Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 8, Number 1 (06-2014)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Study of Antibacterial Effect of the Extracts of the Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) of Persian Gulf on the *Escherichia coli*

Behnam Farjami[1], Mohammad Ali Nematollahi[1], Yazdan Moradi[2], Gholam Reza Irajian[3], Melika Nazemi[2]

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Iranian Fisheries Research Organization, Tehran, Iran
3. Department of Medical Microbiology, Medical School , Iran University of medical sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received:2014/03/11
Accepted:2014/06/20
Available online:2014/05/05

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 1393; 8(1): P 27-33

Corresponding author at:

Dr. Mohammad Ali Nematollahi

Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Email:
malahi@ut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Sea cucumber has different properties through having different biological compounds. In this study, the antibacterial activity of the extracts of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* was investigated on *Escherichia coli*.

Materials and Methods: Sea cucumber fishery samples after washing were crushed and powdered. The methanol, chloroform and hexane extracts of body wall, gonads and intestine were prepared. The antibacterial effect of the extracts was studied on the *E.coli* at several concentrations. Also minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of the extracts were studied against bacteria.

Results: The results showed that methanol extracts had no effect, chloroform extracts showed antibacterial activity at concentrations of 5 and 10 mg per ml. Hexane extract of wall at concentrations of 5 and 10 and the intestine hexane extract at a concentration of 2.5, 5 and 10 mg per ml have antibacterial activity against bacteria. None of the concentrations of the gonadal hexane extract showed any antibacterial activity. Only the hexane extract of intestine killed the bacteria at a concentration of 10 mg /ml.

Conclusions: According to the findings of this research, extracts of sea cucumber *H.leucospilota* can be used in preparation of natural antimicrobial drugs as a valuable source of compounds with potential of antibacterial.

Key Words: *Sea cucumber extract, antibacterial activity, biological compounds, Escherichia coli*

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Farjami B, Nematollahi M, Noradi Y, Irajian G, Nazemi M. Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) of Persian Gulf on the *Escherichia coli*. Iran J Med Microbiol . 2014; 8 (1) : 27-33

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۸ – شماره ۱ – بهار ۱۳۹۳
Journal homepage: www.ijmm.ir
مقاله پژوهشی

بررسی اثر ضد باکتری عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس *(Holothuria leucospilota)* بر باکتری *Escherichia coli*

بهنام فرجامی[۱]، محمد علی نعمت‌اللهی[۱]، یزدان مرادی[۲]، غلامرضا ایراجیان[۳]، ملیکا ناظمی[۲]

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲. سازمان تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران
۳. گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۳/۰۱/۲۰
پذیرش:۱۳۹۳/۰۳/۱۰
انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۳/۲۰
موضوع:
مواد ضد میکروبی

IJMM 1392; 8(1): 27-33

نویسنده مسئول:
دکتر محمد علی نعمت‌اللهی
گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
تلفن: ۰۹۱۲۴۶۷۲۶۷۴
پست الکترونیک:
malahi@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: خیار دریایی بواسطه داشتن ترکیبات بیولوژیک مختلف دارای خواص گوناگونی می‌باشد. در این پژوهش اثر ضدباکتریایی عصاره خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* بر باکتری *اشریشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: نمونه‌های خیار دریایی پس از صید، شستشو، خرد و پودر شدند. عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی از بخش‌های دیواره، گناد و روده این موجود تهیه گردید. اثر ضدباکتری این عصاره‌ها بر باکتری *اشریشیاکلی* در چندین غلظت مورد بررسی قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی عصاره‌ها در برابر باکتری‌ها نیز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی هیچ اثری نداشتند، عصاره‌های کلروفرمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضدباکتری نشان داد. عصاره هگزانی استخراج شده از بخش دیواره در غلظت‌های ۵ و ۱۰ و عصاره هگزانی روده در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری جلوگیری کرد. عصاره هگزانی گناد در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد بررسی اثر ضدباکتری نشان نداد. همه عصاره‌های کلروفرمی و عصاره هگزانی دیواره در غلظت ۵ و عصاره هگزانی گناد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کمترین غلظت بازدارندگی از رشد را داشتند. در بین عصاره‌ها فقط عصاره هگزانی روده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مرگ باکتری شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این پژوهش عصاره خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* می‌تواند به عنوان منبعی که دارای ترکیباتی با ارزش با توان ضدباکتری معنی‌دار است در تهیه داروهای ضد میکروبی طبیعی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی : عصاره خیاردریایی، فعالیت ضدباکتریایی، ترکیبات بیولوژیک، *Escherichia coli*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

