

Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Effect of *Stichodactyla haddoni* from Persian Gulf

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Abbasi H.¹ MSc,
Kamrani E.^{*2} PhD,
Amrollahi Biuki N.¹ PhD,
Ehsanpoor M.³ MSc

How to cite this article

Abbasi H, Kamrani E, Amrollahi Biuki N, Ehsanpoor M. Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Effect of *Stichodactyla haddoni* from Persian Gulf Journal of Biotechnology. 2018;9(3):403-409.

ABSTRACT

Aims No study has been conducted on the antibacterial activity of sea anemone in the Persian Gulf region; thus, the aim of the present study was to investigate the antibacterial, antifungal, and cytotoxic effect of *Stichodactyla haddoni* from Persian Gulf.

Materials & Methods In this experimental study, sea anemone samples were collected from the coast of Persian Gulf (Hormoz Island) and their extraction was performed with organic solvents such as methanol, dichloromethane, and acetone. The effect of the extract obtained on human pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*, and fungus strains such as *Candida albicans*, *Aspergillus niger* was tested, using agar disk diffusion method. The cytotoxicity of this anemone was evaluated, using brine shrimp test (BST) method on *Artemia salina*. The data were analyzed by SPSS 19, using Probit regression test.

Findings The extracts studied in this study showed little anti-bacterial effect. In antifungal assay, inhibition zone was showing maximum of 17mm at 16µg concentration against *Aspergillus niger* of acetone extract of *S.haddoni*. The methanolic extracts of *S.haddoni* tissue had a higher cytotoxicity with less LC50 (609 330/µg/ml) than acetone and dichloromethane extracts.

Conclusion Methanolic, acetone, and dichloromethane extracts, from *S.haddoni* have an antifungal effect on their antibacterial properties. It also has significant cytotoxic effects, which is higher in methanolic extract than acetone and dichloromethane extracts.

Keywords *Stichodactyla haddoni*; Antibacterial Activities; Antifungal Activities; Cytotoxic; Disk diffusion

CITATION LINKS

[1] Marine biodiversity as a source of chemical ... [2] Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex ... [3] Biological screening methods in the search for ... [4] The Sea, the future ... [5] Anticancer and cytotoxic compounds from ... [6] Assessment of biomedical and pharmacological activities ... [7] Sea anemone peptide with uncommon β-hairpin structure inhibits acid-sensing ... [8] Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals ... [9] Antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of a sea ... [10] Antibacterial activity in *Strongylocentrotus* ... [11] Bioactivity of venom extracted from the sea anemone *Anthopleura* ... [12] Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside ... [13] Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts ... [14] Antifouling activity by sea anemone ... [15] Antifungal and antibacterial activities ... [16] Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica* ... [17] Triterpene glycosides with antifungal activity isolated from the sea cucumber ... [18] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational ... [19] Antibacterial effect of the Persian Gulf sea cucumber *Holothuria*. SP extracts on three strain of *Escherichia* ... [20] Effects of *Silybum marianum* (L.) gaertn seeds ... [21] Pictorial laboratory ... [22] Antimicrobial activity of *Potentilla* ... [23] Comparative study of the antifungal activity of triterpene glycosides ... [24] In vitro anti-epimastigote activity of some Iranian ... [25] Brine shrimp cytotoxicity of some medicinal plants belongs to *lamiaceae*, *asteraceae*, *rosaceae* and ... [26] Cytotoxicity of *Dorema auchri*, *Achillea millefolium* and ... [27] Antimicrobial and hypoglycemic effects ... [28] Variation of nitrogenase ... [29] Antiseptics and disinfectants: Activity ... [30] Antimicrobial properties of sea anemone *Anthopleura* ... [31] Antimicrobial activity of tissue and associated bacteria from ... [32] Anti microbial activity of the cnidarian blue button *Porpita* ... [33] Isolation and biological properties of neurotoxin from sea anemone ... [34] Screening for antibacterial, antifungal and cytotoxic agents in three hard coral species from ...

¹Marine Biology Department, Marine Sciences & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

²Fisheries Department, Marine Sciences & Technology Faculty, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran

³Fisheries Department, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran

*Correspondence

Address: Hormozgan University, 9 Kilometer Minab Road, Bandar Abbas, Iran. Postal Code: 7916193145
Phone: +98 (76) 33711000
Fax: +98 (76) 33711025
ezas47@gmail.com

Article History

Received: October 27, 2017

Accepted: March 03, 2018

ePublished: September 22, 2018

اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و سایتوتوکسیک عصاره‌های گونه شقایق دریایی موکتی خلیج فارس

حمیده عباسی * MSc

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

احسان کلرامانی PhD

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

نرگس امراللهی بیوکی PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

مریم احسان پور MSc

گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران

چکیده

اهداف: هیچ گونه مطالعه آنتی‌باکتریال روی شقایق‌های دریایی در منطقه خلیج فارس در ایران انجام نشده است، بنابراین هدف این پژوهش، بررسی اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و سایتوتوکسیک عصاره‌های گونه شقایق دریایی موکتی خلیج فارس بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش تجربی، نمونه‌های شقایق دریایی از سواحل خلیج فارس (جزیره هرمز)، جمع‌آوری و عصاره‌گیری آنها با حلال‌های آلی متانول، دی‌کلرومتان و استون صورت پذیرفت. اثر عصاره‌ها بر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی شامل *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین دو سویه قارچی *کاندیدا آلبیکانس* و *آسپرژیلوس نایچر* با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت. خاصیت سایتوتوکسیک این شقایق با استفاده از روش BST بر *آرتمیا سالینا* ارزیابی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 19 از طریق آزمون رگرسیون پروبیت مورد تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: عصاره‌های مورد مطالعه اثر ضدباکتریایی کمی از خود نشان دادند. عصاره استونی اثر ضدقارچی را در برابر سویه قارچی *آسپرژیلوس نایچر* با هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر در وزن ۱۶ میکروگرم نشان داد. عصاره متانولی بافت شقایق دارای خاصیت سایتوتوکسیک بیشتری با LC50 کمتر (۶۰۹/۳۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به عصاره‌های استون و دی‌کلرومتان بود.

