مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره های متانولی و آبی دیواره بدن خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota روی برخی باکتری های بیماریزای انسانی

دکتر ملیکا ناظمی*، دکتر یزدان مرادی** ، محسن گذری***، فرحناز لکزایی****، مریم کریم پور*****

دریافت: ۹۴/۸/۲۷ پذیرش: ۱۲/۱۰

چکیده:

مقدمه و هدف: خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota متعلق به شاخه خارپوستان می باشد، بررسی های انجام شده در رابطه با خواص بیولوژیک خارپوستان نشان می دهد که بیشترین ترکیبات شیمیایی دارای خواص بیولوژیک متعلق به خیارهای دریایی می باشد. این مطالعه به منظور تعیین خواص ضد باکتری عصاره های آبی و متانولی استخراج شده از خیار دریایی نسبت به باکتری های گرم مثبت و منفی که سبب بیماریزایی انسانی می گردند طراحی شده است.

روش کار: ۹ عدد خیار دریایی در بهمن ماه سال ۹۳ از جزیره هنگام جمع آوری شدند. سپس عصاره گیری با استفاده از حلال متانولی از پودر تهیه شده از خیار دریایی انجام گردید. بررسی خواص ضد باکتری عصاره های آبی و متانولی روی باکتری های E. coli، P. aeruginosa، B. pumilus، S. aureus، S. typhi، S. marcescens، B. cereus با استفاده از روش رقت لوله ایی به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) انجام شد.

نتایج: عصاره آبی روی هیچ کدام از باکتری های مورد آزمایش اثر ضد باکتری از خود نشان نداد. عصاره متانولی از رشد باکتریهای گرم منفی اشرشیاکولای، سالمونلا تیفی و سراشیا مارسیسنس جلوگیری نمود و از رشد باکتری های سالمونلا تیفی و سراشیا مارسیسنس در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر جلوگیری نمود. عصاره متانولی از رشد تمامی باکتری های گرم مثبت مورد آزمایش؛ باسیلوس سرئوس، باسیلوس پومیلوس و استافیلوکوکوس آورئوس شد اما تنها منجر به مرگ باکتری استافیلوکوکوس آورئوس در غلظت های ٤٠ میلی گرم بر میلی لیتر شد.

نتیجه نهایی: نتایج نشان می دهد که عصاره متانولی حاوی ترکیبات دارای اثر ضد باکتری می باشد اما بر خلاف بسیاری از جانداران دریایی مورد آزمایش خیار دریایی نسبت به باکتری های گرم منفی نیز اثر ضد باکتری نسبتاً خوبی از خود نشان داد.

کلید واژه ها: حداقل غلظت کشندگی / حداقل غلظت مهار کنندگی / خیار/ ضد باکتری

مقدمه:

عوامل میکروبی یکی از شایع ترین عوامل بیماریزایی در عصر حاضر برای انسان است، به منظور مهار و از بین بردن آن ها باید از آنتی بیوتیک ها که هرکدام با مکانیسم های متفاوتی وارد عمل می شوند استفاده نمود (۱). از طرف دیگر باکتری های پاتوژن پس از مدتی نسبت به آنتی بیوتیک خاص مقاوم شده، بنابراین تحقیق و بررسی به منظور کشف آنتی بیوتیک های جدید باید ادامه داشته باشد (۲).

در عصر حاضر ترکیبات طبیعی نقش بسیار زیادی در علوم پزشکی و دارویی ایفا می نمایند، در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال های اخیر بسیار حائز اهمیت می باشد. به نظر می رسد وجود ترکیباتی با ساختار استروژنی و اتم های هیدروژن که به دلیل محیط زیست جانداران دریایی، آب، چنین ساختارهایی شکل می گیرد آن ها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می نماید (۳). با وجود آنکه کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی

* استادیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (melikanazemi@yahoo.com)

** دانشیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

*** دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، بندرعباس

**** کارشناس ارشد آلودگی دریا، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران

***** کارشناس ارشد زیست شناسی دریا، دانشگاه هرمزگان

جاندارن دریایی می گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است (۴).

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 (۵). بررسی های انجام شده نشان می دهد که بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضد باکتریایی منشاء طبیعی دارد، بر اساس یک برآورد اقتصادی در آمریکا سالانه مبلغی بیش از ۲۰ میلیون دلار صرف تولید ترکیبات ضد باکتریایی می شود (۶).

