Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

مطالعه تاثیر ضد باکتریایی جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس *Aplysia dactylomela* بر برخی از پاتوژن‌های آبزیان

مهدی آتشی[۱]، فرزاد صالحی*[۱]، رضا داودی[۱] ، محمود نفیسی بهابادی[۱]، عقیل دشتیان نسب[۲]

*f.salehi@pgu.ac.ir

۱- گروه شیلات دانشکده علوم و فنون دریایی ، دانشگاه خلیج فارس بوشهر
۲- پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹

چکیده

گونه‌های مختلف از جنس Aplysia سالهاست در زمینه های پزشکی و داروسازی مورد توجه محققین می‌باشند. خرگوش دریایی خلیج فارس *Aplysia dactylomela* گونه‌ای بومی درخلیج فارس است و می‌تواند در زمینه های متعدد مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه که در سال ۱۳۹۸ در پژوهشکده دانشگاه خلیج فارس انجام شد، توانایی ضد باکتریایی جوهر این گونه علیه سه نوع باکتری بیماری زا در آبزیان (*Yersinia rukeri, Streptococcus iniae, Vibrio Harvey*) مورد ارزیابی قرار گرفت. جوهر بنفش استخراج شده از ده عدد از این گونه استخراج شده و به صورت خام بر علیه باکتری های مذکور مورد تست ضد باکتریایی قرار گرفت. ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) به روش رقت‌های متوالی صورت گرفت و از دیسک آنتی بیوتیک جنتامایسین و تتراسایکلین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. میانگین قطر هاله عدم رشد برای باکتری *V.havey* به اندازه ۱۹/۲۴ میلی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۴۰۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه گیری شد. هاله عدم رشد برای باکتری *S.iniae* به اندازه ۲۱/۷۲ میلی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معین شد. به همین ترتیب هاله عدم رشد برای باکتری *Y.rukeri* به اندازه ۲۲/۳۶ میلی‌متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کشندگی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر معین شد. جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس در این مطالعه نسبت به هر سه نوع باکتری از خود اثر ضد باکتریایی نشان داد.

کلمات کلیدی: خرگوش دریایی خلیج فارس، جوهر بنفش، ضد باکتریایی

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

مقدمه

افزایش سریع جمعیت جهان که پیامد آن گسترش کشاورزی و دامپروری برای تامین غذاست، فشار زیادی را بر محیط وارد می‌کند که از جمله می‌توان به شیوع و افزایش بیماری‌های مختلف در بین حیوانات پرورشی اشاره نمود. صنعت آبزی‌پروری نیز از این مشکل مثتثنی نمی‌باشد. در این بین بیماری‌های آبزیان نیز تهدیدها و خطرات بالقوه‌ای را به صنعت آبزی‌پروری تحمیل می‌کند به طوری که همه ساله خسارت‌های قابل توجهی به اقتصاد آبزی‌پروری وارد شده و گاهی سبب ورشکستگی سرمایه گزاران این صنعت می‌گردد (Masoud, 2008; Mostafa, 2001). مصرف آنتی بیوتیک‌ها به منظور پیشگیری و درمان یکی از راهکارهای موثر برای مقابله با این مشکل است. پیامد این عمل ایجاد سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و مشکل شدن درمان در آینده است (Bansemir *et al.*, 2006).

به همین منظور استفاده از ترکیبات زیستی جدا شده از گیاهان، قارچها، باکتری‌ها و موجودات دریایی کاربرد زیادی در تولیدات دارویی پیدا نموده است و داروهای تهیه شده از ترکیبات طبیعی در کنار داروهای صنعتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات بر منابع زیستی سبب به وجود آمدن ایده‌های جدید در تولید داروهای مختلف شده است که این امر می‌تواند به کشف ترکیبات ضد باکتریایی جدید به منظور کاهش خطرات ناشی از مقاومت آنتی بیوتیک منجر شود (Petersen and Amstutz, 2008).