نتیجه‌گیری: عصاره‌های متانولی، استونی و دی‌کلرومتانی استخراجی از شقایق دریایی موکتی، خاصیت ضدقارچی زیادی نسبت به خاصیت آنتی‌باکتریال آنها دارند. همچنین این شقایق اثرات سایتوتوکسیک قابل ملاحظه‌ای دارد که در عصاره متانولی نسبت به عصاره‌های استون و دی‌کلرومتان بیشتر است.

کلیدواژه‌ها: شقایق دریایی موکتی، فعالیت ضدباکتری، فعالیت ضدقارچی، سایتوتوکسیک، انتشار دیسک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲

* نویسنده مسئول: ezas47@gmail.com

مقدمه

با وجود پیشرفت فوق‌العاده در پزشکی، بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها هنوز هم یک تهدید عمده برای سلامت عمومی هستند^[1]. به‌منظور از بین بردن و مهار آنها باید از آنتی‌بیوتیک‌ها که هر کدام با مکانیزم‌های متفاوتی وارد عمل می‌شوند، استفاد نمود^[2]. به‌دنبال تکامل مداوم میکروب‌های بیماری‌زا و مقاومت آنها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و موثر ضد میکروبی وجود داشته است^[1].

ترکیبات طبیعی از دوران باستان به‌عنوان مهم‌ترین منبع تهیه داروها مورد توجه بوده است و اکنون نیمی از داروهای مورد استفاده انسان منشأ طبیعی دارند. در سال‌های اخیر گرایش

زیست‌فناوری دانشگاه تربیت مدرس

جدیدی به جداسازی ترکیبات فعال بیولوژیک از منابع طبیعی دریایی مشاهده می‌شود^[3, 1] و تاکنون نزدیک به ۱۵۰۰۰ ترکیب طبیعی از جانداران دریایی استخراج و شناسایی شده است. محققان بر این باور هستند که دریا می‌تواند سرچشمه کشف داروهای امیدوارکننده برای بیمارانی باشد که از منابع زمینی ناامید شدند و از درمان دست کشیده‌اند^[4]. همچنین از آنجا که ۶۰٪ داروهای مورد استفاده در درمان سرطان منشأ طبیعی دارند، دور از ذهن نخواهد بود که به دریا همچون گستره‌ای فراهم برای یافت ترکیبات ضدتومور نگاه شود^[5].

شاخه نیداریا شامل جانوران قدیمی و متنوع بوده و دارای تنوع فراوانی از مواد فعال زیستی است^[6]. شقایق‌های دریایی شبیه دیگر نیداریا خیلی از پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدهای فعال زیستی از قبیل نوروتوکسین‌ها و توکسین‌های ایجادکننده منافذ (pore forming) یا سیتولیزین، فسفولیپازها و پروتئینازهای بازدارنده را شامل می‌شوند. نوروتوکسین‌های شقایق‌های دریایی ابزارهای بسیار مهمی در پژوهش‌های فیزیولوژی اعصاب و داروشناسی هستند^[7]. در ایران با وجود این که محیط‌های دریایی خلیج فارس و دریای عمان منبع عظیمی از این موجودات را در اختیار گذاشته است، متأسفانه به‌دلیل عدم آگاهی از فواید آنها هیچ گونه استفاده‌ای از این جانوران بالارزش نمی‌شود^[4].

با توجه به این که هیچ گونه کار آنتی‌باکتریال روی شقایق‌های دریایی در منطقه خلیج فارس در ایران انجام نشده است، بنابراین هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و سایتوتوکسیک عصاره‌های گونه شقایق دریایی موکتی با نام علمی *استیکوداکتیل هادونی* (*Stichodactyla haddoni*) خلیج فارس بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، نمونه‌های شقایق دریایی موکتی با استفاده از عملیات غواصی در سواحل هرمزگان (جزیره هرمز) در عمق ۸-۵ متری در ماه بهمن جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌صورت زنده در جعبه‌های یخ به آزمایشگاه (آزمایشگاه محیط زیست هرمزگان) منتقل شدند و شناسایی گونه مورد نظر به‌وسیله کلید شناسایی توسط کارشناس مربوطه انجام گرفت^[8, 9].

عصاره‌گیری: نمونه‌های جمع‌آوری شده با آب مقطر شست‌وشو داده شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن جدا شود. سپس در فریزر نگهداری شدند^[9, 10]. نمونه‌ها برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در فریزر درایر قرار داده^[11] و سپس پودر شدند. عصاره‌گیری با استفاده از حلال‌های متانول، دی‌کلرومتان و استون و به‌ترتیب افزایش قطبیت به روش پرکولاسیون انجام گرفت و در آخر عصاره‌ها با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شدند^[12-14].

بررسی اثر ضدباکتریایی و ضدقارچی

روش‌های مختلفی برای تعیین حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مانند تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و دیسک دیفیوژن (انتشار دیسک) وجود دارد. اما متداول‌ترین روش همان دیسک دیفیوژن است که در پژوهش حاضر از آن استفاده شد.

تلقیح دیسک‌های بلنک با عصاره: به‌منظور اطمینان بیشتر از نتیجه کار، تهیه غلظت‌های مختلف از هر عصاره (پنج غلظت ۰/۵، ۰/۴، ۰/۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای باکتری و میکروگرم بر میلی‌لیتر برای قارچ‌ها) با دو حلال دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO)

محیط آب دریا اضافه شد. این غلظت‌ها برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک روی لاروهای آرتمیا در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت^[9]. کشت و پرورش سیستم‌های *آرتمیا سالینا* در محیط حاوی آب دریا تا هنگام تفریح (پوسته‌اندازی) سیستم‌ها و تبدیل شدن به لاروی فعال انجام شد^[9, 24].