مطالعات انجام شده نشان می دهد خیارهای دریایی منبع غنی از ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک مانند؛ اثرات ضد باکتری می باشند. خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهد و از نظر رده بندی در راسته خارپوستان قرار می گیرند خیار دریایی جزء مهمی از اکوسیستم دریایی هستند. آنها در تمام اقیانوس‌ها در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و عموما در نزدیکی مرجان‌ها، صخره‌ها یا علف‌های دریایی در آب‌های گرم و کم عمق زندگی می‌کنند (۷). از آنجا که اغلب این مناطق به ویژه اکوسیستم های مرجانی تولیدات و بیوماس بالایی دارند، بنابراین میزان باقیمانده های غذایی در این مناطق بسیار بالاست، از طرف دیگر موکوس تولید شده حاصل از متابولیت های صخره های مرجانی منبع دیگری از مواد آلی می باشند، که تمام عوامل فوق بستر بسیار مناسبی را برای رشد باکتری ها فراهم می نماید (۸) بنابراین یکی از تهدید کنندگان جانداران دریایی مانند؛ خیارهای دریایی، میکرواورگانیسم ها به ویژه باکتری ها می باشند (۹) به همین دلیل آن ها متابولیت های ثانویه متعددی با اثرات ضد باکتریایی تولید می نمایند (۱۰).

خیار دریایی گونه آبزی با ارزشی است که علاوه بر برخورداری از پروتئین کافی و ارزش غذایی بالا (۵۵٪ پروتئین - ۲٪ چربی) در درمان بسیاری از بیماری‌ها و صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این موجودات دارای ارزش اقتصادی بالایی هستند و به عنوان یک محصول تجاری مطرح می باشند. بیشترین کاربرد اقتصادی این آبزیان در شرق آسیا در صنایع غذاسازی و داروسازی سنتی می‌باشد. خیارهای دریایی از لحاظ ارزش غذایی دارای ترکیبات با ارزشی مانند: ویتامین‌های A، ویتامین (B_1)، ریبوفلاوین (B_2) ، نیاسین (B_3)، مواد معدنی به خصوص کلسیم، منیزیم، آهن و روی هستند (۱۱).

با توجه به خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه خیارهای دریایی، به ویژه اثرات ضد باکتریایی موجود در آن ها، در این مطالعه به تعیین اثر ضد باکتریایی متابولیت های ثانویه محلول در متانول و آب خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر جزیره هنگام پرداخته شد.

روش کار:

نمونه برداری و شناسایی نمونه: نمونه های خیار دریایی به تعداد ۹ عدد که معادل ۲۱۸۰ گرم بودند، با اندازه متوسط ۱۵ سانتیمتر در بهمن ماه سال ۹۳ در اطراف جزیره هنگام (شکل ۱) و از عمق ۱۵ تا ۲۰ متری جمع آوری و به آزمایشگاه شیمی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شدند. خیار های دریایی از مخرج به سمت دهان برش داده شدند و پس از تخلیه حفره شکمی، نمونه ها شسته شدند. سپس عضلات دیواره بدن در اندازه های یک سانتی متری بریده شدند. نمونه های برش داده شده پس از انجماد تا زمان استفاده در دمای ۲۴- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شکل ۱: الف) جزیر هنگام (محل نمونه برداری)، ب) خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota

شناسایی خیار دریایی با توجه به ویژگیهای ظاهری و استخراج اسپیکول از نمونه های صید شده و با استفاد از کلید شناسایی FAO انجام گردید.

تهیه عصاره از خیار دریایی: خیارهای دریایی پس از خروج از فریزر و انجماد زدایی به مدت ۲ روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا کاملا خشک گردند. نمونه های خشک شده با استفاده از هاون به صورت پودر در آورده شدند. تمام مراحل عصاره گیری در شرایط استریل و زیر هود انجام گرفت.

به منظور جداسازی ترکیبات قطبی به پودر خیارهای دریایی ۵۰۰ سی سی متانول اضافه گردید و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای اتاق (۲۵C°) قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده را از صافی گذرانده تا ذرات معلق خیار دریایی از آن جدا شده و آنچه باقی ماند، حلال متانولی و ترکیبات آلی موجود در نمونه بود. عصاره قطبی به دست آمده به دستگاه روتاری منتقل گردید، در دمای ۴۰C° و دور ۱۴۵، وارد شد تا حلال (متانول) تبخیر شود. سپس هم حجم نمونه به دست آمده (عصاره متانولی) اتر اضافه گردید، دو فاز آبی و اتری تشکیل شد. توسط دکاتور دو فاز فوق جدا شده و به فاز آبی به طور هم حجم N- بوتانول اضافه شد و تکان داده شد تا ترکیب شوند، سپس فاز رویی که حاوی عصاره آبی بود از فاز اتری جدا گردید (۱۲،۱۳).