موجودات دریایی با تحرک کم یا بدون تحرک به دلیل شرایط خاص حاکم بر آنها مثل فشارها و استرس‌های مختلف محیطی رقابت‌های گونه‌ای بر سر غذا و مکان، چرا و شکارگری به طور طبیعی دارای ترکیبات زیستی ثانویه برای مقابله با این مشکلات هستند (Steinberg *et al.*, 1997). این ترکیبات به عنوان مواد ضد باکتریایی، ضد ویروسی و ضد قارچی تاثیرات اثبات شده‌ای را از خود نشان دادند. همچنین نوع ترکیبات نیز و نحوه عملکرد آنها شناسایی گردید یا در حال شناسایی می‌باشد. این امید وجود دارد تا در آینده نزدیک این نوع ترکیبات در صنایع مختلف از جمله صنایع دارویی ایفاء نقش کنند (Pérez *et al.*, 2016).

نرم تنان دریایی ساختار بدنی خاصی دارند، این موجودات فاقد اندام فیزیکی برای دفاع مانند خار و پوسته و دارای بافت بدنی نرم و حرکت آهسته بوده و به همین دلیل دارای مکانیسم دفاع شیمیایی هستند. پپتیدهای ضد میکروبی بخش عمده‌ای از سیستم دفاع ایمنی در بی‌مهرگان دریایی را تشکیل می‌دهد. از ویژگی‌های این پپتیدها وزن مولکولی پایین، سنتز آسان، تاثیرگذاری بالا و سمیت پایین برای یوکاریوتهاست (Nabipour, 2011). خرگوش دریایی خلیج فارس (*Aplysia dactylomela*) از راسته *Anaspidea* و خانواده *Aplysioidea* می‌باشد رنگ این موجود زرد متمایل به قهوه ای با حلقه های سیاه رنگ بر روی بدن است و در دریاهای گرمسیری دنیا پراکنش دارد. در ساحل‌های صخره‌ای تا عمق ۷۵ سانتی‌متر یافت می‌شوند و از جلبک‌ها تغذیه می‌کنند و مهمترین رژیم غذایی آنها جلبک جنس *Laurencia .sp* می‌باشد (Mannino *et al.*, 2014). تاکنون ترکیبات زیستی بسیار مفیدی از گونه‌های مختلف جنس Aplysia استخراج شده (جدول ۱) و در تحقیقات مختلف از جمله بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد سرطان نتایج موثری از این موجود به دست آمده است (Nabipour, 2011).

ترکیبات زیستی که خرگوش دریایی در زمان حمله شکارچیان و حتی هم نوعان از خود ترشح می‌کند دارای خواص متنوع دفاعی و شیمیایی است. این ترکیبات به طور عمده شامل مایع بنفش رنگ از غده جوهر ساز[1] و موکوس شیری رنگ از غده اپالین[2] می‌باشد (Kicklighter *et al.*, 2005) . در واقع، ترکیب عمده و تاثیرگذار در این جوهر بنفش رنگ یک آمینو اسید اکسیداز همراه با مخلوطی از اسید آمینه‌هایی مانند لیزین[3] و آرژنین[4] که در غده اپالین ذخیره شده‌اند، می‌باشد که همزمان ترشح می‌شوند. (Derby *et al.*, 2018; Tavares *et al.*, 2011). این ترکیب در مکانیسم دفاعی بسیاری از حیوانات مانند زهر مارها و موکوس برخی از ماهیان وجود دارد (Izidoro *et al.*, 2014; Kitani *et al.*, 2007).

