جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی اثر ضد قارچ متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی– غیرقطبی اسفنج *Ircinia mutans*در دو فصل تابستان و زمستان موجود در جزیره کیش، خلیج فارس

ملیکا ناظمی*[۱] ؛ عباسعلی مطلبی[۲]، شهلا جمیلی[۳]؛ پرگل قوام مصطفوی[٤]؛ علی ماشینچیان[٥] و امید احمدزاده[٦]

۱،۳،٤،و٥-گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱٤٥۱٥

۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران صندوق پستی: ٦۱۱٦-۱٤۱٥٥

٦-دانشگاه دریانوردی استان هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۱

چکیده

در این تحقیق به بررسی اثر ضد قارچ عصاره های اسفنج *Ircinia mutans* پرداخته است. نمونه‌های اسفنج ازجزیره‌ی کیش در خلیج فارس توسط غواصی تهیه شد، سپس با استفاده از روش Bligh & Dyer عصاره گیری انجام شد. بررسی اثر ضد قارچ با استفاده از روش ماکرودایلوشنروی سویه‌های قارچ و مخمر ATCC10231 *Candida albicans* وPTCC5009 *Aspergillus fumigatus* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان می دهند که عصاره آبی در هیچ کدام از غلظت ها روی سویه های قارچ اثر نداشته است، عصاره‌ی دی اتیل اتری از رشد قارچ ها ممانعت نموده اما در هیچ یک از غلظت های مورد بررسی سبب مرگ آنها نشده است. اما عصاره‌های متانولی فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر و فصل زمستان در غلظت ۳ میلی‌گرم در لیتر سبب مرگ قارچ آسپرژیلوس فوماگاتوس شده است. عصاره متانولی فصل زمستان و تابستان در غلظت های ۰/٥ میلی گرم در لیتر و۱/٥ میلی گرم در لیتر سبب مرگ مخمر کاندیدا آلبیکانس شده است. بنابراین متابولیت های ثانویه‌ی محلول در متانول با ساختار شیمیایی قطبی دارای اثر ضد قارچ بوده و می توانند برای تولید دارو در فاز بعدی و بررسی های تکمیلی با هدف جداسازی و شناسایی ماده موثره ضدقارچ مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: عصاره‌های اسفنجی، ترکیبات طبیعی، منابع دریایی ، خلیج فارس

*نویسنده مسئول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه سلاح شیمیایی می باشند که اسفنج‌ها و سایر جانداران دریایی برای بقا از آن استفاده می‌کنند. به عبارت دیگر بررسی‌های انجام شده در رابطه با خصوصیات اکولوژی شیمیایی اسفنج‌ها نشان داده است که؛ متابولیت‌های ثانویه در سایر فعالیت‌های حیاتی آنها اثر نداشته و در واقع هر گونه اسفنج براساس شرایط محیطی، استراژدی خاصی را جهت تولید متابولیت‌های ثانویه انتخاب می‌کند (Muller *et al*., 2004; Thakur*et al.,* 2005). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که اسفنج‌ها یکی از منابع غنی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات طبیعی هستند (Kijjoa & Sawangwong, 2004).

در عصر حاضر ترکیبات طبیعی نقش بسیار زیادی در علوم پزشکی و دارویی ایفا می‌نمایند، در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سالهای اخیر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به نظر می‌رسد وجود ترکیباتی با ساختار استروژنی و اتمهای هیدروژن که به دلیل محیط زیست جانداران دریایی، آب، چنین ساختارهایی شکل می‌گیرد آنها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می‌نماید (Mancini *et al*., 2007). تاکنون نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده است که از این تعداد ۴۵ ترکیب با خواص دارویی در مراحل آزمایشی پیش بالینی و بالینی قرار دارند (Newman & Cragg, 2004). بسیاری از این ترکیبات استخراج شده که دارای خواص دارویی هستند از اسفنج‌ها و میکرواورگانیسم‌های همزیست آنها جداسازی شدهاند (Piel, 2006). در مطالعه انجام شده توسط Muller و همکاران (۲۰۰۴) مشخص شد که طی چهار دهه اخیر از ۵۰۰ گونه اسفنج که مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته بودند بیش از ۵۰۰۰ ترکیب با خواص بیولوژیک جداسازی و شناسایی شده است.

آزمایش‌ها و بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که خواص؛ ضدتومور، سیتوتوکسیک، نوروتوکسیک، ضدباکتری، ضدویروس، ضدقارچ، مهار کنند تقسیم میتوز، ضدپروتوزوآ، ضدالتهاب، ضدپیری، ممانعت کننده بیماری آیزایمر، ضد مالاریا از بیشترین خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه اسفنج ها می باشد (Newman & Cragg, 2004).