بررسی خواص ضد باکتریایی: بررسی خواص ضد باکتریایی با استفاده از روش رقت لوله ایی (Bacterial Broth Dilution Methods) به شرح زیر انجام گرفت:

سویه‌های باکتری Escherichia coli ATCC 15224 ، Pseudomonas aeruginosa ATCC 25619 ، Bacillus pumilus 1529 PTCC ، Staphylococcus aureus ATCC 9144 ، Salmonella typhi PTCC 1609، Serratia marcescens PTCC 1621، Bacillus cereus PTCC 1665 از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس هر کدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ C° در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی‌های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد باکتری‌ها آن‌ها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط براث در لوله‌های آزمایش وارد نمودیم، این کار آن قدر تکرار شد تا کدورت محیط براث با کدورت لوله مک فارلند ۰/۵(McFarland 0.5) یکسان شد. اشاره به این نکته لازم بود که تعداد باکتری های موجود در لوله مک فارلند۰/۵ برابر $1/5\times10^{8}$ CFU/ml می باشد، در حالی که در آزمایش مذکور تعداد باکتری ها برابر $1/5\times10^{6}$ می باشد. به این منظور با رقّت دادن تعداد باکتری ها به رقم مورد نظر رسانده شد. مایع تلقیحی تهیه شده بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد.

از لوله فوق که حاوی $1/5\times10^{6}$باکتری بود به مقدار ۱ میلی لیتر به هرکدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سپس از عصاره‌های متانولی و آبی خیار دریایی با غلظت‌های ۵۰ mg/ml ، ۴۰ mg/ml، ۳۰ mg/ml، ۲۰ mg/ml، ۱۰mg/ml، ۵ mg/ml، ۳mg/ml، ۲mg/ml، ۱/۵mg/ml، ۰/۷۵ mg/ml، ۰/۵۰ mg/ml، ۰/۱۰ mg/ml، ۰/۰۵ mg/ml و ۰/۰۱ mg/ml که در محیط براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی بیوتیک های تتراسایکلین و آمپی سیلین، با غلظت‌های فوق استفاده شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ C° به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آنها مورد بررسی قرار گرفتند. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعّال بیولوژیک بود بسیار کدر شده بود، زیرا باکتری‌ها در آن فرصت رشد را داشته‌اند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند (این آزمایش برای هر سویه باکتری و هر عصاره با سه بار تکرار انجام شد) و لوله‌هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت میزان MIC (Minimum Inhibitory Concentration) که به معنای ممانعت از رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها می‌باشد

را نشان داده، که خود گواه آن خواهد بود که می‌تواند به عنوان یک انتخاب مناسب ضد باکتریایی به منظور درمان بیماران مورد آزمایش‌های بعدی قرار بگیرد (۱۴).

در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی عصاره‌های مورد نظر در از بین بردن باکتری‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود به مقدار ۰/۱ ml به پلیت های استریل تزریق نموده و محیط نوترینت آگار به آن اضافه شد. سپس پلیت ها به انکوباتور منتقل شدند و در دمای ۳۷ C° به مدّت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت پلیت ها بررسی شدند و تعداد کلونی‌های تشکیل شده (CFU) شمرده شد. در پلیت هایی که باکتری رشد کرده بود حاکی از آن است که عصاره مورد نظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد، امّا در پلیت هایی که هیچ گونه کلونی مشاهده نشد نشان دهنده آن است که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است؛ که این مقدار برابر با MBC (Minimum Bactericidal Concentration) می‌باشد (۱۴).