[1] Ink gland
[2] Opalin gland
[3] Lysin
[4] Arginin

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

جدول ۱ تعداد محدودی از ترکیبات زیستی مفید با خواص مختلف از جمله ضد باکتریایی به دست آمده از گونه های مختلف جنس Aplysis

نام ترکیبات	اندام	نام گونه	اثر	مرجع
aplysianin A	albumen gland	*Aplysia kurodai*	ضد باکتری	(Kamiya *et al.*, 2006)
dactylomelin-P	ink	*Aplysia dactylomela*	ضد باکتری	(Tavares *et al.*, 2011)
Dolabellanin	ink, albumen gland, egg mass	*Dolabella auricularia*	ضد باکتری	(Iijima *et al.*, 2003)
Escapin	ink	*Aplysia californica*	ضد باکتری	(Kicklighter *et al.*, 2005)
Polybrominated diphenyl ether	digestive glands	*Aplysia dactylomela*	ضد باکتری	(Rogers *et al.*, 2000)

ترکیباتی مانند Aplysianin، Dactylomelin، Dolabellanin و Achacin. ترکیبات پروتئینی دارای خاصیت ضد باکتریایی و مکانیسمی مشابه با هم هستند که به وسیله ترشح از غدد مختلف و همچنین رسوب در کپسول تخم, این موجودات و لارو آنها را از انواع باکتری‌های محیطی محافظت می‌کنند (جدول ۱) (Kamiya *et al.*, 2006)

بررسی غده پانکراس خرگوش دریایی نشان داده است که ترکیبات ثانویه زیستی متنوعی از جلبک‌ها که ناشی از رژیم غذایی این موجود از جلبکهای مختلف به ویژه جلبکهای قرمز است، در این بخش از اندام ذخیره شده است (Rogers *et al.*, 2000). ترکیباتی مانند دی فنیل اتر پلی برمانات که از جلبک سبز *Cladophore fascicularis* نیز استخراج شده و خواص زیستی فراوانی از جمله آنتی باکتریال از آن به دست آمده، در غده پانکراس گونه *A. dactylomela* یافت شده است (Yamada and Kigoshi, 1997). انواع هالوجنات کامیگران از خانواده ترکیبات آلی سسکویی ترپن[1] بوده که جزء ترکیبات زیستی جلبکهای قرمز به ویژه جنس Laurencis هستند و دارای خواص متنوع زیستی به ویژه ضد باکتریایی می‌باشد که در غده پانکراس *A. dactylomela* یافت شده است (Pereira *et al.*, 2016).

با توجه به مشکلاتی همچون بیماری‌های آبزیان، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، تجمع آنتی بیوتیک‌ها در بافت، افزایش نگرانی‌های زیست محیطی و کاهش کارایی داروهای ضد باکتریایی، بسیاری از محققین به دنبال جایگزین مناسبی برای آنها هستند. در این بین ترکیبات موجودات دریایی بیش از کذشته مورد توجه قرار گرفته است. با این هدف مرکب خرگوش دریایی و خواص ضد باکتری آن مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ذخیره جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس

برای انجام این تحقیق جوهر بنفش استخراج شده از ۱۰ عدد از خرگوش دریایی که از سواحل دریای خلیج فارس شهر بوشهر صید شده بود، استفاده گردید. برای این منظور خرگوش دریایی را پس از صید به مخازن۳۰۰ لیتری منتقل و با استفاده از جلبک‌های دریایی مورد تغذیه قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت با وارد کردن تنش (ناشی از صید با ساچوک و قرارگیری در ظروف پلاستیکی بدون آب) (Melo *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 1990) اقدام به گرفتن مرکب از آنها گردید و سپس در ظروف در بسته ریخته در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد.

تهیه باکتری

سه گونه باکتری بیماری‌زا در موجودات آبزی (*Streptococcus iniae* PTTC1887), (*Yersinia ruckeri* PTTC 1888), (*Vibrio harveyi* PTTC 1755) از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیو فیلیزه خریداری گردید.

