

بررسی اثر ضد قارچ متابولیت‌های ثانویه نیمه قطبی - غیر قطبی 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^(۴)؛ علی ماشینچیان^(۵)

۱،۳،۴-۵ گروه بیولوژی دریا، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵

۲-موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

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 از جزیره‌ی 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 *Candida albicans* ATCC10231 و PTCC5009 و *Aspergillus fumigatus* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهند که عصاره آبی در هیچ کدام از غلظت‌ها روی سویه‌های قارچ اثر نداشته است، عصاره‌ی دی اتیل اتری از رشد قارچ‌ها ممانعت نموده اما در هیچ یک از غلظت‌های مورد بررسی سبب مرگ آنها نشده است. اما عصاره‌های متانولی فصل تابستان در غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر و فصل زمستان در غلظت ۳ میلی گرم در لیتر سبب مرگ قارچ اسپرژیلوس فوماگاتوس شده است. عصاره متانولی فصل زمستان و تابستان در غلظت‌های ۰/۵ میلی گرم در لیتر و ۱/۵ میلی گرم در لیتر سبب مرگ مخمر کاندیدا آلبیکانس شده است. بنابراین متابولیت‌های ثانویه‌ی محلول در متانول با ساختار شیمیایی قطبی دارای اثر ضد قارچ بوده و می‌توانند برای تولید دارو در فاز بعدی و بررسی‌های تکمیلی با هدف جداسازی و شناسایی ماده موثره ضدقارچ مورد استفاده قرار گیرند.

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

مقدمه

متابولیت‌های ثانویه سلاح شیمیایی می‌باشند 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، استراژی خاصی را جهت تولید متابولیت‌های ثانویه انتخاب می‌کند (Muller et al., 2004; Thakuret et al., 2005). بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که اسفنج‌ها یکی از منابع غنی تولید کننده متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات طبیعی هستند (Kijjoo & 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 استروئیدی 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، ضدپروتوزوا، ضدالتهاب، ضدپیری، ممانعت کننده بیماری آیزایمر، ضد مالاریا از بیشترین

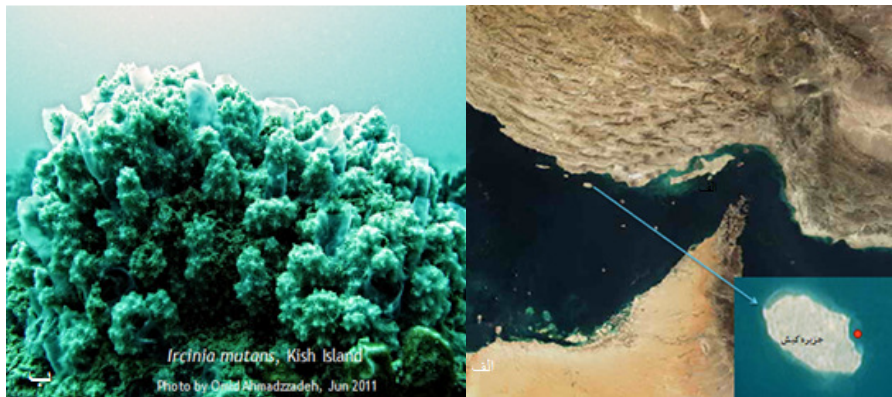
خواص بیولوژیک متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها می‌باشد (Newman & Cragg, 2004).

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 می‌باشند (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.



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

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 مدت 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 سی سی 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 (۷۵ سی سی) 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 روپی 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.

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 فعال 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 دقت 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 تبخیر گردد (Hooper, 2000). اسپیکول‌های کلسیمی پس از خشک و خنک شدن توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی SEM مورد بررسی قرار گرفتند.