نتایج:

همان طور که از جدول ۱ و شکل ۲ برداشت می‌شود؛ حداقل اثر مهار کنندگی از رشد باکتری (MIC) عصاره متانولی خیار دریایی گونه H. leucospilota برای باکتری اشرشیاکولای و باسیلوس سرئوس برابر ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر، باسیلوس پومیلوس برابر ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر، باکتری های استافیلوکوکوس آورئوس، سالمونلا تیقی و سراشیا مارسیسنس برابر ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. نتایج آزمایش ها نشان می دهد که عصاره متانولی استخراج شده از خیار دریایی اثر مهارکنندگی رشد روی باکتری سودوموناس آئروژینوزا از خود نشان نداده است. عصاره آبی استخراج شده از خیار دریایی فاقد اثر مهار کننده رشد روی باکتری های مورد بررسی بوده است.

شکل ۲ : مشاهده کدورت در لوله ها

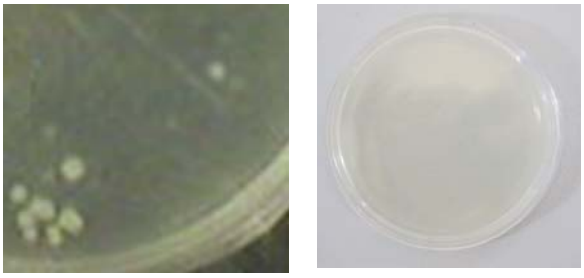
جدول ۱: حداقل غلظت مهار کنندگی عصاره خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota روی باکتری های مورد آزمایش

سویه های باکتری	عصاره‌متانولی (MIC)	عصاره آبی (MIC)	تتراسایکلین (MIC)	آمپی سیلین (MIC)
Escherichia coli 15224 ATCC	۳۰mg/ml	-	۰/۷۵	۰/۷۵
Pseudomonas aeruginosa ATCC 25619	-	-	۱/۵	۱/۵
Bacillus PTCC 1529 pumilus	۲۰mg/ml	-	۱/۵	۱/۵
Staphylococcus aureus ATCC 9144	۱۰mg/ml	-	۰/۷۵	۰/۷۵
Salmonella typhi PTCC 1609	۱۰mg/ml	-	۰/۷۵	۰/۷۵
Serratia marcescens PTCC 1621	۱۰mg/ml	-	۰/۷۵	۰/۷۵
Bacillus cereus PTCC 1665	۳۰mg/ml	-	۱/۵	۱/۵

همان طور که از جدول ۲ و شکل ۳ برداشت می‌شود؛ حداقل اثر کشندگی باکتری (MBC) عصاره متانولی خیار دریایی برای باکتری سراشیا مارسیسنس برابر ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر، باکتری استافیلوکوکوس آورئوس برابر ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر و باکتری سالمونلا تیقی برابر ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد. عصاره متانولی فاقد اثر کشندگی روی باکتری های اشرشیاکولای و باسیلوس سرئوس است.

جدول ۲: حداقل غلظت کشندگی عصاره خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota روی باکتری های مورد آزمایش

سویه های باکتری	عصاره متانولی (MBC)	تتراسایکلین (MBC)	آمپی سیلین (MBC)
Escherichia coli 15224 ATCC	-	۱/۵	۱/۵
Staphylococcus aureus ATCC9144	۴۰mg/ml	۰/۷۵	۰/۷۵
Bacillus PTCC 1529 pumilus	-	۳	۳
Salmonella typhi PTCC 1609	۵۰mg/ml	۱/۵	۱/۵
Serratia marcescens PTCC 1621	۵۰mg/ml	۱/۵	۱/۵
Bacillus cereus PTCC 1665	-	۳	۳



شکل ۳ : (الف) مشاهده پلیت فاقد کلونی
(ب)کلونی های تشکلیل شده باکتری S. aureus.

بحث:

اقیانوس‌ها به عنوان مبدا و خاستگاه زندگی، منبع و سرچشمه ترکیبات طبیعی هستند اصطلاح " ترکیبات طبیعی" معمولا به مواد شیمیایی طبیعی گفته می شود که خواص دارویی دارند. این واژه معمولا برای متابولیتهای ثانویه تولید شده توسط موجودات زنده می باشد .چنین ماده ای به عنوان یک محصول طبیعی در نظر گرفته که می توان آن را تهیه و سنتز کرد (۱۵). ترکیبات طبیعی موجود در جانداران دریایی را می‌توان به عنوان یک منبع غنی از ترکیباتی با کاربرد غذایی، عطریات، رنگدانه‌ای، دارویی و پزشکی استفاده نمود. ترکیبات دارای فعالیت‌های زیستی را از گروه‌های مختلف جانوری از جمله مرجان‌ها، خرچنگ‌ها، تونیکت‌ها، خارپوستان، ماهیان و اسفنج‌ها جداسازی نموده‌اند (۱۶).