آزمایش ضد باکتریایی

برای انجام آزمایش ضد باکتریایی ابتدا باکتری های تهیه شده را مطابق دستورالعمل (مرکز منطقه ای کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران) در محیط TSB[2] مرک آلمان فعال

[1] Sesquiterpenes

[2] Tryptic soy Broth

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

و پس از دو بار کشت متوالی مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام تست ضد باکتری از روش انتشار دیسک[1] استفاده گردید (Bauer, 1966). برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد[2]و حداقل غلظت باکتری‌کشی[3] از روش رقت‌های متوالی استفاده شد (Balouiri *et al.*, 2016).

ابتدا جوهر بنفش استخراج شده یخ زدایی شده به وسیله اشعه UV به مدت ۳۰ دقیقه ضد عفونی شد (Aneja *et al.*, 2012). سپس در محیط کشت مولر هینتون آگار محصول کمپانی مرک آلمان (در پلیت‌های ۱۰ سانتی‌متری) به وسیله سواپ از غلظت نیم مک فارلند تهیه شده از باکتریهای نام برده شده کشت چمنی صورت گرفت. دیسکهای بلانک محصول شرکت پادتن طب روی سطح پلیت‌ها با فاصله استاندارد قرار داده شد (۵ دیسک در هر پلیت) و ۲۰ میکرو لیتر از جوهر بنفش رقیق شده روی هر دیسک بلانک ریخته شد. پنج تکرار برای هر باکتری در نظر گرفته شد و در گرمخانه در محیط ۳۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس هاله بازدارنگی به وسیله کولیس و بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد (Bauer, 1966). از آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و جنتامایسین به عنوان شاهد مثبت (Bansemir *et al.*, 2006) و از دیسک بلانک به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی(MBC) از محیط کشت TSB به تعداد و مقدار مورد نیاز در لوله‌های آزمایش دربسته (پنبه و ورق آلومینیوم) ریخته و اتوکلاو صورت گرفت. برای تهیه غلظت ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، یک میلی‌لیتر محیط کشت اتوکلاو شده با ۴۰۰ میلی‌گرم جوهر بنفش مخلوط شد و به وسیله فیلتر سر سرنگی ۲۲/ استریل شد و از همین محلول به عنوان غلظت اول استفاده شد سپس با افزودن نیم میلی لیتر از لوله اول به لوله دوم (حاوی ۵/ میلی‌لیتر محیط کشت اتوکلاو شده) و به همین ترتیب ۷ غلظت مختلف از ۴۰۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر تا ۶/۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در لوله آخر تهیه و نیم میلی‌لیتر از لوله هفتم دور ریخته شد. در مرحله بعد به وسیله سمپلر ۱۰ میکرولیتر از هر کدام از محلولها جدا و به جای آن۱۰ میکرولیتر از محلول نیم مک فارلند باکتری به محیط اضافه شد (Peymani *et al.*, 2014) . یک تیمار نیز بدون افزودن باکتری (به منظور مقایسه کدورت) به همین ترتیب تهیه شد. تمامی غلظت‌ها از سه گونه باکتری با پنج تکرار در شیکر انکوباتور در دمای ۳۰ درجه (مطابق با دستورالعمل شرکت تولید کننده باکتری) انکوبه شدند. کلیه محیط های کشت آماده شده برای باکتری ویبریو حاوی پانزده درصد نمک دریا بود.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS 18 به روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA one way) انجام شد. میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن Duncan Multiple) (Rang Testsبا یکدیگر مقایسه شدندکه وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P=0.05) تعیین گردید. برای رسم جدول نیز از نرم افزار word (Micrsoft office) استفاده شد.