برش‌های اسفنج روی لام شیشه‌ای 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. اسفنج‌ها پس از شست و شو با برش‌های دستی در ابعاد 50-100µm برش داده شدند و به مدت یک هفته در محلول فتل و زایلن به میزان هر کدام ۵۰ درصد قرار داده شدند، پس از گذشت زمان مذکور نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتانول قرار قرار گرفته، پس از طی این مرحله نمونه‌ها 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

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 مدت 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

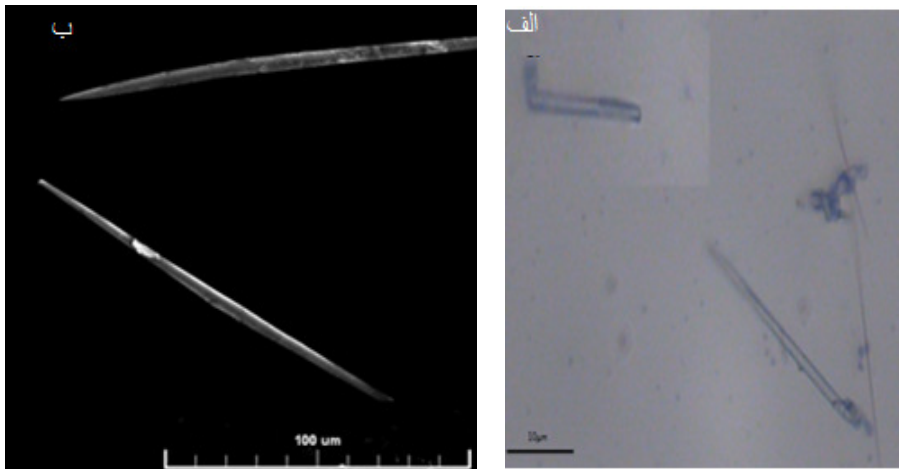
شناسایی اسفنج مورد نظر بر اساس مشاهدات اسپیکول‌ها و مشخصات مرفولوژی همان طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، انجام شد.

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

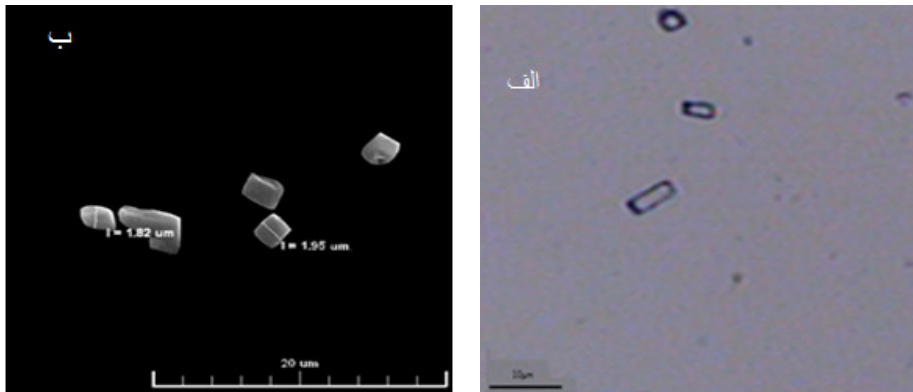
در لام‌های تهیه شده به منظور مشاهده اسپیکول‌های سیلیسی به روش هضم اسیدی تعداد اسپیکول‌های مشاهده شده در مقایسه با نمونه‌های کلسیمی بسیار معدود و همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد تنها یک نوع اسپیکول به نام رابدمتعلق به گروه میکرواسکر در اندازه‌های ۱ تا ۵ میکرومتر مشاهده می‌گردد.