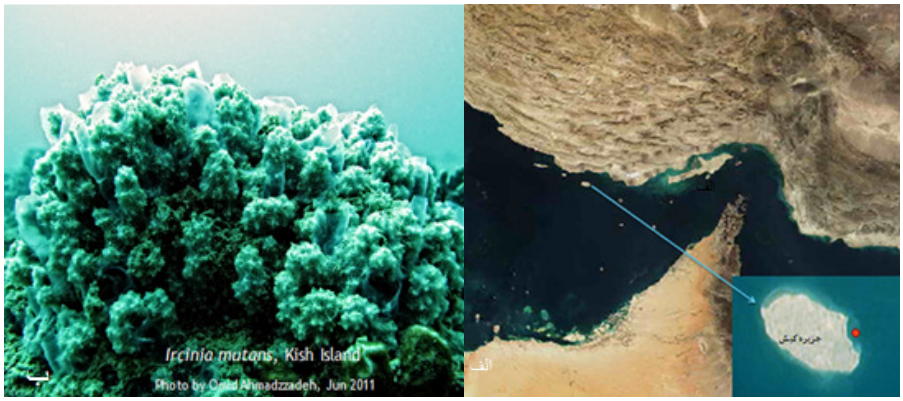
همان طور که در بالا ذکر شد یکی از اثرات بیولوژیک متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها، ضدقارچ می‌باشد. قارچ‌ها یکی از عوامل شایع بیماریزا در سرتاسر جهان هستند، که با وجود پیشرفت علم و دانش همچنان عامل بیماری و مرگ و میر می باشند (Dannaoui *et al*., 2003). به طوری که طی دهه‌های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیسم‌های فرصت طلب از قبیل سوش‌های کاندیدا، به خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به طور قابل توجهی در بسیاری از کشورها افزایش یافته است و همچنین نشان داده شده است که مخمرهای پاتوژن مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای ضد قارچی دارند (Ramani & Chaturvedi, 2003).

با توجه به اثر ضد قارچ موجود در متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها، این پژوهش به بررسی اثر ضد قارچ متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی- غیرقطبی و قطبی اسفنج گونه *Ircinia mutans* جمع‌آوری شده از جزیره کیش، با مساحت ۹۰ کیلومتر مربع در ۱۸ کیلومتری کرانه جنوبی ایران بین مختصات جغرافیایی ۵۳ درجه و ۵۳ دقیقه تا ۵۴ درجه و ۴ دقیقه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ و ۲۶ درجه و ۲۹ دقیقه تا ۲۶ درجه و ۳۵ دقیقه عرض شمالی در خلیج فارس پرداخته شده است.

مواد و روش کار

نمونه‌های اسفنج *Ircinia* spp.، که در شکل ۱ مشاهده می‌گردد، در دو فصل زمستان و تابستان مورخ ۱۳ تا ۱۵ دی ماه سال ۸۹ و ۱۳ تا ۱۶ مرداد ماه و سال ۹۰ از عمق ۱۵ تا ۲۰ متری جزیره کیش (محدود اسلکه قدیمی) توسط غواصی جمع‌آوری شدند، سپس در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد منجمد شده و با استفاده از یخ خشک، با هواپیما به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



شکل ۱. محل نمونه‌برداری که با علامت قرمز مشخص شده است (الف)، اسفنج *Ircinia spp.* در عمق ۲۰ متری جزیره کیش(ب).

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برش‌های کوچکی از بافت که شامل تکه‌هایی از سطح و قسمت‌های عمقی اسفنج است در یک لوله آزمایش قرار داده شدند. مقداری از ماده فعّال سفید کننده هیپوکلرید سدیم به برش‌ها اضافه شد و پس از زمان کوتاهی ترکیبات آلی غیر محلول جدا شدند و تنها اسکلت‌های معدنی باقی ماندند. سپس محلول سفید کننده به دقّت رقیق شده و چندین بار شست و شو با آب و سپس با اتانول انجام شد. در نهایت اسپیکلول‌های جدا شده توسط پیپت به لام‌های شیشه‌ای منتقل گشته و فرصت داده شد تا اتانول تبخیرگردد (Hooper, 2000). اسپیکولهای کلسیمی پس از خشک و خنک شدن توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

برش‌های اسفنج روی لام شیشه‌ایی قرار داده شدند، سپس چند قطره اسید نیتریک روی برش‌ها ریخته شد، به آرامی روی شعله حرارت داده شدند تا اسید به جوش آمد و این کار آن قدر تکرار گردید تا تمام مواد آلی هضم شدند (Hooper, 2000). اسپیکول‌های سیلیسی پس از خشک و خنک شدن توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

اسفنج ها پس از شست و شو با برش های دستی در ابعاد 50-100µm برش داده شدند و به مدت یک هفته در محلول فنل و زایلن به میزان هر کدام ۵۰ درصد قرار داده شدند، پس از گذشت زمان مذکور نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در اتانول قرار قرار گرفته، پس از طی این مرحله نمونه ها توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفته شد (Hooper, 2000).