لاروهای زنده شمارش و به گروه‌های ۲۰ تایی در چاهک‌های پلیت میکروتیتیر در محیط آب دریا تقسیم شدند. ۲۰ عدد لاروی زنده فعال با استفاده از استریومیکروسکوپ، شمارش و به محیط آب دریا در هر ویال اضافه و برای هر غلظت حداقل سه ویال در نظر گرفته شد. همچنین حداقل سه ویال برای نمونه شاهد منفی و مثبت که فاقد عصاره بود، انتخاب و غلظت‌های مختلف به ویال‌ها اضافه شد^[24]. ۲۴ ساعت پس از افزودن غلظت‌های مختلف از بخش شقایق دریایی به چاهک‌های حاوی لاروی فعال، میزان اثر سایتوتوکسیک با شمارش لاروهای زنده و فعال در هر غلظت در حضور کنترل مثبت (حاوی بربرین‌هیدروکلراید) و منفی (حاوی آب دریا) سنجیده و این سنجش برای هر غلظت سه‌بار تکرار شد. تعیین درصد مرگ‌ومیر در غلظت‌های متفاوت و LC50 (غلظتی از عصاره که باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌های سرطانی می‌شود) با روش‌های آماری محاسبه شد^[24].

تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 19 از طریق آزمون رگرسیون پربویت^[25, 26] صورت گرفت.

یافته‌ها

عصاره‌های استخراجی از شقایق دریایی موکتی، خاصیت ضدباکتریایی اندکی از خود نشان دادند و عصاره‌های حل شده در حلال‌های مختلف به‌منظور غلظت‌سازی، خاصیت ضدباکتریایی متفاوتی داشتند.

نتایج آزمون با استفاده از حلال‌های مربوط به هر بخش: عصاره‌های حل شده در حلال‌های مربوط به هر بخش (متانول، استون، دی‌کلرومتان) به‌جز عصاره متانولی اثر ضدباکتریایی از خود نشان ندادند که آن هم خاصیت ضدباکتریایی متوسطی در برابر هر سه سویه باکتری داشت و این عصاره با در نظر گرفتن قطر هاله عدم رشد حاصل از حلال متانول به‌عنوان کنترل منفی، تاثیر بیشتری بر باکتری *اشریشیا کلی* با هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر در غلظت بالای ۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد و در برابر دو باکتری دیگر تاثیر ناچیزی داشت (جدول ۱).

جدول ۱) اندازه قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره متانولی بر حسب میلی‌متر

غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کلی
۰/۵	۱۷	۱۲	۱۰
۴	۱۷	۱۳	۱۵
۸	۱۸	۱۷	۱۷
۱۲	۱۹/۵	۲۲	۲۰
۱۶	۲۰	۲۳	۲۲
حلال متانول			
-	۱۵	۱۰/۵	۵

نتایج آزمون با استفاده از حلال DMSO: هر سه عصاره حل شده در حلال DMSO فقط در برابر باکتری گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* تاثیر اندکی داشتند و تاثیر هر سه عصاره مشابه بود (جدول ۲ و ۳).

و حلال مربوط به هر فراکشن (متانول، استون و دی‌کلرومتان) انجام شد. برای تهیه غلظت‌های مشخص از عصاره، وزن‌های مختلف از ماده خشک عصاره با حلال‌ها مخلوط و سپس غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌ها با سمپلر به آرامی به دیسک‌ها تزریق شدند، به‌طوری که تمام حجم تزریق شده جذب دیسک شود. همچنین به‌عنوان کنترل، به اندازه عصاره تزریقی بر دیسک بلنک DMSO و حلال‌های متانول، استون و دی‌کلرومتان تزریق شد، چرا که برای حل کردن ماده خشک عصاره از این حلال‌ها استفاده شد. سپس دیسک‌ها در محیط آزمایشگاه خشک شدند تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند^[13, 15].

کشت باکتریایی و آزمون انتشار دیسک: از سه سویه باکتری *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*) با روش خطی پلیت، تهیه و در شرایط کاملاً استریل باکتری تک‌کلونی از پلیت کشت، برداشت و در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث (LB) کشت داده شد. این لوله‌ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۶ ساعت قرار داده شدند تا باکتری رشد کند. کدورت محیط حاوی باکتری با استاندارد نیم‌مک‌فارلند مقایسه شد و سپس عمل تلقیح سوسپانسیون به محیط کشت صورت گرفت. پس از تلقیح و قبل از عمل دیسک‌گذاری، درپوش ظرف پتری به مدت ۱۰ دقیقه نیمه‌باز ماند تا رطوبت اضافی آن تبخیر شود^[16]. سپس با استفاده از یک پنس ظریف که در الکل قرار گرفته و با شعله استریل و سرد شده بود، دیسک‌های بلنک که قبلاً ۲۰ لاند عصاره و حلال‌های کنترل به آنها تزریق شده بود، روی سطح پلیت قرار داده شدند. سپس به آرامی، دیسک به سطح آگار فشار داده شد، به‌طوری که با آگار کاملاً تماس حاصل نماید. علاوه بر آن از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پس از این که دیسک‌های حاوی عصاره روی سطح محیط قرار داده شدند، پلیت‌ها به‌صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C-۳۵°C انکوبه شدند^[17-19].