نتایج

هاله عدم رشد جوهر خرگوش دریایی برای باکتری *Y.ruckeri* به میزان ۲۲/۳۶ میلی‌متر معین شد که این مقدار از هاله عدم رشد، به طور معنی داری از دو نوع آنتی‌بیوتیک تترا سایکلین با هاله عدم رشد ۳۰/۷۴ میلی‌متر و جنتا مایسین با هاله عدم رشد ۲۴/۱۶ میلی‌متر که بر همین باکتری آزمایش شدند، کمتر بود. حداقل غلظت بازدارندگی جوهر خرگوش دریایی برای این باکتری ۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

هاله عدم رشد جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس علیه باکتری *S. iniae* به اندازه ۲۱/۷۲ میلی‌متر معیین شد که این مقدار تفاوت معنی‌داری با هاله عدم رشد آنتی بیوتیک جنتامایسین با هاله عدم رشد ۲۱/۷ میلی‌متر نداشت، ولی از هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین با هاله عدم رشد۲۹/۲ میلی‌متر به طور معنی‌داری کمتر بود. حداقل غلظت باز دارندگی برای این باکتری ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر تعیین شد.

[1]Agar disk diffusion
[2] minimum inhibitory concentration (MIC)
[3] Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

باکتری *V. harvey* نسبت به جوهر خرگوش دریایی هاله عدم رشدی به اندازه ۱۹/۲۴ میلی‌متر از خود نشان داد که این مقدار فاقد اختلاف معنی‌دار با آنتی بیوتیک جنتامایسین با هاله عدم رشد ۱۸/۷۲ میلی‌متر بود. ولی در مقایسه با هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به اندازه ۲۵/۵۴ میلی‌متر کاهش معنی‌داری از خود نشان می‌داد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این باکتری به اندازه ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اندازه گیری شد (جدول های ۲ و ۳).

جدول ۲: اندازه بازدارندگی غلظت‌های مختلف جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس (میلی‌متر)

باکتری	جوهر بنفش	آنتی بیوتیک تتراسایکلین	آنتی بیوتیک جنتامایسین	دیسک بلانک
Yersinia ruckeri	۲۲/۳۶[۱]	۳۰/۷۴[۲]	۲۴/۱۶[۳]	_
Streptococcus iniae	۲۱/۷۲[۱]	۲۹/۲[۲]	۲۱/۷[۱]	_
Vibrio harvey	۱۹/۲۴[۱]	۲۵/۵۴[۲]	۱۸/۷۲[۱]	_

وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها به وسیله بالا نویس تعیین شد.

جدول ۳: حداقل غلظت بازدارندگی از رشدMIC و حداقل غظت کشندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

باکتری	حد اقل غلظت بازدارندگی MIC	MBCحداقل غلظت بازدارندگی
Yersinia ruckeri	۵۰	۱۰۰
Streptococcus iniae	۵۰	۲۰۰
Vibrio harvey	۲۰۰	۴۰۰

بحث و نتیجه گیری

اثر ضد باکتریایی جوهر خام و پروتئین dactylomelin-P که از گونه *Aplysia dactylomela*/ستخراج و جدا سازی شد، بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Staphylococcus aureus* ،*Pseudomonas aeruginusa* و *Proteus vulgaris* مورد آزمون قرار گرفت و داری اثر مهارکنندگی قوی و مناسبی بود (Melo *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2000).

کمتر بودن اثر جوهر خرگوش دریایی نسبت به آنتی بیوتیک می‌تواند به دلیل آن باشد که آنتی بیوتیک‌ها به عنوان یک ماده خالص با خاصیت ضد باکتریایی قوی به شمار می‌روند در حالی که جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس شامل مجموعه‌ای از ترکیبات است (Derby *et al.*, 2018) که تمام آنها دارای خاصیت ضد باکتری نمی‌باشند.

