

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

مهدی آتشی<sup>۱</sup>، فرزاد صالحی<sup>۱\*</sup>، رضا داودی<sup>۱</sup>، محمود نفیسی بهابادی<sup>۱</sup>، عقیل دشتیان نسب<sup>۲</sup>

\*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

گونه های مختلف از جنس *Aplysia* سالهاست در زمینه های پزشکی و داروسازی مورد توجه محققین می باشند. خرگوش دریایی خلیج فارس *Aplysia dactylomela* گونه ای بومی در خلیج فارس است و می تواند 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 ruckeri*, *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 رقت های 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 میلی متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد. هاله عدم رشد برای باکتری *S. iniae* به اندازه ۲۱/۷۲ میلی متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر معین شد. به همین ترتیب هاله عدم رشد برای باکتری *Y. ruckeri* به اندازه ۲۲/۳۶ میلی متر و حداقل غلظت بازدارندگی ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر و کشندگی ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر 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

## 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 آبی‌پروری نیز از این مشکل مثنی نمی‌باشد. در این بین بیماری‌های آبی‌ان نیز تهدیدها و خطرات بالقوه‌ای را به صنعت آبی‌پروری تحمیل می‌کند به طوری که همه ساله خسارت‌های قابل توجهی به اقتصاد آبی‌پروری وارد شده و گاهی سبب ورشکستگی سرمایه‌گذاران 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، سنتر 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 حلقه‌های سیاه رنگ بر روی بدن است و در دریاها 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<sup>۱</sup> و موکوس شیری رنگ از غده اپالین<sup>۲</sup> 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<sup>۳</sup> و آرژنین<sup>۴</sup> 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).

<sup>1</sup> Ink gland

<sup>2</sup> Opalin gland

<sup>3</sup> Lysin

<sup>4</sup> Arginin

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

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

خرگوش دریایی و خواص ضد باکتری آن مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش ها

#### ذخیره جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس

برای انجام این تحقیق جوهر بنفش استخراج شده از ۱۰ عدد 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 مخازن ۳۰۰ لیتری منتقل و با استفاده از جلبک های 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 بیماری زا در موجودات آبزی (*Streptococcus iniae* PTTC1887), (*Yersinia ruckeri* PTTC 1888), (*Vibrio harveyi* PTTC 1755) از مرکز منطقه ای کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران به صورت لئو فیلیزه خریداری گردید.

#### آزمایش ضد باکتریایی

برای انجام آزمایش ضد باکتریایی ابتدا باکتری های تهیه شده را مطابق دستورالعمل (مرکز منطقه ای کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران) در محیط TSB<sup>۲</sup> مرکب آلمان فعال

ترکیباتی مانند Aplysianin، Dactylomelin، Dolabellamin 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 باکتری های محیطی محافظت می کنند (جدول ۱) (Kamiya et al., 2006)

بررسی غده پانکراس خرگوش دریایی نشان داده است که ترکیبات ثانویه زیستی متنوعی از جلبک ها که ناشی از رژیم غذایی این موجود از جلبک های مختلف به ویژه جلبک های 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<sup>۱</sup> بوده که جزء ترکیبات زیستی جلبک های قرمز به ویژه جنس Laurencis هستند و دارای خواص متنوع زیستی به ویژه ضد باکتریایی می باشد که در غده پانکراس *A. dactylomela* یافت شده است (Pereira et al., 2016).

با توجه به مشکلاتی همچون بیماری های آبزیان، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها، تجمع آنتی بیوتیک ها در بافت، افزایش نگرانی های 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 گذشته مورد توجه قرار گرفته است. با این هدف مرکب

<sup>۲</sup> Tryptic soy Broth

<sup>۱</sup> Sesquiterpenes

جای آن ۱۰ 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 محیط‌های 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 Tests) با یکدیگر مقایسه شدند که وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P=0.05$ ) تعیین گردید. برای رسم جدول نیز از نرم افزار word (Microsoft 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 تتراسایکلین با هاله عدم رشد ۳۰/۷۴ میلی‌متر و جنتامایسین 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 معین 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 رشد ۲۹/۲ میلی‌متر به طور معنی‌داری کمتر بود. حداقل غلظت بازدارندگی برای این باکتری ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی لیتر تعیین شد.