بررسی اثرات ضدقارچی: در روش دیسک‌گذاری سوسپانسیون قارچی، قارچ‌های *کاندیدا آلبیکانس* (*Candida albicans*)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger*) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و طول موج ۵۸۰ نانومتر با ۹۰٪ عبور آماده شد و غلظت مورد استفاده ۱×۱۰^۶ بود که به ارلن حاوی محیط کشت ساب‌راد دکستروز آگار (DA) افزوده و محیط حاوی قارچ رشته‌ای در پلیت ریخته شد. لازم به ذکر است قارچ مخمری *کاندیدا آلبیکانس* با کدورت نیم‌مک‌فارلند، آماده و به‌صورت سطحی کشت داده شد. دیسک‌های حاوی عصاره و کنترل روی محیط کشت قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C-۳۵°C انکوبه شدند^[20, 21].

بعد از دوره انکوباسیون، قطر هاله عدم رشد با استفاده از کولیس بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و با استانداردهای جنتامایسین به‌عنوان کنترل مثبت تست‌های ضدباکتریایی^[22] و فلوکونازول به‌عنوان کنترل مثبت تست‌های ضدقارچی مقایسه شدند^[12, 23].

آزمایش‌های سایتوتوکسیک به روش آزمون سمیت میگوی آب شور (BST): غلظت‌های مختلف از هر بخش (۵ غلظت) در آب مقطر، حاوی مقدار معینی از محیط آب دریا تهیه شد. غلظت‌های مختلف از هر عصاره (۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به

جدول ۲) اندازه قطر هاله عدم رشد حاصل از عصاره‌ها بر حسب میلی‌متر

عصاره	سودوموناس آئروژینوزا	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کلی
متانول (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
۰/۵	۱۲/۵	۱۲	۱۳/۵
۴	۱۳	۱۲	۱۴/۵
۸	۱۳/۵	۱۲	۱۴/۵
۱۲	۱۳	۱۲/۵	۱۵/۵
۱۶	۱۳	۱۴/۵	۱۵
استون (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
۰/۵	۱۱/۵	۱۲	۱۴/۵
۴	۱۱/۵	۱۲	۱۵
۸	۱۳	۱۳	۱۶/۵
۱۲	۱۱	۱۳/۵	۱۴
۱۶	۱۲	۱۳/۵	۱۶
دی‌کلرومتان (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)			
۰/۵	۱۳/۵	۱۱/۵	۱۴/۵
۴	۱۳	۱۲/۵	۱۳/۵
۸	۱۵	۱۳/۵	۱۵
۱۲	۱۵	۱۴/۵	۱۳/۵
۱۶	۱۴	۱۴/۵	۱۴
حلال DMSO	۱۳	۹	۱۷

جدول ۳) اندازه قطر هاله عدم رشد در استانداردها

باکتری‌ها	جنتامایسین ۵۰ (میکروگرم در دیسک)	سیپروفلوکسازین ۳۰ (میکروگرم در دیسک)
اشریشیا کلی	۳۱/۶	۲۰/۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۳۷/۳	۲۱/۰
سودوموناس آئروژینوزا	۳۱/۳	۲۰/۴

نتایج آزمون ضدقارچ: در آزمون ضدقارچی فقط عصاره استونی شقایق دریایی، خاصیت ضدقارچی متوسطی مقابل سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* با قطر هاله عدم رشد ۱۷ میلی‌متر در غلظت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد که در مقایسه با استاندارد فلوکونازول، خاصیت ضدقارچی کمتری داشتند و هیچ کدام از عصاره‌ها در برابر قارچ *کاندیدا آلبیکانس* اثری از خود نشان ندادند (جداول ۴ و ۵).

جدول ۴) اندازه قطر هاله عدم رشد در سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بر حسب میلی‌متر

عصاره‌ها (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۰/۵	۴	۸	۱۲	۱۶
متانول	-	-	-	-	-
استون	-	-	۶	۱۴	۱۷
دی‌کلرومتان	-	-	-	-	-

جدول ۵) اندازه قطر هاله عدم رشد در استاندارد فلوکونازول

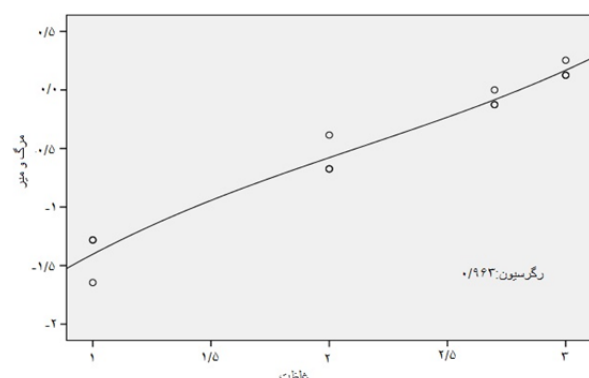
قارچ	۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر
کاندیدا آلبیکانس	۱۳	۱۵	۲۰
آسپرژیلوس نایجر	۱۵	۲۰	۲۵

نتایج آزمون سیتوتوکسیک: عصاره متانولی بافت شقایق دارای خاصیت سیتوتوکسیک بیشتری با LC50 کمتر نسبت به عصاره‌های استون و دی‌کلرومتان بود. عصاره متانولی با LC50

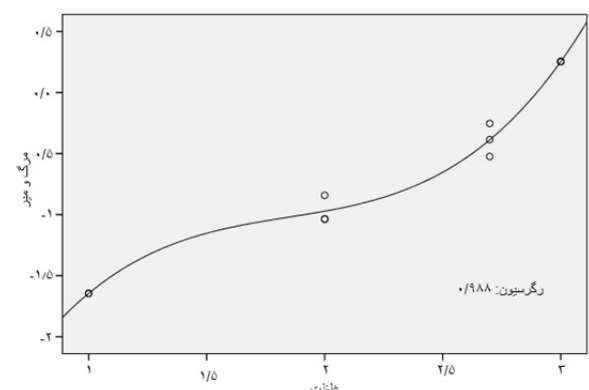
برابر با ۶۰۹/۳۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای بیشترین میزان سمیت و کشندگی بود و پس از آن دی‌کلرومتان با LC50 برابر با ۸۰۱/۳۸۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سمیت بیشتری نسبت به استون داشت و پس از آن استون کمترین سمیت را با LC50 برابر با ۹۵۱/۸۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد (جدول ۶). با افزایش غلظت عصاره‌های متانول، استون و دی‌کلرومتان بافت شقایق، میزان مرگ‌ومیر افزایش یافت (نمودارهای ۱-۳).