عصاره‌گیری با استفاده از روش Bligh & Dyer انجام شد، ابتدا اسفنجها شسته شدند و سپس با استفاده از قیچی در اندازه‌های ۱ سانتیمتری بریده شدند، نمونه‌های خرد شده، یک کیلوگرم وزن تر اسفنج، به ارلن حاوی ۲۰۰۰ سی سی دی اتیل اتر مرک آلمان منتقل گردید، و به مدّت ۲۴ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت محلول بدست آمده از صافی عبور داده شد، محلول بدست آمده را به دستگاه روتاری وارد نموده، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۴۵، تا تمام حلال تبخیر شده و عصاره به شکل پودر خشک گردید.

به منظور استخراج ترکیبات قطبی، به اسفنجهای خرد شده ۲۰۰۰ سی‌سی متانول مرک آلمان افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت محلول بدست آمده را از صافی گذرانده، به دستگاه روتاری منتقل شد، در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و دور ۱۴۵، تا متانول به طور کامل تبخیر شد، سپس هم حجم نمونه به دست آمده (۷۵سی‌سی) اتر اضافه شد، دو فاز آبی و اتری تشکیل گردید. توسط دکاتور دو فاز فوق جدا شده و به فاز آبی به طور هم حجم N- بوتانول اضافه شد و تکان داده شد تا ترکیب شوند، سپس فاز رویی که حاوی عصاره آبی بود از فاز متانولی جدا شد، سپس به روتاری منتقل گردید به این روش عصاره خشک متانولی تهیه شد.

بررسی خواص ضد قارچ با استفاده از روش ماکرودایلوشن روی سویه های قارچ و مخمر *Candida albicans* ATCC10231 و *Aspergillus fumigates* PTCC5009 که از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد انجام گردید.

پس از رشد قارچ و مخمر آنها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط ماکرودیلوشن براث در لوله‌های آزمایش وارد شدند، سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبورنوری ۹۰ درصد استاندارد اندازه‌گیری شد، که تقریباً معادل $۱۰^{۶}$سلول قارچ درهر میلیلیتر می‌باشد. مایع تلقیحی تهیه شده باید بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد. از لوله فوق که حاوی $۱۰^{۶}$ سلول قارچی بود به مقدار ۱ میلی لیتر به هرکدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سپس از عصاره‌های متانولی، دی اتیل اتری و آبی با غلظت‌های ۵۰، ۴۰ ، ۳۰ ، ۲۰، ۱۰ ، ۵، ۳، ۲، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰/۵۰، ۰/۱۰، ۰/۰۵ و ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر که در محیط ماکرودیلوشن براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از داروی ضد قارچ نیاسین که از داروخانه تهیه شده بود، بر اساس میزان ماده موثره در هر گرم از قرص غلظت‌های فوق تهیه شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و قارچ قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. در یکی دیگر از لوله‌ها نیز محلول‌های مورد استفاده قرار داده شد. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ و ۲۶ درجه سانتیگراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