پس از رشد قارچ و مخمر آنها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط ماکرودیولوشن برات در لوله‌های آزمایش وارد شدند، سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتری دارای عبورنوری ۹۰ درصد استاندارد اندازه‌گیری شد، که تقریباً معادل ۱۰^۶ سلول قارچ در هر 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 هر کدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سپس از عصاره‌های متانولی، دی اتیل اتری و آبی با غلظت‌های ۰،۳۰، ۰،۲۰، ۰،۱۰، ۰،۵، ۰،۳، ۰،۲، ۰،۱۵، ۰،۰۷۵، ۰،۰۵۰، ۰،۰۱۰، ۰،۰۰۵ و ۰،۰۰۱ میلی گرم در لیتر که در محیط ماکرودیولوشن برات حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله‌های 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 فعال 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 مدت 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 فعال بیولوژیک بوده بسیار کدر شده بودند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند که 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



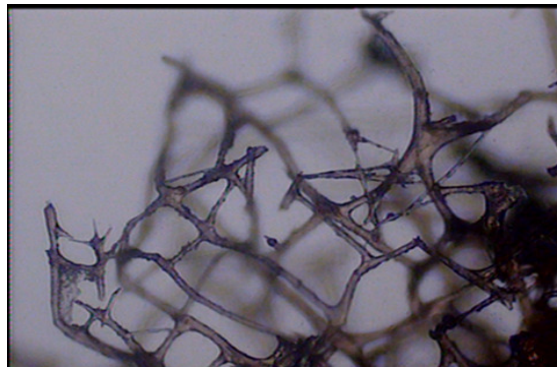
شکل ۲. اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ نوری (الف)، اسپیکول های کلسیمی با میکروسکوپ الکترونی (ب).



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

حضور اسپیکول در این نمونه بسیار محدود می باشد در این برش بافتی اسپیکولی مشاهده نشد.

در لام های تهیه شده به منظور مشاهده بافت اسفنج همان طور که در شکل ۴ مشاهده می گردد بافت بسیار توخالی حکایت از یاف اسپونژین حل شده را نشان می دهد، از آنجا



شکل ۴: مشاهده بافت اسفنج *Ircinia mutans* توسط میکروسکوپ نوری

در جدول ۱ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد قارچ (MIC) و در جدول ۳ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) مورد آزمایش عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان مشاهده می‌گردد.

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

عصاره متانولی	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	عصاره دی اتیل اتری	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	عصاره آبی	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	نیاسین	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	عصاره متانولی
۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱
۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵
۰/۱	-	-	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	-	۰/۱
۰/۵	-	-	۰/۵	+	+	۰/۵	+	+	۰/۵	+	-	۰/۵
۰/۷۵	-	-	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	+	-	۰/۷۵
۱/۵	-	-	۱/۵	+	+	۱/۵	+	+	۱/۵	+	-	۱/۵
۲	-	-	۲	+	+	۲	+	+	۲	+	-	۲
۳	-	-	۳	+	+	۳	+	+	۳	+	-	۳
۵	-	-	۵	+	+	۵	+	+	۵	+	-	۵
۱۰	-	-	۱۰	+	+	۱۰	+	+	۱۰	+	-	۱۰
۲۰	-	-	۲۰	-	-	۲۰	-	-	۲۰	-	-	۲۰
۳۰	-	-	۳۰	-	-	۳۰	-	-	۳۰	-	-	۳۰
۴۰	-	-	۴۰	-	-	۴۰	-	-	۴۰	-	-	۴۰
۵۰	-	-	۵۰	-	-	۵۰	-	-	۵۰	-	-	۵۰

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 قارچ‌ها جلوگیری نموده است.

همان‌طور 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 قارچ‌ها جلوگیری نموده

جدول ۲: حداقل غلظت کشندگی قارچی عصاره‌های اسفنجی فصل تابستان

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

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 میلی گرم 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.

همان طور که از جدول ۲ برداشت می شود؛ حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۲۰ میلی گرم 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 میلی گرم در لیتر اثر قارچ کشی از خود نشان دادند. حداقل غلظت کشندگی قارچی (MFC) عصاره متانولی برای مخمر *Candida albicans* برابر ۰/۵ میلی گرم در لیتر می باشد.