جدول ۶) نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های بافت شقایق موکتی

غلظت عصاره	میانگین آماری درصد مرگ‌ومیر	LC50 (میکروگرم در میلی‌لیتر)
متانول (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۱۰	۱۰/۰±۵/۰	
۱۰۰	۳۶/۶±۱۲/۶	۶۰۹/۳۳۰
۵۰۰	۴۶/۶±۲/۹	
۱۰۰۰	۵۶/۶±۲/۹	
دی‌کلرومتان (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۱۰	۳/۳±۹/۲	
۱۰۰	۱۶/۷±۹/۲	۸۰۱/۳۸۳
۵۰۰	۲۸/۳±۹/۲	
۱۰۰۰	۵۶/۶±۹/۲	
استون (میکروگرم در میلی‌لیتر)		
۱۰	۱۵/۰±۳/۵	
۱۰۰	۲۳/۳±۲/۹	۹۵۱/۸۱۳
۵۰۰	۸۳/۳±۲/۹	
۱۰۰۰	۵۵/۰±۵/۰	
کنترل منفی (آب دریا)		۱/۶±۲/۹



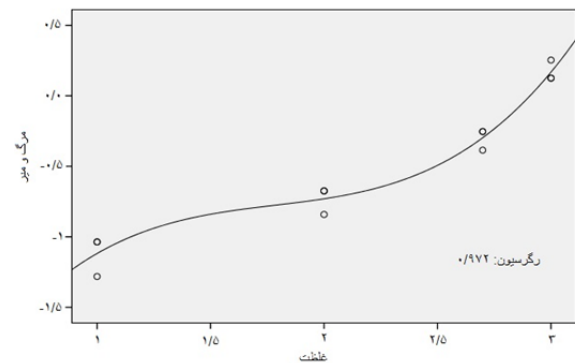
نمودار ۱) رابطه بین غلظت عصاره متانول و LC50



نمودار ۲) رابطه بین غلظت عصاره دی‌کلرومتان و LC50

همخوانی داشت. همان طور که در این مطالعات مشاهده شده، تاثیر عصاره‌ها بر باکتری گرم‌مثبت بیشتر بوده است. در بررسی‌های مختلف نشان داده شده که دیواره سلولی باکتری‌های گرم‌مثبت شامل یک لایه پپتیدوگلیکان است که ساختار ساده‌تری نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی دارند و بنابراین مقابل بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیب‌های شیمیایی ضد میکروبی حساسیت بیشتری دارند و در نتیجه تاثیر عصاره‌ها بر این باکتری می‌تواند بیشتر باشد [29]. همچنین طبق گزارشات ارایه‌شده توسط سورش‌کومار و همکاران [30]، عصاره خام *استیکوداکتیل* هادونی فعالیت خوبی در برابر باکتری‌های گرم‌منفی نشان داده است که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر بود. این مساله که در برخی مطالعات باکتری‌های گرم‌مثبت به‌عنوان گونه‌های حساس‌تر شناخته شده و در برخی دیگر خلاف این موضوع اثبات شده است، می‌تواند ناشی از ویژگی‌های فردی و سویه‌ای باکتری‌ها باشد. همان طور که گفته شد، نوع حلال نیز در خاصیت ضدباکتری عصاره تهیه‌شده نقش بسیار مهمی دارد. تاثیر مربوط به سه فراکشن عصاره شقایق دریایی موکتی حل‌شده در متانول، استون و دی‌کلرومتان به این صورت بود که عصاره متانولی در هر سه سویه باکتری تاثیر ضدباکتریایی متوسطی را از خود نشان داد، ولی عصاره استونی و دی‌کلرومتانی اثری بر هیچ کدام از باکتری‌ها نداشتند که در تناقض با نتایج مطالعات ویلیامز و همکاران [31] بود که در سواحل جنوب شرقی هند روی عصاره‌های مختلف شقایق دریایی موکتی *استیکوداکتیل* هادونی روی چند سویه باکتری انجام داده‌اند و مشخص شده که عصاره متانول بافت شقایق موکتی هیچ اثری بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شریشیا کلی* و *سودوموناس* نداشته است. از آنجایی که شرایط اکولوژیک در محیط‌های آبی مختلف، متفاوت بوده و به‌تبع آن شرایط فیزیولوژیک موجودات متفاوت است، وجود تفاوت در فعالیت بیولوژیک (ضدباکتریایی) این گونه در خلیج فارس با دیگر پهنه‌های آبی دور از انتظار نیست. به نظر می‌رسد احتمالاً تفاوت در شرایط اکولوژیک محیط‌های آبی مختلف که موجب تفاوت در خواص فیزیولوژیک جانداران می‌شود، دلیل خوبی برای توجیه اختلاف در فعالیت بیولوژیک این گونه باشد و برای اثبات آن نیاز به مطالعات بیشتری است.