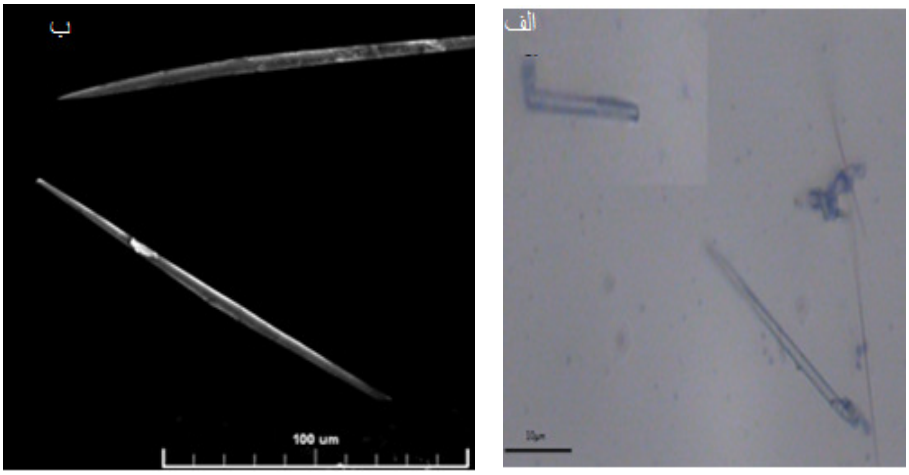
پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آنها مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعّال بیولوژیک بوده بسیار کدر شده بودند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدندکه میانگینی از ۳ مرتبه تکرار آزمایش برای هرگونه قارچی بود، لوله‌هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت نشان‌دهنده میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) که به معنای ممانعت از رشد و افزایش تعداد قارچها می‌باشد. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از لوله‌هایی که رشد در آن مشاهده نشده بود، به محیط سابوردکستروز آگار اضافه گردید. سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شد و در دمای ۲۵ و ۲۶ درجه سانتیگراد به مدّت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. کمترین غلظت که در آن سبب مرگ قارچ شده به عنوان MFC (Minimum fungicidal Concentration) منظور گردید (Green *et al.,* 1994).

نتایج

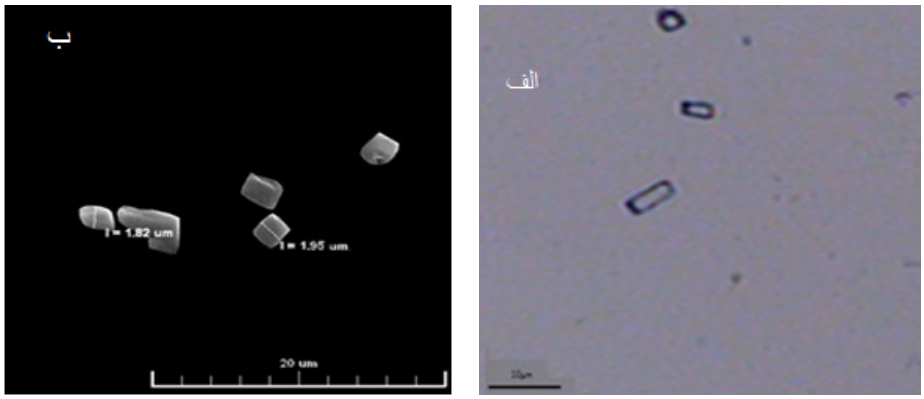
شناسایی اسفنج مورد نظر بر اساس مشاهدات اسپیکول ها و مشخصات مرفولوژی همان طور که در جدول ۱ مشاهده می گردد، انجام شد.

اسپیکول‌های مونوآکسون که در گروه مگااسکر قرار می گیرند، از لحاظ اندازه در گروه های ۲۰ تا ۳۰ میکرومتر، ۵۰ تا ۷۰ میکرومتر، ۱۰۰ تا ۱۳۵ میکرومتر طبقه بندی شدند. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد در لام های بررسی شده تعداد اسپیکول های مشاهده شده بسیار اندک بودند اما در این میان فراوان ترین اسپیکول های کلسیمی متعلق به گروه مگااسکرهای سوزنی با اندازه ۱۰۰ تا ۱۳۵ میکرومتر بود.

در لام های تهیه شده به منظور مشاهده اسپیکول های سیلیسی به روش هضم اسیدی تعداد اسپیکول های مشاهده شده در مقایسه با نمونه های کلسیمی بسیار معدود و همان طور که در شکل ۳ مشاهده می گردد تنها یک نوع اسپیکول به نام رابدمتعلّق به گروه میکرواسکلر در اندازه های ۱ تا ۵ میکرومتر مشاهده می گردد.

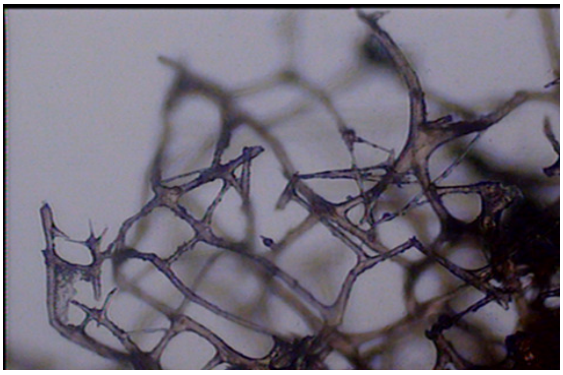


شکل۲. اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ نوری (الف)، اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ الکترونی (ب)



شکل ۳: اسپیکول های سیلیسی با میکروسکوپ نوری (الف)، اسپیکول های سیلیسی با میکروسکوپ الکترونی (ب).