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

عصاره متانولی			عصاره دی اتیل اتری			عصاره آبی		
A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	نیاسین	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	نیاسین	A. <i>fumigatus</i>	C. <i>albicans</i>	نیاسین
+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱	+	+	۰/۰۱
+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵	+	+	۰/۰۵
+	+	۰/۱	+	+	۰/۱	+	+	۰/۱
-	-	۰/۵	+	+	۰/۵	+	+	۰/۵
-	-	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵	+	+	۰/۷۵
-	-	۱/۵	+	+	۱/۵	+	+	۱/۵
-	-	۲	+	+	۲	+	+	۲
-	-	۳	+	+	۳	+	+	۳
-	-	۵	+	+	۵	+	+	۵
-	-	۱۰	+	+	۱۰	-	+	۱۰
-	-	۲۰	+	+	۲۰	-	-	۲۰
-	-	۳۰	+	+	۳۰	-	-	۳۰
-	-	۴۰	+	+	۴۰	-	-	۴۰
-	-	۵۰	+	+	۵۰	-	-	۵۰

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 می باشد، 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.

همان طور که از جدول ۳ برداشت می شود؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ (MIC) عصاره دی اتیل اتری برای قارچ *Aspergillus fumigatus* برابر ۱۰ میلی گرم در لیتر می باشد، و عصاره های 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

جدول ۴: حداقل کشندگی قارچی عصاره های اسفنجی فصل زمستان (MFC)

تعداد کلونی	قارچ	غلظت عصاره اسفنجی (MFC) تعداد کلونی
۰	<i>Aspergillus fumigatus</i>	متانولی (میلیگرم بر میلی لیتر) ۳
۰	<i>Candida albicans</i>	متانولی (میلیگرم بر میلی لیتر) ۱/۵
۰	<i>Aspergillus fumigatus</i>	نیاسین (میلیگرم بر میلی لیتر) ۰/۷۵
۰	<i>Candida albicans</i>	نیاسین (میلیگرم بر میلی لیتر) ۰/۷۵

در بررسی اثر ضدقارچ عصاره های آبی و کلروفومی اسفنج گونه *Callyspongia* spp. از سواحل ماندابامهند که با استفاده از روش دیسک روی سوبه 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 اسپریژیلوس 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 برات 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 میلی لیتر 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 مخمر جلوگیری 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 *Haplosclerida* spp.3 *Ircinia Axinella polypoides* *Haplosclerida* spp.3 *Cinachyrella tarentine* *Cliona celata* oros *Ircinia* *Ircinia spinulosa* *Haplosclerida* spp.9

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 برات 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 کلروفنی 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 کلروفوم - متانولی اسفنج *Dysidea herbacea* با استفاده از روش برات روی قارچ اسپریژیلوس 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).

- Dhanalakshmi J., Biwott F.K. and Selvi S., 2012.** An *in vitro* 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.
- Kijjoo 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 susceptibility testing of pathogenic yeasts other than candida albicans and comparison with the NCCLS broth MIC dilution 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.
- آزمایش اثر ضد قارچ از خود نشان نداده است. عصاره دی کلرومتانی اسفنج *Cliona viridis* و *Haliclona viscosa* تا فاصله ۱۱ و ۱۰ میلی متر و عصاره های 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 اسفنج های *I. spinosula*, *Spongia* spp., اثر *Ircinia sarcotragus* *Hippospongiacommunis* 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 می دهد تعداد اندکی از اسفنج ها اثر ضدقارچ از خود نشان می دهند، بر اساس آزمایش های انجام شده اثر ضدقارچ و مخمر عصاره های تهیه شده از ۷۷۷ گونه اسفنج مشخص شد که تنها ۱۰ درصد آنها اثر ضد قارچ از خود نشان می دهند. در این میان اسفنجهایی که دارای تعداد بیشتری باکتری های همزیست هستند اثر ضدقارچ ضعیف تری از خود نشان می دهند (Amade *et al.*, 1987).

منابع

- Amade P., Charroin, C., Baby. C. and Vacelet J., 1987.** Antimicrobial activities of marine sponges from 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.

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: January 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 diethylether extract was found on *C. albicans* and *Aspergillus fumigatus*, 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