خیار دریایی یک بی‌مهره دریایی و از راسته خارپوستان و رده *Holothuroidea* می‌باشد که در سراسر جهان در کف دریا یافت می‌شود (۱). این موجودات در طیف گسترده‌ای از زیستگاه‌ها ساکن هستند (۲). خیارهای دریایی یکی از جانوران دریایی مهم هستند که به عنوان منبع غذایی انسان، بویژه در برخی از بخش‌های آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). با رشد تقاضای جهانی بواسطه کاربردهای غذایی و دارویی، بسیاری از گونه‌های خیار دریاییِ قابل برداشت، مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند (۴-۷). این موجودات دارای درصد بالایی از پروتئین و البته فاقد کلسترول است و در زمره مواد غذایی نیروبخش قرار می‌گیرد (۸). ترکیبات زیست فعال بسیاری، از گونه‌های مختلف خیار دریایی گزارش شده است. تعدادی از این ترکیبات دارای فعالیت

بیولوژیکی هستند (**۹، ۱۰**). در تحقیقاتی که اخیرا روی عصاره‌ها و ترکیبات بدست آمده از خیار دریایی صورت گرفته است، خواص سیتوتوکسیسیتی (**۱۱، ۱۲**) و آنتی اکسیدانی (**۱۳**)، ضد باکتری، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد سرطانی (**۱۴، ۱۵**) آن به اثبات رسیده است (**۱۶-۱۸**). عصاره خیار دریایی در مطالعات مختلف بعنوان عوامل ضدمیکروبی بالقوه ثابت شده است. فعالیت‌های ضد باکتری و ضدقارچیِ عصاره‌های الکلی بر گونه‌های *Actinopyga echinites*، *Actinopyga miliaris*، *Holothuria atra* و *Holothuria scabra* توسط Jawahar و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (**۱۹**). محققان دریافتند که به استثنای *Bacillus sp.*، سایر گونه‌ها مانند *Escherichia coli*، *Enterococcus sp.*، *Aeromonas hydrophila*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae*، *Staphylococcus aureus*، *Salmonella typhi*، *Vibrio harveyi* وگونه آسپرژیلوس جداسازی شده از ماهی نسبت به عصاره‌های آزمایش شده‌ی خیار دریایی حساس می‌باشند.

خلیج فارس یک محیط منحصر بفرد با تنوع زیستی غنی می‌باشد که این محیط بعنوان یک میزبان بسیار مناسب جهت پژوهش بر روی فعالیت‌های زیستی دریایی محسوب می‌گردد. ۱۷ گونه از رده خارپوستان در آب‌های اطراف ایران شناسایی شده است (**۲۰**). با وجود مطالعاتی که در سراسر جهان در مورد اثربخشیِ برخی از گونه‌های خیاردریایی به عنوان منابع ضد میکروبی، ضد قارچی و سیتوتوکسیک انجام شده است، اطلاعات کمی در ارتباط با فعالیت زیستی گونه‌های خیار خلیج فارس موجود می‌باشد (**۲۱**). از جمله تحقیقاتی که بر روی گونه‌های خیار دریایی خلیج فارس انجام شده است می‌توان به این موارد اشاره کرد، Mokhlesi و همکاران (۲۰۱۱) فعالیت سیتوتوکسیک، ضد باکتری و ضد قارچی یکی از خیارهای دریایی سواحل شمالی خلیج فارس (*Bohadschia marmorata*) را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که عصاره استخراج شده از این گونه دارای اثر ضدقارچی و فاقد اثر ضدباکتری بوده است(**۲۱**). Jamali و همکاران (۲۰۱۰) نیز اثر ضد باکتری عصاره‌های طبیعی خیار دریایی خلیج فارس *Holoturia.* را بر سه سویه از باکتری *اشریشیا کلی* بررسی نمودند، نتایج پژوهش آنها نشان داد که عصاره متانولی و کلروفرمی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب باعث مرگ سویه‌های باکتری K12 و TG1 شدند (**۲۲**).

اشریشیا کلی یک باکتری میله‌ای گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. اکثرا *اشریشیا کلی* در دستگاه گوارش پستانداران یافت می‌شود. این باکتری شاخص قابل اطمینان برای بررسی آلودگی مدفوعی آب، مواد غذایی، شیر و سایر محصولات لبنی می‌باشد (**۲۳**).

هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد باکتریِ عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی استخراج شده از بخش‌های دیواره، روده و گناد خیار دریایی *Holothuria leucospilota* بر باکتری *Escherichia coli* (ATCC 25922) می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌برداری

نمونه‌های خیار دریایی با اندازه متوسط ۱۵ سانتیمتر در دی ماه ۹۱ در اطراف جزیره لارک و در عمق ۳۰-۲۵ متری جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه فرآوری آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس منجمد گردید. برای مشخص نمودن رده‌بندی خیاردریایی در حد جنس و گونه، ویژگی‌های ظاهریِ خیارهای صید شده بررسی و با کلید شناسایی FAO مطابقت داده شد تا جنس و گونه نمونه مورد نظر مشخص و تایید شد.

عصاره‌گیری

خیارهای دریایی پس از خروج از فریزر و انجماد زدایی پاکسازی شدند به این ترتیب که از مخرج به سمت دهان برش داده شد و تخلیه حفره شکمی صورت گرفت. در این قسمت بخش‌های دیواره، روده و گناد بصورت جداگانه به قطعات کوچک خرد شد. پس از آن، نمونه‌ها در حرارت ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ روز باقی ماند تا کاملاً خشک گردد. در ادامه نمونه‌های خشک شده با دستگاه خرد کن ۱-۲-۳ (Worldstar) خرد شده و سپس به وسیله هاون بطور کامل پودرگردید. پودر آماده شده با سه حلال هگزان، کلروفرم و متانول (Merk, Darmstadt, Germany) به مدت ۶ ساعت سوکسله شد، سپس حلال‌ها در هر مرحله تحت شرایط خلا، تبخیر شد. نمونه حاصل از حلال متانول بعد از تبخیر در خلا، بصورت هم حجم با آب مقطر و ان- بوتانول (Merk, Darmstadt, Germany) مخلوط و سپس جهت جداسازی فاز مورد نظر، محلول مورد نظر دکانته گردید. در نهایت فازهای حاصل از دکانته جهت حذف حلال

تحت خلا قرار گرفت (**۲۴**). عصاره‌های حاصل از بخش‌های مختلف بدن خیار دریایی برای انجام تست ضد باکتری به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران منتقل شد.

تعیین اثر ضدباکتری

از ۹ عصاره موجود، استوک‌هایی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید (جهت ساختن محلول عصاره از دی متیل سولفوکساید (DMSO) و آب مقطر استفاده گردید). محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) (Merk, Darmstadt, Germany) در آب مقطر حل شد و بر روی شعله تا زمانی که رنگ محیط شفاف شود تکان و حرارت داده شد. دامنه غلظت هر کدام از عصاره‌ها از ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر شروع شده و به ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ختم شد. برای ساختن غلظت‌های ذکر شده ابتدا ۰/۰۴ گرم از وزن خشک هر کدام از عصاره‌ها در ۱میلی‌لیتر بافر اولیه (آب مقطر یا دی متیل سولفوکساید) حل گردید تا محلول استوک با غلظت۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بدست آید. برای رسیدن به غلظت‌های کمتر برای هر عصاره ابتدا به وسیله محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) ۷ رقت ۲۰، ۱۰، ۵، ۲,۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش رقت سازی متوالی (Serial dilution) تهیه گردید. سویه باکتری استاندارد مورد بررسی در این تحقیق *اشریشیاکلی* (ATCC 25922) از بانک میکروبی دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه ایران تهیه شد، سپس باکتری بعد از کشت خطی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلنی‌های تک ایجاد شده برای انجام آزمایش استفاده شود (**۲۵**).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) از روش ریزرقیق‌سازی محیط کشت (Broth micro dilution) استفاده شد، بدین شرح که برای انجام کار از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه استریل استفاده شد. از هر کدام از غلظت‌های عصاره‌ها حجم ۵۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت افزوده شد. سپس از نمونه باکتری با کدورت مناسب نیز به میزان ۵۰ میکرولیتر به دامنه غلظت عصاره‌ها اضافه گردید (غلظت نهایی عصاره ها به ۱۰، ۵ ،۲,۵ ،۱/۲۵ ،۰/۶۲۵ ،۰/۳۱۲و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مبدل گردید). در نهایت میکروپلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت در کنار یک پنبه خیس (برای جلوگیری از تبخیر محیط براث درون چاهک‌ها) قرار داده شد. کدورت چاهک‌های میکروپلیت توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد (۲۵).

تعیین حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration)

از نمونه هایی که در محیط MIC رشد نداشته اند روی محیط مولر هینتون آگار کشت و پلیتی که ۹۹/۹٪ از تلقیح اولیه باکتری کم شده باشد به عنوان MBC می باشد و یا اگر رشدی مشاهده می گردد به اندازه ۰/۱٪ تلقیح اولیه باشد.