در لام‌های تهیه شده به منظور مشاهده بافت اسفنج همان طور که در شکل ۴ مشاهده می گردد بافت بسیار توخالی حکایت از الیاف اسپونژین حل شده را نشان می‌دهد، از آنجا حضور اسپیکول در این نمونه بسیار محدود می‌باشد در این برش بافتی اسپیکولی مشاهده نشد.



شکل ٤: مشاهده بافت اسفنج *Ircinia mutans* توسط میکروسکوپ نوری

در جدول ۱ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) و در جدول ۳ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) مورد آزمایش عصاره های اسفنجی فصل تابستان مشاهده می گردد.

جدول ۱: حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان (براساسمیلی‌گرم بر میلی‌لیتر) (براساس سه بار تکرار (-) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که کدورت در آنها مشاهده شده)

عصاره متانولی	*C. albicans*	*A. fumigatus*	عصاره دی اتیل اتری	*C. albicans*	*A. fumigatus*	عصاره آبی	*C. albicans*	*A. fumigatus*	نیاسین	*C. albicans*	*A. fumigatus*
۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+
۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+
۰/۱	-	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+
۰/۵	-	+	۰/۵	+	+	۰/۵	+	+	۰/۵	-	-
۰/۷۵	-	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	-	-
۱/۵	-	+	۱/۵	+	+	۱/۵	+	+	۱/۵	-	-
۲	-	+	۲	+	+	۲	+	+	۲	-	-
۳	-	+	۳	+	+	۳	+	+	۳	-	-
۵	-	+	۵	+	+	۵	+	+	۵	-	-
۱۰	-	-	۱۰	+	+	۱۰	+	+	۱۰	-	-
۲۰	-	-	۲۰	-	-	۲۰	+	+	۲۰	-	-
۳۰	-	-	۳۰	-	-	۳۰	+	+	۳۰	-	-
٤۰	-	-	٤۰	-	-	٤۰	+	+	٤۰	-	-
۵۰	-	-	۵۰	-	-	۵۰	+	+	۵۰	-	-

همان طور که از جدول ۱ برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد و عصاره متانولی برابر ۱۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، اما عصاره آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده‌اند. ترکیب ضد قارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است. حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای مخمر *Candida albicans* برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، و عصاره‌های متانولی برابر ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، اما عصاره آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده‌اند. ترکیب ضد قارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است.

جدول ۲: حداقل غلظت کشندگی قارچی عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان

غلظت عصاره اسفنجی (MFC) تعداد کلونی	قارچ	تعداد کلونی
متانولی ۲۰ (میلیگرم بر میلی‌لیتر)	*Aspergillus fumigatus*	۰
متانولی ۰/۵(میلیگرم بر میلی‌لیتر)	*Candida albicans*	۰
نیاسین ۰/۷۵(میلیگرم بر میلی‌لیتر)	*Aspergillus fumigatus*	۰
نیاسین ۰/۷۵(میلیگرم بر میلی‌لیتر)	*Candida albicans*	۰

همان طور که از جدول ۲ برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۲۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، اما عصاره‌های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان ندادند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر اثر قارچ کشی از خود نشان دادند. حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای مخمر *Candida albicans* برابر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، اما عصاره‌های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان ندادند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر اثر قارچ کشی از خود نشان دادند

در جدول ۳ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) و در جدول ۴ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) مورد آزمایش عصاره های اسفنجی فصل زمستان مشاهده می گردد.

جدول ۴. حداقل غلظت ممانعت کنندگی عصاره های اسفنجی فصل زمستان (براساس mg/ml) (بر اساس سه بار تکرار (-) نمونه های فاقد کدورت، (+) نمونه هایی که کدورت در آن ها مشاهده شده).

عصاره متانولی	*C. albicans*	*A. fumigatus*	عصاره دی اتیل اتری	*C. albicans*	*A. fumigatus*	عصاره آبی	*C. albicans*	*A. fumigatus*	نیاسین	*C. albicans*	*A. fumigatus*
۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+
۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+
۰/۱	+	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+
۰/۵	+	+	۰/۵	+	+	۰/۵	+	+	۰/۵	-	-
۰/۷۵	-	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	-	-
۱/۵	-	+	۱/۵	+	+	۱/۵	+	+	۱/۵	-	-
۲	-	-	۲	+	+	۲	+	+	۲	-	-
۳	-	-	۳	+	+	۳	+	+	۳	-	-
۵	-	-	۵	+	+	۵	+	+	۵	-	-
۱۰	-	-	۱۰	+	-	۱۰	+	+	۱۰	-	-
۲۰	-	-	۲۰	-	-	۲۰	+	+	۲۰	-	-
۳۰	-	-	۳۰	-	-	۳۰	+	+	۳۰	-	-
٤۰	-	-	٤۰	-	-	٤۰	+	+	٤۰	-	-
۵۰	-	-	۵۰	-	-	۵۰	+	+	۵۰	-	-