طبق یافته‌ها از این گونه شقایق دریایی، خاصیت ضدباکتریایی قابل توجهی مقابل سویه‌های مورد استفاده در این آزمون دیده نشد. به نظر می‌رسد سویه‌های مختلف باکتریایی در دریا وجود دارند که می‌توانند به‌عنوان عامل بیماری‌زا در شقایق‌های دریایی مطرح شوند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر عصاره متانولی، استونی و دی‌کلرومتان بافت شقایق *استیکوداکتیل* هادونی در برابر دو سویه قارچی مورد مطالعه در این پژوهش با هم متفاوت بود. طبق یافته‌ها، عصاره استونی اثر ضدقارچی در برابر سویه قارچی *آسپرژیلوس نایجر* نشان داد، ولی هیچ گونه تاثیری بر سویه قارچی *کاندیدا آلبیکانس* نداشت. در مطالعه ویلیامز و همکاران [31] در سواحل جنوب شرقی هند، عصاره‌های متانول، کلروفرم، اتیل استات و هگزان بافت شقایق *استیکوداکتیل* هادونی دارای اثر ضدقارچی روی چند سویه قارچ بوده است که همه این عصاره‌ها بیشترین اثر را بر قارچ *آسپرژیلوس* داشتند. همچنین *سیلسترودریک* و *راویچاندران* [32] فعالیت ضد میکروبی عصاره متانول، اتانول و کلروفرم‌کنیدارین پورپیتا پورپیتا (*Porpita porpita*) را روی چند سویه قارچی از سواحل جنوب شرقی هند بررسی کرده‌اند و طبق یافته‌ها فقط عصاره بوتانولی در سه گونه از قارچ‌ها خاصیت ضدقارچی داشته که بیشترین اثر را بر



نمودار ۳) رابطه بین غلظت عصاره استون و LC50

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات ضدباکتریایی، ضدقارچی و سایتوتوکسیک عصاره‌های گونه شقایق دریایی موکتی در خلیج فارس انجام شد. در عصر حاضر ترکیبات طبیعی نقش بسیار زیادی در علوم پزشکی و دارویی ایفا می‌نمایند که در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشا دریایی در سال‌های اخیر بسیار حایز اهمیت بوده است [5]. محیط زیست دریایی ترکیبات فراوانی را برای کنترل بیماری‌های باکتریایی، قارچی و ویروسی و همچنین شیمی‌درمانی سرطان فراهم می‌کند. بررسی‌های انجام‌شده نشان داده است که عوامل میکروبی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی در عصر حاضر برای انسان است [27].

در این پژوهش تاثیر عصاره‌های ارگانیک یک گونه شقایق دریایی موکتی جمع‌آوری‌شده از جزیره هرمز در خصوص خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی در مقابل پنج گونه میکروارگانیسم که عامل بروز بیماری‌های انسانی هستند، برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که هیچ کدام از عصاره‌های متانولی، استونی و دی‌کلرومتانی اثر ضدباکتریایی قابل توجهی از خود نشان ندادند. نتایج نهایی حاصل از حلال‌های متفاوت به‌کاربرده‌شده در تلقیح دیسک با عصاره‌های شقایق دریایی روی سویه‌های باکتریایی با هم متفاوت بود که ممکن است به‌دلیل تاثیر حلال‌های مورد استفاده (DMSO، استون، دی‌کلرومتان و متانول) برای تهیه غلظت‌های مختلف عصاره باشد. این امر نشان می‌دهد که در زمان حل کردن عصاره‌ها در حلال‌های مختلف برای ساختن غلظت‌های متفاوت، حلال‌های به‌کاربرده‌شده تاثیرات متفاوتی روی خاصیت عصاره‌ها می‌گذارند و نشان‌دهنده تاثیر بسیار مهم حلال‌ها است که هم در زمان عصاره‌گیری و هم در زمان تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره روی خواص عصاره تاثیر می‌گذارند.

تاثیر مربوط به سه فراکشن عصاره شقایق دریایی موکتی حل‌شده در DMSO به این صورت بود که هر سه عصاره متانولی، استونی و دی‌کلرومتانی تاثیر اندکی بر باکتری گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های بالا از خود نشان دادند، ولی هیچ گونه تاثیری بر باکتری *شریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* نداشتند. این یافته‌ها تا حدودی مشابه نتایجی بود که *برگادیسواران* و همکاران [14] و همچنین *تانگاراچ* و همکاران [28] به دست آورده‌اند. آنها خواص ضدباکتریایی عصاره‌های مختلف استخراجی از شقایق دریایی *استیکوداکتیل* را بر چند سویه باکتری مورد بررسی قرار داده‌اند که براساس مشاهدات آنها عصاره متانولی استخراجی از شقایق بیشترین هاله عدم رشد را در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از خود نشان داده و بر باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا* و *شریشیا کلی* تاثیری نداشته است که پژوهش حاضر با آن

قابل ملاحظه‌ای دارد که در عصاره متانولی نسبت به عصاره‌های استون و دی‌کلرومتان بیشتر است.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه سنجش آلودگی اداره محیط زیست بندرعباس که محیط و امکانات آموزشی مناسب را برای مطالعه حاضر فراهم کردند سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: این مطالعه با در نظر گرفتن تمامی شرایط اخلاقی انجام شد.

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: حمیده عباسی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ احسان کامرانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس (۳۰٪)؛ نرگس امراللهی بیوکی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی (۱۵٪)؛ مریم احسان‌پور (نویسنده چهارم)، تحلیلگر آماری (۱۵٪)

منابع مالی: این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه هرمزگان صورت گرفته است.