نتایج مطالعات نشان می دهد بیشتر این ترکیبات از بی مهرگان دریایی استخراج شده و دارای ساختارهای پپتیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و استروئیدی هستند (۲۴).

بررسی های انجام شده در رابطه با خواص بیولوژیک خارپوستان نشان می دهد که بیشترین ترکیبات شیمیایی دارای خواص بیولوژیک متعلق به خیارهای دریایی می باشد (۱۷).

یکی از خواص بیولوژیک موجود در خیار دریایی خواص ضد باکتریایی می باشد، به همین منظور در این مطالعه علمی این اثر بیولوژیک در رابطه با عصاره های متانولی و آبی خیار دریایی گونه Holothuria leucospilota از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر از جزیره هنگام پرداختیم. نتایج آزمایش نشان می دهد که تنها عصاره متانولی نسبت به باکتریهای مورد آزمایش اثر باکتریواستاتیک از خود نشان می دهد. بر اساس آزمایش انجام شده در این پروژه عصاره متانولی نسبت به باکتری های گرم منفی اشرشیاکولای، سالمونلا تیفی و سراشیا مارسیسنس اثر باکتریواستاتیک در غلظت های ۳۰ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از خود نشان می دهد اما باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به این عصاره مقاوم است. همچنین عصاره متانولی نسبت به باکتری های سالمونلا تیفی و سراشیا مارسیسنس در غلظت های ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر باکتروسیدی از خود نشان می دهند، به عبارتی دیگر این عصاره منجر به مرگ باکتری اشرشیاکولای نمی شود.

در مطالعه ایی که توسط جمالی و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی عصاره های استخراج شده از خیار دریایی گونه H. leucospilota نسبت به باکتری اشرشیاکولای انجام شد ؛ نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره‌های متانولی، هگزانی و کلروفرمی در غلظت های ۰/۷۸ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از اثر باکتریواستاتیک نسبت به این باکتری از خود نشان می دهند (۲۲).

در پژوهش دیگری که روی عصاره های خیار دریایی گونه H. leucospilota از جزیره لارک انجام شد عصاره های کلروفرمی در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر ضد باکتری روی باکتری اشرشیاکلای نشان دادو عصاره هگزانی استخراج شده در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر منجر به مرگ باکتری گردید (۲۳).

عامل تفاوت نتایج محققین در بررسی خواص بیولوژیک مانند اثرات ضد باکتری مورد آزمایش در این پژوهش علمی به علت وجود متابولیت های ثانویه ای می باشد که در شرایط مختلف اکولوژی سنتز می گردند، در واقع متابویت های ثانویه سلاح های شیمیایی هستند که آبزیان مانند خیار های دریایی برای ادامه حیات از آنها استفاده می کنند. به عبارت دیگر هر گونه بر اساس موقعیت اکولوژی این ترکیبات را سنتر می کند، از آنجا که اثرات ضد باکتری عصاره های استخرا ج شده از خیار دریایی گونه H. leucospilota از جزیره هنگام بیشتر از سایر نمونه ها می باشد می توان چنین برداشت نمود که این گونه بیشتر در تهدید میکروبی در اکوسیستم دریایی بوده است.

در پژوهش دیگری که اثر عصاره متانولی ـ استونی استخراج شده از دیواره بدن خیاردریایی گونه Parastichopus parvimensis از جزیره سانتا کاتالینای کالیفرنیا روی باکتری های اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس به روش انتشار دیسک انجام شده، مشخص گردید که این عصاره دارای اثر ضد باکتری می باشد (۱۸). در مطالعه حاضر نتایج آزمایش ها روی باکتری های گرم مثبت نشان می دهند که عصاره متانولی در غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر از رشد باکتری های استافیلوکوکوس آورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس جلوگیری می نماید، اما تنها منجر به مرگ باکتری استافیلوکوکوس آورئوس در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر می گردد.

بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره های آبزیان دریایی نشان می دهد که بیشترین تأثیر آن ها روی باکتری های گرم مثبت است (۲۵)، همان طور که از نتایج این مطالعه برداشت می گردد عصاره های استخراج شده از خیار دریایی بیشترین اثر ضد باکتریایی را وری باکتری های گرم مثبت دارند. به همین علت این باکتری درکمترین غلظت منجر به مرگ باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس که از باکتری های گرم مثبت هست می گردد.