همان طور که از جدول ۳ برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۱۰ میلی گرم در لیتر می‌باشد، و عصاره‌های متانولی برابر ۲ میلی گرم در لیتر می باشد، اما عصاره آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان ندادند. ترکیب ضد قارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است. حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای مخمر *Candida albicans* برابر ۲۰ میلی گرم در لیتر می‌باشد، و عصاره های متانولی برابر ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر می باشد، اما عصاره آبی نسبت به قارچ مذکور هیچ گونه اثری را از خود نشان نداده اند. ترکیب ضدقارچ مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ ها جلوگیری نموده است.

جدول٤: حداقل کشندگی قارچی عصاره‌های اسفنجی فصل زمستان(MFC)

غلظت عصاره اسفنجی (MFC) تعداد کلونی	قارچ	تعداد کلونی
متانولی (میلیگرم بر میلی‌لیتر)۳	*Aspergillus fumigatus*	۰
متانولی (میلیگرم بر میلی‌لیتر) ۱/۵	*Candida albicans*	۰
نیاسین (میلیگرم بر میلی‌لیتر)۰/۷۵	*Aspergillus fumigatus*	۰
نیاسین (میلیگرم بر میلی‌لیتر) ۰/۷۵	*Candida albicans*	۰

همان طور که از جدول ۴ برداشت می شود؛ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۳ میلیگرم در لیتر می باشد، اما عصاره‌های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان نداده‌اند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر اثر قارچ‌کشی از خود نشان داده اند. حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای مخمر *Candida albicans* برابر ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر می باشد، اما عصاره‌های دی اتیل اتری و آبی اثر قارچ کشی از خود نشان ندادند. نیاسین مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر اثر قارچ کشی از خود نشان دادند.

بحث

یکی از خواص بیولوژیک موجود در اسفنج‌ها خواص ضد قارچ می‌باشد، به همین منظور در این تحقیق علمی این اثر بیولوژیک در رابطه با عصاره‌های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Ircina mutans* در دو فصل زمستان و تابستان با استفاده از روش براث روی قارچ *Aspergillus fumigates* و مخمر *Candida albicans* انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل تابستان در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ *A. fumigates* جلوگیری نموده و در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر سبب مرگ قارچ مذکور شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ *A. fumigatus* جلوگیری نموده اما در هیچ کدام از غلظت های مورد بررسی سبب مرگ قارچ نشده است. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج مذکور در فصل زمستان در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ *A. fumigatus* جلوگیری نموده و در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر سبب مرگ قارچ شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل زمستان در غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ *A. fumigatus* جلوگیری نموده اما در هیچ کدام از غلظت های مورد بررسی سبب مرگ قارچ نشده است.

در آزمایشی که با استفاده از عصاره های متانولی و کلروفنلی اسفنج جنس *Haliclona* spp. از سواحل صخره ای مالزی روی قارچ *A. fumigatus* انجام گردید مشخص شد که هیچ کدام از عصاره های مورد آزمایش از رشد قارچ جلوگیری نمی نمایند(Darah *et al*., 2011).

در یک تحقیق علمی اثر ضدقارچ عصاره کلروفرم- متانولی اسفنج *Dysidea herbacea* با استفاده از روش براث روی قارچ آسپرژیلوس فوماگاتوس انجام گردید مشخص که در غلظت ۷/۸ میکروگرم در لیتر از رشد قارچ جلوگیری نموده و در غلظت ۱۵/۶۲ میکروگرم سبب مرگ قارچ مورد آزمایش می‌گردد (Sionov *et al*., 2005).

در بررسی اثر ضدقارچ عصاره های آبی و کلروفرمی اسفنج گونه *Callyspongia* spp. از سواحل ماندابامهند که با استفاده از روش دیسک روی سویه قارچ *Aspergillus niger* با غلظت‌های ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر انجام شد مشخص شد که هیچ کدام از عصاره‌های مورد آزمایش اثر ضدقارچی از خود نشان ندادند (Dhanalakshmi *et al*., 2012).

