antimicrobial effectiveness; In Bailey and Scott's diagnostic microbiology; Mosby-Year Book: St. Louis, MI, 1994; pp. 168-193.
- Rosenberg M, Rosenberg E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 to hexadecane. *J Bacteriol* 1981; 148 (1): 51-57.
- Cramton SE, Gerke C, Cotz F. In vitro methods to study biofilm formation. *Methods Enzymol* 2001; 336: 239-255.
- Jabra-Rizk MA, Meiller TF, James CE, Shirliff ME. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother* 2006; 50 :1463-1469.
- Sonak S, Bhosle NB. A simple method to assess bacterial attachment to surfaces. *Biofouling*. 1995; 9:31-38.
- Nostro A, Bisignano G, Cannatelli MA, Crisafi G, Germano MP, Alonzo V. Effects of *Helichrysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17(6):517-520.

20. Muller WE, Grebenjuk WELE, Pennec G, Schroeder H, Brummer F, Hentschel I. Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach. *Mar Biotechnol (NY)* 2004; 6 (2):105-117.
21. Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Ilan M, Ifrach I, Loya Y. Antimicrobial activity of the reef sponge *Amphimedonviridis* from the Red Sea: evidence for selective toxicity. *Aquat Microb Ecol* 2001; 24: 9-16.
22. Nazemi M, Motallebi Moghanjoghi AA, Jamili S, Mashinchian A, Ghavam Mostafavi P. Comparison of antibacterial activities of *Ircinia mutans* extracts in two different seasons from Kish Island, Persian Gulf, Iran. *Iran J Fish Sci* 2014; 13 (4):823-833.
23. Boopathy S, Kumar TTA, Kathiresan K. Isolation of symbiotic bacteria and bioactive proteins from the marine sponge, *Callyspongia diffusa*. *Indian J. Biotechnol* 2009; 8(3):272-275.
24. Manjusha WA, Johnson JA, Citarsu T, Rejin Prasad JJ. Isolation and identification of *Bacillus Pumilus* LD-B1 with antimicrobial and anti-cancer activities from the marine sponge *Axinella sp.* Collected from Kanyakumari coast. *JOBB* 2014;2 (5):141-149.
25. Soliev AB, Hosokawa K, Enomoto K. Bioactive Pigments from Marine Bacteria: Applications and Physiological Roles. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 1-17.
26. Govinden-Soulange J, Marie D, Kauroo S, Beesoo R, Ramanjooloo R. Antibacterial Properties of Marine Sponges from Mauritius Waters. *Trop J Pharm Res* 2014; 13(2): 249-254.
27. Nursyam H, Andayani S, Salis H. Antibacterial Activities of Sponge Extracts (*Geodia sp.*) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Glob. J. Med. Plant Res* 2013;1 (1): 88-92.
28. Salehi A, Patong R, Ahmad A. Isolation and characterization of some kind bioactive proteins sponge as antibacterial agent. *IJSTR* 2014;3 (2): 233-236.
29. Nazemi M, Moradi Y, Rezvani Gilkolai F, Ahmaditaba MA, Gozari M, Salari Z. Antimicrobial activities of semi polar-nonpolar and polar secondary metabolites of sponge *Dysidea pallescens* from Hengam Island, Persian Gulf. *Iran J Fish Sci* 2017;16 (1): 200-209.
30. Khakshoor MS, Pazooki J. Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of *Gelliodes carnosa* (sponge, Persian Gulf). *Iran J Fish Sci* 2014;13 (3): 776-784.