Yamazaki و همکاران (۱۹۹۰) اثر ضد باکتریایی گلیکو پروتئین جدا شده از جوهر خرگوش دریایی *Aplysia kurodia* به نام aplysianin P را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده اثر بازدارندگی aplysianin بر باکتری های گرم منفی (*E. coli*) و گرم مثبت *Stafphylococcus aureus*) از غلظت‌های ۲/ الی ۵/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. این آزمایش در پلیت ۹۶ تایی و ایجاد رقت‌های متوالی با اندازه‌گیری جذب نوری در اسپکفتومتر و شمارش سلولهای باکتریایی در میزان جذب نوری مختلف که در طول آزمایش به دست آمده بود، صورت گرفت. نتایج بیوشیمیایی در مورد اثر بازدارنگی نشانگر آن بود که در باکتری *E. coli* از تولید DNA و RNA جلوگیری شد (فقط بازدارنگی از تکثیر) ولی نتوانست از تولید ATP جلوگیری کند (فاقد اثر کشندگی) (Yamazaki *et al.*, 1990).

مکانیسم خاص ضد باکتریایی در خرگوش دریایی هنگامی آغاز می‌شود که اسید آمینه لیزین و آرجنین به وسیله آمینو اسید اکسیداز د آمینه می‌شود و محصولاتی مانند آمونیوم، پراکسید

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

هیدروژن و کتو امینو کاپروئیک اسید تولید می‌شود. این ترکیبات به ویژه کتو آمینو کاپروییک اسید همراه با پراکسید هیدروژن می‌تواند باعث تولید رادیکالهای آزاد می‌شود و سبب شوک اکسیداتیو و در نتیجه آن ایجاد جهش و آسیب به رشته های DNA شود که این مکانیسم یکی از عوامل مهم ضد باکتری و همچنین بازدارنده تکثیر و رشد در انواع باکتری ها خواهد شد. ولی در این فرایند تنها از تکثیر باکتری جلوگیری می‌شود و فعالیت ضد باکتریایی به صورت عقیم سازی و عدم تکثیر عمل می‌کند، این در حالی است که باکتری بدون اینکه قابلیت تکثیر داشته باشد فعالیت متابولیک را از خود نشان می‌دهد (Ko *et al.*, 2012). در تحقیق Tavares و همکاران (۲۰۱۱) در مورد ترکیب و عملکرد و سایر خصوصیات زیستی پروتئین Dactylomelin-p جدا شده از جوهر خرگوش دریایی *Aplysia dactylomela*، اثر ضد باکتریایی این پروتئین در pH=۲-۱۲ بر باکتری *Staphilococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفت که در pH=۷- ۸/۵ بیشترین ناحیه بازدارندگی رشد در حدود ۲۰ میلی‌متر تعیین شد (Tavares *et al.*, 2011). میزان pH نیز یکی از عوامل تاثیر گذار در میزان تاثیر ضد باکتریایی پروتئینهای مختلف موجود در جوهر انواع گونه‌های Aplysia می‌باشد. جوهر خرگوش دریایی هنگام ترشح دارای pH اسیدی حدود ۵ هستند در حالی که آب دریا دارای pH حدود ۸ و این تفاوت در pH می‌تواند موجب شروع برخی از واکنش‌های بیوشیمیایی که که دلیل اصلی واکنشهای ضد باکتریایی هستند، شود (Ko *et al.*, 2008). نتایج ضد باکتریایی در تحقیقات بالا از استخراج پروتئین یا عصاره گیری و خالص سازی از جوهر انواع گونه های Aplysia به دست آمده است. ترکیباتی مانند aplysianin و یا Dactylomelin دارای اثر اثبات شده و پرقدرت ضد باکتریایی می باشند (Kamiya *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2011)و نتایج تحقیق حاضر را نیز تایید می‌کنند.

اثر بازدارندگی و کشندگی باکتری‌ها در مورد جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس با آزمایش‌های انجام شده در تحقیق حاضر تایید می‌شود. ولی یکی از دلایل اثر بالای ضد باکتریایی آنتی بیوتیک‌ها نسبت به جوهر خرگوش دریایی و همچنین غلظت‌های بالا از جوهر خرگوش دریایی در به دست آوردن نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی از این ترکیب در تحقیق حاضر، می‌تواند به این دلیل باشد که بیشترین اثر ضد باکتریایی جوهر خرگوش دریایی در گونه‌های مختلف در در زمان کوتاهی بعد از ترشح به وجود می‌آید (Derby *et al.*, 2018).