همان طور که بررسی های انجام شده نشان می دهند بررسی خواص ضدقارچ عصاره های اسفنجی روی جنس آسپرژیلوس بسیار محدود می باشد، بسیاری از عصاره های اسفنجی از رشد این قارچ جلوگیری نمی نمایند و اثر ضد قارچ از خود نشان نمی دهند و آزمایش هایی که اثر ضدقارچ از خود نشان می دهند در غلظت های بالا موثر بوده اند اما عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل زمستان در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر از رشد قارچ جلوگیری نموده و در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر سبب مرگ قارچ شده است، که نشان می دهد این اسفنج دارای اثر ضدقارچ قوی است و می تواند به عنوان نمونه ای مناسب برای سایر آزمایش های تکمیلی معرفی گردد.

اثر ضد قارچ عصاره های دی اتیل اتری، متانولی و آبی اسفنج *Ircina mutans*در دو فصل زمستان و تابستان با استفاده از روش براث روی مخمر *andida albicans* نیز انجام گردید. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج *I. mutans*در فصل تابستان در غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر از رشد مخمر*C. Albicans* جلوگیری نموده و در غلظت ۰/۵ میلی گرم در لیتر سبب مرگ مخمر مذکور شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر رشد مخمر*C. albicans* جلوگیری نموده اما در هیچ کدام از غلظت های مورد بررسی سبب مرگ مخمر نشده است. عصاره متانولی استخراج شده از اسفنج مذکور در فصل زمستان در غلظت ۰/۷۵ میلی گرم در لیتر از رشد مخمر *C. albicans*جلوگیری نموده و در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر سبب مرگ قارچ شده است. عصاره دی اتیل اتری استخراج شده از اسفنج *I. mutans* در فصل زمستان در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر از رشد مخمرجلوگیری نموده اما در هیچ کدام از غلظت‌های مورد بررسی سبب مرگ مخمر نشده است.

در تحقیق دیگری که در رابطه با خواص ضدقارچ عصاره‌های خشک متانولی و دی کلرومتانی اسفنج های سواحل موروکان واقع در اقیانوس اطلس با استفاده از روش دیسک با غلظت ۵ میلی گرم روی مخمر*C. albicans* انجام گردید؛ مشخص شد که هیچ کدام از عصاره‌های اسفنج های *Haplosclerida* spp.4، *Haploscleridaadocia oros*، *Haplosclerida spp.3*، *Axinella polypoides*، *Ircinia Cliona celata*، *Cinachyrella tarentine*، *Haplosclerida* spp.9، *Ircinia spinulosa*، *Ircinia*

*Haliclona mediterranea*و*dendroides* روی مخمر مورد آزمایش اثر ضد قارچ از خود نشان نداده است. عصاره دی کلرومتانی اسفنج *Cliona viridis* و *Haliclona viscose* تا فاصله ۱۱ و ۱۰میلی متر و عصاره‌های متانولی اسفنج *Cinachyrella tarentine* تا فاصله ۱۴ میلی متر از رشد مخمر مذکور جلوگیری نمودند (Amraouia *et al*., 2010).

در آزمایش انجام شده در رابطه با اثر ضدقارچ عصاره اتیل استاتی اسفنج های سواحل تونس با استفاده از روش دیسک که با غلظت 10mg/disk انجام شد مشخص گردید که اسفنج‌های *Spongia* spp.، *I. spinosula*، *Hippospongiacommunis*، *Ircinia sarcotragus* اثر ضدقارچ روی مخمر *C. albicans* از خود نشان نمی دهند اما عصاره اسفنجی *Agelasoroides* تا فاصله ۹ میلی متر از رشد مخمر مذکور جلوگیری نموده است (Touati *et al*., 2007).

از مقایسه نتایج اثر ضدقارچی عصاره های متانولی و دی اتیل اتری اسفنج *I. mutans* با داروی ضدقارچ نیاسین، به ویژه عصاره دی اتیل اتری فصل زمستان و با توجه به اینکه عصاره در این آزمایش مورد بررسی گرفته که حاوی ناخالصیهای زیادی است، ،با تخلیص ماده مؤثره اسفنج *I. mutans* و انجام تحقیقات بیشتر، به ترکیبی با اثرات ضدقارچ قابل قبول و عوارض جانبی کم برای درمان عفونتهای قارچی دست یافت.