و پس از دو بار کشت متوالی مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام تست ضد باکتری از روش انتشار دیسک<sup>۱</sup> استفاده گردید (Bauer, 1966). برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد<sup>۲</sup> و حداقل غلظت باکتری‌کشی<sup>۳</sup> 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 سواب 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 بازدارندگی 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 در بسته (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 ۰/۲۲ 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 ۴۰۰ میلی‌گرم 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

<sup>1</sup>Agar disk diffusion

<sup>2</sup> minimum inhibitory concentration (MIC)

<sup>3</sup> Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

باکتری *V. harvey* نسبت به جوهر خرگوش دریایی هاله عدم رشدی به اندازه ۱۹/۲۴ میلی متر از خود نشان داد که این مقدار فاقد اختلاف معنی دار با آنتی بیوتیک جنتامایسین با هاله عدم رشد ۱۸/۷۲ میلی متر بود. ولی در مقایسه با هاله

عدم رشد آنتی بیوتیک تتراسایکلین به اندازه ۲۵/۵۴ میلی متر کاهش معنی داری از خود نشان می داد. حداقل غلظت بازدارندگی برای این باکتری به اندازه ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و حداقل غلظت کشندگی ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر اندازه گیری شد (جدول های ۲ و ۳).

جدول ۲: اندازه بازدارندگی غلظت های مختلف جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس (میلی متر)

| دیسک بلانک | آنتی بیوتیک جنتامایسین | آنتی بیوتیک تتراسایکلین | جوهر بنفش          | باکتری                     |
|------------|------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------------|
| —          | ۲۴/۱۶ <sup>۳</sup>     | ۳۰/۷۴ <sup>۲</sup>      | ۲۲/۳۶ <sup>۱</sup> | <i>Yersinia ruckeri</i>    |
| —          | ۲۱/۷ <sup>۱</sup>      | ۲۹/۳ <sup>۲</sup>       | ۲۱/۷۲ <sup>۱</sup> | <i>Streptococcus iniae</i> |
| —          | ۱۸/۷۲ <sup>۱</sup>     | ۲۵/۵۴ <sup>۲</sup>      | ۱۹/۲۴ <sup>۱</sup> | <i>Vibrio harvey</i>       |

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

جدول ۳: حداقل غلظت بازدارندگی از رشد MIC و حداقل غلظت کشندگی (میلی گرم در میلی لیتر)

| محد اقل غلظت بازدارندگی MIC | محد اقل غلظت بازدارندگی MBC | باکتری                     |
|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| ۱۰۰                         | ۵۰                          | <i>Yersinia ruckeri</i>    |
| ۲۰۰                         | ۵۰                          | <i>Streptococcus iniae</i> |
| ۴۰۰                         | ۲۰۰                         | <i>Vibrio harvey</i>       |

## بحث و نتیجه گیری

اثر ضد باکتریایی جوهر خام و پروتئین dactylomelin-P که از گونه *Aplysia dactylomela* استخراج و جدا سازی شد، بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مانند *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* 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 می تواند به دلیل آن باشد که آنتی بیوتیک ها به عنوان یک ماده خالص با خاصیت ضد باکتریایی قوی به شمار می روند در حالی که جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس شامل مجموعه ای از ترکیبات است (Derby et al., 2018) که تمام آنها دارای خاصیت ضد باکتری نمی باشند.

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 *Staphylococcus aureus* از غلظت های ۱/۲ الی ۵/۸ میکروگرم در میلی لیتر بود. این آزمایش در پلیت ۹۶ تایی و ایجاد رقت های متوالی با اندازه گیری جذب نوری در اسپکتومتر و شمارش سلولهای باکتریایی در میزان جذب نوری مختلف که در طول آزمایش به دست آمده بود، صورت گرفت. نتایج بیوشیمیایی در مورد اثر بازدارندگی نشانگر آن بود که در باکتری *E. coli* از تولید DNA و RNA جلوگیری شد (فقط بازدارندگی 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 می شود که اسید آمینه لیزین و آرژنین به وسیله آمینو اسید اکسیداز د آمینه می شود و محصولات مانده آمونیوم، پراکسید

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 راهنمایی‌های 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 Ibensouda, 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.
- هیدروژن و کتو آمینو کاپروئیک اسید تولید می‌شود. این ترکیبات به ویژه کتو آمینو کاپروئیک 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 *Staphylococcus 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 یکی از عوامل تأثیر گذار در میزان تأثیر 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 *Dactylomelin* دارای اثر اثبات شده و پر قدرت ضد باکتریایی می باشند (Kamiya et al., 2006; Tavares et al., 2011) و نتایج تحقیق حاضر را نیز تأیید می‌کنند.
- اثر بازدارندگی و کشندگی باکتری‌ها در مورد جوهر خرگوش دریایی خلیج فارس با آزمایش‌های انجام شده در تحقیق حاضر تأیید می‌شود. ولی یکی از دلایل اثر بالای ضد باکتریایی

- 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.

- 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.

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

Atashi M.<sup>1</sup>, Salehi F.<sup>1\*</sup>, Davoodi R.<sup>1</sup>, Nafisi Bahabadi M.<sup>1</sup>, Dashtian Nasab A.<sup>2</sup>

\*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 ruckeri*, *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 antibacterial 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.ruckeri* 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