مطالعات انجام شده روی عصاره های استخراج شده از خیارهای دریایی گونه های مختلف نشان می دهد که به جز گونه های مختلف باسیلوس نسبت به باکتری های اشرشیاکولای، آئرومونـاس هیدروفیلا، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا پنومونیه، استافیلوکوکوس آورئوس و سالمونلا تیفی اثر ضد باکتری از خود نشان می دهد (۱۹) که این نتایج با نتایج به دست آمده در این آزمایش بسیار نزدیک است.

در پژوهش دیگری که روی عصاره های خیار دریایی گونه H. leucospilota انجام شد؛ عصاره متانولی استخراج شده از خیار دریایی اثر ضد باکتری نسبت به باکتری های های استافیلوکوکوس آورئوس و باسیلوس سوبتیلیس از خود نشان داده اند (۱۷).

در آزمایش که توسط Mokhlesi و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی عصاره‌های اتیل استات، متانول و آب- متانول از اندام های داخلی، مایع سلومی و دیواره سلولی خیار دریایی Bohadschia marmorata که از خلیج فارس انجام شد اثر ضدمیکروبی نشان داده نشد (۲۰).

آبراهام و همکاران در سال ۲۰۰۱ فعالیت های ضد باکتریایی و ضد قارچی عصاره های الکلی گونه های Holothurain نظیر Actinopyja echimites، A. miliaris، Holothuria atra، H. scabra را در سواحل Timil Nadu را مطالعه نمودند نتایج نشان داد که سطوح مختلف عصاره هایA.miliaris، H. atra و H. scabra بر باکتری های اشرشیا کلای، انتروکوکوس، کلبسیلا پنئومونا، سودوموناس آئروژیناس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و ویبریو هاروی و Aspergillus sp اثر بازدارندگی دارد ولی این عصاره ها بر باکتری Bacillus sp موثر نبود.

نتیجه نهایی :

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که عصاره خیار دریایی گونه H. leucospilota جزیره هنگام دارای اثرات ضد باکتری قوی روی باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آورئوس و باکتری های گرم منفی سالمونلا تیفی و سراشیا مارسیسنس می باشد.

سپاسگزاری :

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشکده خلیج فارس موسسه تحقیقات شیلات می باشد. بدینوسیله از همکاری عزیزانی که در انجام آن با ما همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض نمی باشد.

References

1. Andersson DL. Persistence of antibiotic resistent bacteria. Curr Opin Microbial 2003; 6: 452- 456.
2. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science 1992; 257:1050-1055.
3. Mancini I, Defant A, Guella G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti Infect Agent Med Chem 2007; 17: 17-47.
4. Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S, et al. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. Biotechnology 1999;70:15-25.
5. Newman DJ, Cragg GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. J Nat Prod 2004;67:1216-1238.
6. Harvey A. The continuing value of natural products to drug discovery. GIT Laboratory. 2001; 5(6): 284–285.
7. Barnes RD. Invertebrate zoology. 5th ed. New York: Saunders, 1987.
8. Yatnita Parama Cita, Syamsudin Abdillah. Antibacterial activities of bacterial symbionts of soft corals collected from the water of Wai-Sai Island, Papua. Pharmacia Lett 2014; 6 (6): 8-13.
9. Faulkner DJ, Harper MK, Haygood MG, Salomon E, Schmidt EW. Symbiotic bacteria in spo-nges: sources of bioactive substances. In: Fusetani N, (ed). Drugs from the sea. 2000:107–119.
10. Zaro BA. Marine sponges: a source of novel antibiotics, roceedings of the Western. Pharmacol Soc 1982; 25: 11–13.
11. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumber for functional foods. Mar Drugs 2011;9:1761-1805.
12. Estrada A, Katselis G, Laarveld B, Barl B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from Polygala senega. Cop Immunol Microb Infect Dis 2000; 23: 27-43.