مطالعاتی که تا کنون روی خواص ضدقارچ اسفنج ها انجام شده است نشان می‌دهد تعداد اندکی از اسفنج ها اثر ضدقارچ از خود نشان می‌دهند، بر اساس آزمایش‌های انجام شده اثر ضدقارچ و مخمر عصاره‌های تهیه شده از ۷۷۷ گونه اسفنج مشخص شد که تنها ۱۰ درصد آنها اثر ضد قارچ از خود نشان می‌دهند. در این میان اسفنج‌هایی که دارای تعداد بیشتری باکتری های همزیست هستند اثر ضدقارچ ضعیف‌تری از خود نشان می‌دهند (Amade *et al.,* 1987).

منابع

Amade P., Charroin, C., Baby. C. and Vacelet J., 1987. Antimicrobial activities of marine spongesfrom the Mediterranean Sea.Marine biology, 94(2): 271-275.

Amraouia B.E., Biardb, J.F., Urizc, M.J., Rifaia, S. and Fassouane A., 2010. Antifungal and antibacterial activity of Porifera extracts from the Moroccan Atlantic coasts. Mycology Medical., 20:70-74.

Bligh E. G. and Dyer W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37:911-917.

Dannaoui E., Lortholary O. and Dromer F., 2003. Technique des associations d'antifongiques *in vitro* et in vivo chez l'animal. Mycology Medical, 13:73–85.

Dhanalakshmi J., Biwott F.K. and Selvi S., 2012. An *invitro* antimicrobial activity and bioactivities of protein isolated from marine sponge – *Callyspongia* spp. Research in Pharmacy, 2(1):36-41.

Green L., Petersen B. and Steimel L., 1994. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry, Clinical Microbiology, 32: 1088-91.

Hooper J.N.A., 2000. Guide to Sponge Collection and Identification, Queensland Meuseum. pp.1-138.

Kijjoa A., and Sawangwong P., 2004. Drugs and cosmetics from the sea. Marine Drugs, 2:73–82.

Mancini I., Defant A., and Guella G., 2007. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti-infective agents in medicinal chemistry, 17:17-47.

Muller W.E., Grebenjuk W.E., Le Pennec G., Schroeder H., Brummer F., and Hentschel, I, 2004, Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: a review. Marine Biotechnology, 6:105–117.

Newman D.J. and Cragg, G.M, 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. Journal Natural Products, 67: 1216–1238.

Piel A. J., 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. Medical Chemistry , 13:39–50.

Ramani R., and Chaturvedi, V, 2000. Flow cytometry antifungal susceptitility testing of pathogenic yeasts other than candida albicans and comparison with the NCCLS broth MICrodilution test. Antimicrob. Agent Chemotherapy, 44:2752-8.

Sionov E., Dalit, R., Sandovsky-Losica H., Kashman Y., Rudi, A., Liat, R., and Segal, R, 2005. Antifungal effect and possible mode of activity of a compound from the marine sponge *Dysidea Herbacea*. Journal of Infection, 50: 453-460.

Thakur –N.L., Thakur –A.N. and Muller –W.E., 2005. Marine natural products In drug discovery. Natural Products Radiance, 4:471-477.

Comparison of antifungal activities of semipolar- nonpolar secondary metabolites of *Ircinia mutans* extracts in two different seasons from Kish Island, Persian Gulf

Nazemi M.[(1)]*; Motallebi A.A.[(2)]; Jamili Sh. [(3)]; Mashinchian A. [(4)]; Gavam Mostaavi P. [(5)] and Ahmadzadeh O. [(6)]

melikanazemi@yahoo.com

1,4,5- Department of Marine Biology, Marine Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research, Iran, P.O.Box: 14515-775 Tehran,Iran

2-Iranian Fisheries Research Organization, .O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

6-Maritime University, Hormozgan, Iran

Received: J\nuary 2011 Accepted: March 2012

Keywords: Sponge, Secondary metabolites, Natural products, antifungal, Kish Island, Persian Gulf.

Abstract

In this research for the first time tested antifungal activity of *Ircinia mutans*, collected from Kish Island in the Persian Gulf. The extracts were produced by Bligh & Dyer method, In vitro antifungal activity by Broth Dilution Methods against clinical pathogens; *Candida albicans* ATCC10231 and *Aspergillus fumigatus* PTCC5009. The results conducted that the aqueous extracts didn't have any antifungal activities on pathogens, minimum inhibitor concentrations (MIC) of the diethyletter extract was found on *C. albicans* and *Aspergillus fumigatu*, but MFC was not found. The MFC of summer and winter metanol extracts were 20mg/ml and 3mg/ml on *A. fumigatus* and 0.5 mg/ml and 1.5 mg/ml on C. *albicans.* Therefore secondary metabolites solutions in metanol, polar components have antifungal activity and it can be used for supplementary experiments to isolate and identify the fungicide active ingredient.

*Corresponding author