تشکر و قدردانی

با توجه به اینکه این تحقیق در پژوهشکده خلیج فارس وابسته به دانشگاه خلیج فارس بوشهر صورت گرفت، جا دارد از همکاری و راهنمایی های پرسنل و هیات علمی زحمتکش آن تشکر و قدردانی نمایم.

منابع

Aneja, K.R., Sharma, C. and Joshi, R., 2012. Antimicrobial activity of Terminalia arjuna Wight & Arn.: An ethnomedicinal plant against pathogens causing ear infection. *Brazilian Journal of otorhinolaryngology*, 78(1): 68-74.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2): 71-79.

Bansemir, A., Blume, M., Schröder, S. and Lindequist, U., 2006. Screening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria. *Aquaculture*. 252(1): 79-84.

Bauer, A., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 149-158.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

Derby, C.D., Gilbert, E.S. and Tai, P.C., 2018. Molecules and Mechanisms Underlying the Antimicrobial Activity of Escapin, an L-Amino Acid Oxidase from the Ink of Sea Hares. *The Biological Bulletin*, 235(1): 52-61.

Izidoro, L.F.M., Sobrinho, J.C., Mendes, M.M., Costa, T.R., Grabner, A.N., Rodrigues, V.M., da Silva, S.L., Zanchi, F.B., Zuliani, J.P. and Fernandes, C.F., 2014. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. BioMed Research International. 2014.

Kamiya, H., Sakai, R. and Jimbo, M., 2006. Bioactive molecules from sea hares. Molluscs. Springer. pp. 215-239.

Kicklighter, C.E., Shabani, S., Johnson, P.M. and Derby, C.D., 2005. Sea hares use novel antipredatory chemical defenses. *Current Biology*, 15(6): 549-554.

Kitani, Y., Tsukamoto, C., Zhang, G., Nagai, H., Ishida, M., Ishizaki, S., Shimakura, K., Shiomi, K. and Nagashima, Y., 2007. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish Sebastes schlegeli. *The FEBS Journal*, 274(1): 125-136.

Ko, K.C., Wang, B., Tai, P.C. and Derby, C.D., 2008. Identification of potent bactericidal compounds produced by escapin, an L-amino acid oxidase in the ink of the sea hare Aplysia californica. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(12): 4455-4462.

Ko, K.C., Tai, P.C. and Derby, C.D., 2012. Mechanisms of action of escapin, a bactericidal agent in the ink secretion of the sea hare Aplysia californica: rapid and long-lasting DNA condensation and involvement of the OxyR-regulated oxidative stress pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4): 1725-1734.

Mannino, A.M., Balistreri, P. and Yokeş, M.B., 2014. First record of Aplysia dactylomela (Opisthobranchia: Aplysiidae) from the Egadi Islands (western Sicily). Marine Biodiversity Records. 7.

Masoud, S., 2008. Aquatic Animals Health & Diseases. Rashte, Nashre Haghshenass, pp. 1-12

Melo, V., Fonseca, A., Vasconcelos, I. and Carvalho, A., 1998. Toxic, antimicrobial and hemagglutinating activities of the purple fluid of the sea hare Aplysia dactylomela Rang, 1828. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31(6): 785-791.

Melo, V.M., Duarte, A.B., Carvalho, A.F., Siebra, E.A. and Vasconcelos, I.M., 2000. Purification of a novel antibacterial and haemagglutinating protein from the purple gland of the sea hare, Aplysia dactylomela Rang, 1828. *Toxicon*, 38(10): 1415-1427.

Mostafa, S.R., 2001. Aquatic animals veterinary**.** Tehran, Nasgh.

Nabipour, I., Bolkheyri, A.R., 2011. Persian Gulf medicinal molluscs. Bushehr, Bushehr University of Medical Sciences Publications.