منابع

- 1- De Vries DJ, Hall MR. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. *Drug Dev Res.* 1994;33(2):161-73.
- 2- Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Suppl 4):3-11.
- 3- Vlietinck AJ, Apers S. Biological screening methods in the search for pharmacologically active natural products. In: Tringali C. *Bioactive compounds from natural sources: Isolation, characterization and biological properties.* Boca Raton: CRC Press; 2003. pp. 1-30.
- 4- Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A. The Sea, the future pharmacy. *Iran South Med J.* 2014;17(4):748-88. [Persian]
- 5- Nabipour I, Najafi A, Bolkheir AR. Anticancer and cytotoxic compounds from seashells of the Persian Gulf. *Iran South Med J.* 2009;12(3):231-7. [Persian]
- 6- Thangaraj S, Bragadeeswaran S. Assessment of biomedical and pharmacological activities of sea anemones *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Gulf of Mannar Biosphere Reserve, southeast coast of India. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2012;18(1):53-61.
- 7- Osmakov DI, Kozlov SA, Andreev YA, Koshelev SG, Sanamyan NP, Sanamyan KE, et al. Sea anemone peptide with uncommon β -hairpin structure inhibits acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) and reveals analgesic activity. *J Biol Chem.* 2013;288(32):23116-27.
- 8- Häussermann V. Identification and taxonomy of soft-bodied hexacorals exemplified by Chilean sea anemones, including guidelines for sampling, preservation and examination. *J Mar Biol Assoc U K.* 2004;84(5):931-6.
- 9- Mohammadizadeh F, Ehsanpor M, Afkhami M, Mokhlesi A, Khazaali A, Montazeri S. Antibacterial, antifungal and cytotoxic effects of a sea cucumber *Holothuria leucospilota*, from the north coast of the Persian Gulf. *J Mar Biol Assoc U K.* 2013;93(5):1401-5.
- 10- Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen ØM, Stensvåg K. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *J Invertebr Pathol.* 2002;81(2):94-

قارچ *آسپرژیلوس نایجر* از خود نشان داده است. طبق نتایج مطالعات انجام‌شده و مقایسه با نتایج مطالعه حاضر می‌توان گفت که هر سه عصاره‌های قطبی اتیل‌استات، استون و بوتانول فعالیت ضدقارچی بهتری در برابر قارچ *آسپرژیلوس* دارند.

شقایق‌های دریایی گرمسیری *استیکوداکتیل* *هادونی* دارای منبع فراوانی از مواد فعال بیولوژیک هستند که ممکن است به‌عنوان ابزاری برای مطالعه سازمان مولکولی زیستی، سیتوتوکسیک، نوروتوکسیک، فعالیت‌های سیتولیتیک و غیره مورد استفاده قرار بگیرند^[33]. در این مطالعه اثر سمیت سلولی (سیتوتوکسیک) به‌وسیله عصاره‌های متانولی، استونی و دی‌کلرومتانی بررسی شد و طبق نتایج، عصاره متانولی بیشترین سمیت را نشان داد. چنان که *ویروراج* و همکاران^[33] اثر سایتوتوکسیکی شقایق‌های گونه *استیکوداکتیل* *هادونی* و *استیکوداکتیل* *مرتئسی* (*Stichodactyla mertensii*) را به روش BST بررسی کرده و نشان داده‌اند که این گونه‌ها دارای سمیتی چشمگیر با LC50 کمتر از یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هستند. مطالعات دیگری نیز روی گونه‌های مرجانی توسط محققان انجام شده است که آنها نیز نشان داده‌اند عصاره متانولی بیشترین خاصیت سایتوتوکسیک را دارد^[34]. براساس مطالب ذکرشده می‌توان گفت که عصاره متانولی استخراجی از موجودات دریایی سمیت بیشتری بر لاروی *آرتمیا سالینا* نسبت به دیگر عصاره‌ها نشان داده است و به نظر می‌رسد خاصیت سایتوتوکسیک، ناشی از وجود برخی ترکیبات قطبی در عصاره متانولی باشد.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به استفاده از تنها یک روش برای ارزیابی اثرات ضد میکروبی اشاره کرد. روش انتشار دیسک یکی از معمول‌ترین و شناخته‌شده‌ترین روش‌هاست و مزایای زیادی دارد که در این مطالعه نیز از این روش استفاده شده، با این حال این روش، مهار رشد باکتری را به ما نشان می‌دهد و این به معنی مرگ باکتری نیست. لذا این روش نمی‌تواند تأثیرات کشتن باکتری و متوقف‌کننده رشد باکتری یک دارو را از هم تشخیص دهد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی روش‌های ارزیابی دیگری نیز در کنار این روش بررسی شود. از دیگر محدودیت‌های این مطالعه، کارکردن با باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای انسانی بود که این امر با در نظر گرفتن شرایط ایمنی و عمل درست مرتفع شد.

کنیدارین‌ها از جمله شقایق‌ها دارای ترکیباتی با خواص قطبی هستند که باعث مهار رشد قارچ *آسپرژیلوس نایجر* می‌شود. از این رو نیاز به آنالیز شیمیایی و شناسایی ترکیب یا ترکیبات موثر در خصوصیات ضدقارچی در گونه *استیکوداکتیل* *هادونی* و کمک به راهکارهای درمانی جدید برای بیماری‌های قارچی *آسپرژیلوس* پیشنهاد می‌شود. در کل خواص ضدقارچی شقایق موکتی جزیره هرمز بیشتر از خاصیت ضدباکتریایی آن است و بیشتر بودن خواص ضدقارچی در عصاره این گونه نسبت به خواص ضدباکتریایی نشان‌دهنده آن است که این موجودات توانایی مقابله در برابر پاتوژن‌های قارچی را دارند و این موضوع شاید به‌دلیل حضور قارچ‌ها در زیستگاه طبیعی آنها و تولید ترکیبات ضدقارچی توسط شقایق‌های دریایی باشد.