13. Bligh EG and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction. Can J Biochem Physiol 1959 ; 37:911-917.
14. Rosenblatt JE. Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Mayo Clin Proc 1991; 66: 942-948.
15. Sipkema D, Maurice CR, Franssen RO, Tramper J. Marine sponges as pharmacy. Mar Biotechnol 2005; 7: 142-162.
16. Kojjoa A, Sawangwong P. Drugs and cosmetics from the sea. Mar Drugs 2004, 2: 73-82.
17. Farjami B, Nematollahi MA, Moradi Y, Irajian GR, Nazemi M, ArdebiliA, et al. Antibacterial activity of the sea cucumber Holothuria leucospilota. Int J Mol Clin Microbiol 2013; 1: 225- 230.
18. Villason J, Pomory CM. Antibacterial activity of extracts from the body wall of parastichopus parvimensis (Echinodermata: Holothuroidea). Fish Shellfish Immunol 2000; 10: 465–467.
19. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. Mar Drugs 2011;9:1761-1805.
20. Mokhlesi A, Saeidnia S, Gohari AR, Shahverdi AR, Mollazadeh-Moghaddam K, Eshaghi N. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities bohadschia marmorata, a sea cucumber from North coastal of Persian Gulf. Pharmacology on line 2011; 3: 1029-1038.
21. Abraham TJ, Nagarajan J, Shanmugan SA. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from Holothurian species. Indian J Mar Sci 2001; 31(2): 161-164.
22. Jamali S, Emtiazjoo M, Teimoory Toolabee L, Zeinali S, Keypour S, Sardari S, et al. Antibacterial effect of the Persian Gulf sea cucumber Holoturia. SP extracts on three strain of Escherichia coli. Modares J Med Sci Pathobiol 2009; 12: 37-49.(Persian)
23. Farjami B, Nematollahi MA, Moradi Y, Irajian GR, Nazemi M. Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (holothuria leucospilota) of persian gulf on the escherichia coli. Iranian J Med Microbiol 2014; 8: 26-32. (Persian)
24. Datta D, Talapatra S, Swarnakar S. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. Int Let Nat Sci 2015;7.
25. Nazemi M, Salimi MA, Salimi PA, Motallebi A, Jahromi ST, Ahmadzadeh O. Antifungal and antibacterial activity of Haliclona sp. from the Persian Gulf, Iran. J Mycol Méd 2014;24(3): 220-4.

Original Article

Investigations of Antibacterial Activity of Methanol and Aqueous Extracts of the Body Wall of Sea Cucumber Holothuria leucospilota on some Human Pathogenic Bacteria

M. Nazemi, Ph.D.[*] ; Y. Moradi, Ph.D.[**] ; S. Gazari, M.Sc.[***] ; F. Legzaee, M.Sc.[****]
M. Karimpoor, M.Sc.[*****]

Received: 15.7.2015 Accepted: 5.12.2015

Abstract

Introduction & Objective: Holothuria leucospilota, sea cucumber, is a species of the Phylum Echinodermata. Sea cucumbers have the most natural products with biological activity. In this study we investigated the antibacterial activity of aqueous and methanol extract of H. leucospilota used against gram positive and gram negative human pathogenic bacteria.

Materials & Methods: 9 Samples of H. leucospilota were harvested from the Hengam Island,. The methanol extract was prepared from the powder of sea cucumber. The antibacterial activity of the extracts was determined by broth dilution methods against clinical Gram-negative bacteria to identify MIC and MBC.

Results: Aqueous extract of H. leucospilota was inactive on the bacteria. Methanol extract was active on Gram-negetive bacteria; E. coli, Salmonella typhi and Serratia marcescens. But it killed only Salmonella typhi and Serratia marcescens. The MBC of H. leucospilota methanol extract was 10 mg/ml. Methanol extract was active on all Gram-positive bacteria; B. pumilus, B. cereus and S. aureus but it killed only S. aureus. The MBC of H. leucospilota methanol extract was 40 mg/ml.

Conclusion: Based on our results, H. leucospilota methanol extract. can be considered as a source of novel antibiotic. Contrary to many marine organisms, sea cucumbers are active against gram-negative bacteria.

(Sci J Hamadan Univ Med Sci 2016; 23 (1):75-82)

Keywords: Antibacterial / Cucumbers / Minimum Bactericidal Concentration
Minimum Inhibitory Cocentration

---
* Assistant Professor, Iranian Fisheries Research Institute, Faculty of Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research
Agricultural Research Education and Extension Organization (melikanazemi@yahoo.com)
** Associate Professor, Faculty of Iranian Fisheries Research Institute
Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
*** Ph.D. Candidate in Microbioligy, Iranian Fisheries Research Institute
Persian Gulf and Oman Sea Ecological Research, Bandar Abbas, Iran.
**** M.Sc. in Marine pollution, Iranian Fisheries Research Institute
Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
***** M.Sc. in Marine Biology, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.