Pereira, R.B., Andrade, P.B. and Valentão, P., 2016. Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of Aplysia genus. *Marine Drugs*, 14(2): 39.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

Pérez, M.J., Falqué, E. and Domínguez, H., 2016. Antimicrobial action of compounds from marine seaweed. *Marine drugs*, 14(3): 52.

Petersen, F. and Amstutz, R., 2008. Natural compounds as drugs. Springer Science & Business Media.

Peymani, J., Gharaei, A., Ghaffari, M. and Taheri, A., 2014. Antibacterial activity of the brown algae (Sargassum glaucescens) ethanolic and aqueous extracts from Chabahar coasts, Oman Sea, Iran. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 22(4): 13-20.

Rogers, C., De Nys, R., Charlton, T. and Steinberg, P., 2000. Dynamics of algal secondary metabolites in two species of sea hare. *Journal of Chemical Ecology*, 26(3): 721-744.

Steinberg, P.D., Schneider, R. and Kjelleberg, S., 1997. Chemical defenses of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation*, 8(3): 211-220.

Tavares, T.C., Nogueira, V.L., Vasconcelos, I.M., Gomes, V.M., da Cunha, M., Carvalho, A.F. and Melo, V.M., 2011. Further characterization and mode of action of dactylomelin-P, an antibacterial protein isolated from the ink of the sea hare Aplysia dactylomela (Rang, 1828). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(2): 200-206.

Yamada, K. and Kigoshi, H., 1997. Bioactive compounds from the sea hares of two genera: Aplysia and Dolabella. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 70(7): 1479-1489.

Yamazaki, M., Ohye, H., Kisugi, J. and Kamiya, H., 1990. Bacteriostatic and cytolytic activity of purple fluid from the sea hare. *Developmental & Comparative Immunology*, 14(4): 379-383.

Downloaded from ornamentalaquatics.ir at 17:55 +0330 on Sunday March 7th 2021

An Examination of the Antibacterial Effect of the Ink of Persian Gulf's Sea Hare *Aplysia dactylomela* on Some *Aquatic Pathogens*

Atashi M.[1], Salehi F.[1*], Davoodi R.[1], Nafisi Bahabadi M.[1], Dashtian Nasab A.[2]

[*]f.salehi@pgu.ac.ir

1-The department of fisheries, the school of mariane science and technology, Persian Gulf University, Bushehr

2-Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bushehr, Iran

,Different variations of Aplysia have been appealing options in medical and pharmaceutical researches for years. Persian Gulf's sea hare—Aplysia dactylomela—is a species native to Persian Gulf and can be evaluated in various areas. In this research, carried out in 2019 in Persian Gulf University's Research Centre, the antibacterial potential of the ink of this species has been measured against three pathogenic bacteria in aquatics, namely *Yersinia rukeri, Streptococcus iniae, and Vibrio Harvey*. The purple ink was extracted out of ten sea hares of Aplysia dactylomela species, the ink has then been applied in raw form against the above-mentioned bacteria in an anti-bacterial test. The measurement of the antibacterial properties has been done through disc diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacterial concentration (MBC) have been determined with serial dilution. *Gentamicin and Tetracycline antimicrobial* discs have been used as positive evidence. The average inhibitory zone for *V.harvey* turned out to be 19/24 millimetres, the MIC was 200 milligrams in millilitre and the MBC was 400 milligrams in millilitre. The inhibitory zone for S.iniae turned out to be 21/72 millimetres; the MIC was 50 milligrams in millilitre and the MBC was 200 milligrams in millilitre. Accordingly, the inhibitory zone for *Y.rukeri* turned out to be 22/36 millimetres; the MIC was 50 milligrams in millilitre and the MBC was 100 milligrams in millilitre. The ink of Persian gulf's sea hare in this research revealed antibacterial effect in reaction to all the three bacteria.

Keywords: Persian Gulf sea hare, purple fluid, Antibacterial