نتیجه‌گیری

عصاره‌های متانولی، استونی و دی‌کلرومتانی استخراجی از شقایق دریایی موکتی، خاصیت ضدقارچی زیادی نسبت به خاصیت آنتی‌باکتریال آنها دارند. همچنین این شقایق اثرات سیتوتوکسیک

- 22- Tomczyk M, Leszczyńska K, Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia*. 2008;79(7-8):592-4.
- 23- Anisimov MM, Shcheglov VV, Stonik VA, Kul'ga AL, Levina EV. Comparative study of the antifungal activity of triterpene glycosides of Pacific Ocean holothuria. *Dokl Akad Nauk SSSR*. 1972;207(3):711-3. [Russian]
- 24- Saeidnia S, Gohari AR, Kiuchi F, Honda G. In vitro anti-epimastigote activity of some Iranian medicinal plants. *Iran J Pharm Res*. 2005;4(2):101-3.
- 25- Gohari A, Saeidnia S, Gohari M, Moradi Afrapoli F, Malmir M, Yazdan Panah M, et al. Brine shrimp cytotoxicity of some medicinal plants belongs to lamiaceae, asteraceae, rosaceae and boraginaceae families. *J Med Plants*. 2009;4(29):87-93. [Persian]
- 26- Ghavamizadeh M, Mohammadi J, Mirzaei A, Sadeghi H, Akbartabar M. Cytotoxicity of *Dorema aucheri*, *Achillea millefolium* and *Artemisia aucheri* by artemia. *Armaghane Danesh*. 2013;18(5):389-99. [Persian]
- 27- Sunday O, Otimenyin, Uguru MO, Ogbonna A. Antimicrobial and hypoglycemic effects of *Momordica balsamina*. *Linn. J Nat Prod*. 2008;1:3-9.
- 28- Thangaraj S, Bragadeeswaran S, Suganthi K, Kumaran NS. Antimicrobial properties of sea anemone *Stichodactyla mertensii* and *Stichodactyla gigantea* from Mandapam coast of India. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(1):S43-6.
- 29- McDonnell G, Denver Russell A. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(1):147-79.
- 30- Borbon H, Valdes S, Alvarado-Mesen J, Soto R, Vega I. Antimicrobial properties of sea anemone *Anthopleura nigrescens* from pacific coast of Costa Rica. *Asian Pac J Biomed*. 2016;6(5):418-21.
- 31- Williams GP, Babu S, Ravikumar S, Kathiresan K, Prathap SA, Chinnapparaj S, et al. Antimicrobial activity of tissue and associated bacteria from benthic sea anemone *Stichodactyla haddoni* against microbial pathogens. *J Environ Biol*. 2007;28(4):789-93.
- 32- Sylvester Fredrick W, Ravichandran S. Anti microbial activity of the cnidarian blue button *Porpita porpita*. *Middle East J Sci Res*. 2010;5(5):355-8.
- 33- Veeruraj A, Arumugam M, Ajithkumar T, Balasubramanian T. Isolation and biological properties of neurotoxin from sea anemone (*Stichodactyla mertensii*, *S. haddoni*). *Internet J Toxicol*. 2007;5(2).
- 34- Mohammadizadeh F, Afkhami M, Ehsanpour M, Bahri AH, Masihi Taziani H. Screening for antibacterial, antifungal and cytotoxic agents in three hard coral species from Persian Gulf. *Bangladesh J Pharmacol*. 2014;9(2):171-5.
- 102.
- 11- Ramkumar S, Arun Sudhagar S, Venkateshvaran K. Bioactivity of venom extracted from the sea anemone *Anthopleura asiatica* (Cnidaria: Anthozoa): Toxicity and histopathological studies. *Int J Fish Aquac*. 2012;4(4):71-6.
- 12- Murray AP, Muniaín C, Seldes AM, Maier MS. Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron*. 2001;57(47):9563-8.
- 13- Ismail H, Lemriss S, Ben Aoun Z, Mhadhebi L, Dellai A, Kacem Y, et al. Antifungal activity of aqueous and methanolic extracts from the Mediterranean sea cucumber, *Holothuria polii*. *Journal de Mycologie Médicale*. 2008;18(1):23-6. [French]
- 14- Bragadeeswaran S, Thangaraj S, Prabhu K, Rani SRS. Antifouling activity by sea anemone (*Heteractis magnifica* and *H. aurora*) extracts against marine biofilm bacteria. *Lat Am J Aquat Res*. 2011;39(2):385-9.
- 15- Momen-Roknabadi N, Gohari AR, Monsef-Esfehani HR, Attar F, Hajiaghvaei R, Saeidnia S, et al. Antifungal and antibacterial activities of *Pentanema divaricatum* and its active constituent. *Z Naturforsch C*. 2008;63(9-10):649-52.
- 16- Yousefzadi M, Riahi Madvar A, Hadian J, Rezaee F, Rafiee R, Biniáz M. Toxicity of essential oil of *Satureja khuzistanica*: In vitro cytotoxicity and anti-microbial activity. *J Immunotoxicol*. 2014;11(1):50-5.
- 17- Batrakov SG, Girshovich ES, Drozhzhina NS. Triterpene glycosides with antifungal activity isolated from the sea cucumber, *Cucumaria japonica*. *Antibiotiki*. 1980;25(6):408-11. [Russian]
- 18- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-first informational supplement. 1st Edition. Sharify M, editor. Irajyian GR, Borumand MA, Rashed Marandi F, Rahbar M, Shahcheraghi F, Sharify M, et al, translator. Tehran: Sound Publishing Center; 2012. p. 164. [Persian]
- 19- Jamali S, Emtiazjoo M, Toolabee Teymoory L, Zeinali S, Keypour S, Sardari S, et al. Antibacterial effect of the Persian Gulf sea cucumber *Holothuria*. SP extracts on three strain of *Escherichia coli*. *Modares J Med Sci (Pathobiology)*. 2009;12(2):37-49. [Persian]
- 20- Salehi M, Hasanloo T, Mehrabian S, Farahmand S. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi in vitro compare to clotrimazol. *Pharm Sci*. 2011;16(4):203-10. [Persian]
- 21- Koneman EW, Roberts GD. Pictorial laboratory mycology. *J Basic Microbiol Environ Health Tech*. 1986;26(5):288-288.