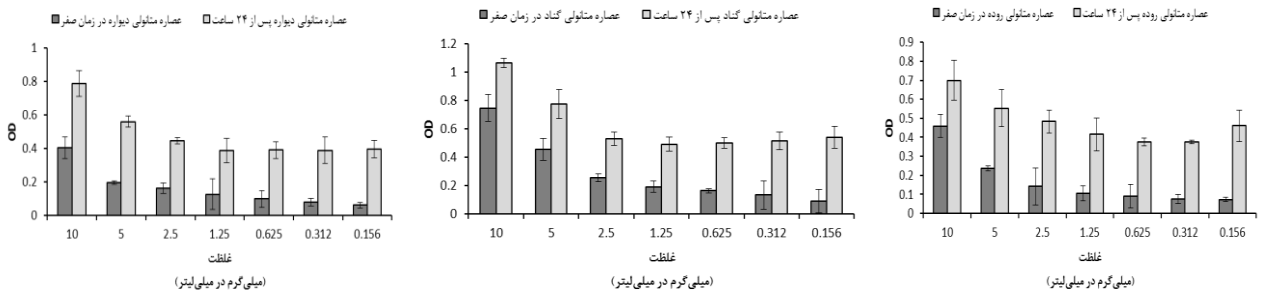
آزمون‌های آماری

در این پژوهش برای تحلیل آماری داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزارهای SPSS نسخه ۱۷ و Excel استفاده گردید. برای تعیین نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگراف- اسمیرنوف و برای تعیین معنی‌دار بودن اختلاف از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شدند.

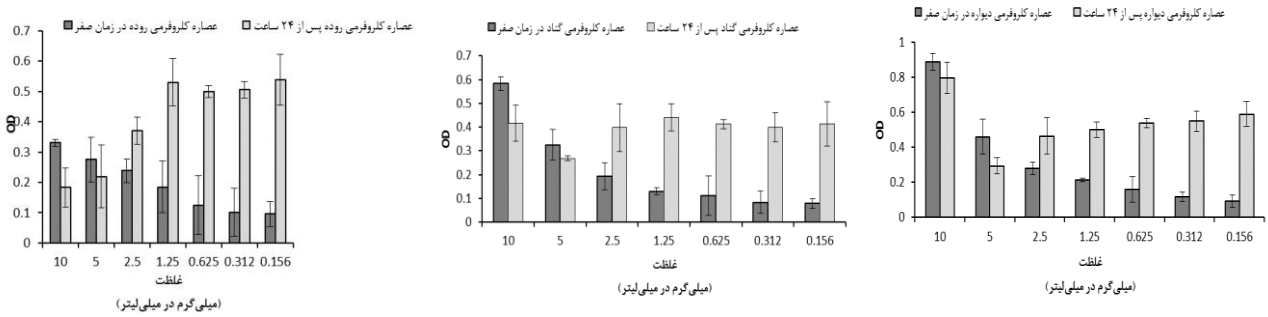
نتایج

اثر ضدباکتری

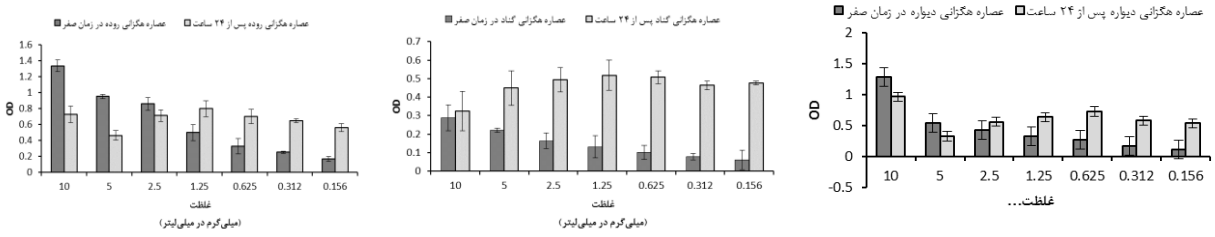
نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریاییِ عصاره‌های مختلف خیاردریایی بر باکتری *اشریشیاکلی* نشان داد که هیچ‌کدام از عصاره‌های متانولی در هیچ‌یک از غلظت‌های بکار برده شده اثر ضد باکتری ندارند و OD عصاره پس از ۲۴ ساعت بطور معنی‌داری نسبت به زمان صفر افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$). افزایش OD حاکی از رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: اثر عصاره‌های متانولی روده (راست)، گناد (وسط) و دیواره (چپ) خیاردریایی بر *اشریشیا کلی*



شکل ۲: اثر عصاره‌های کلروفرمی دیواره (راست)، گناد (وسط) و روده (چپ) خیاردریایی بر *اشریشیا کلی*



شکل ۳: اثر عصاره‌های هگزانی دیواره (راست)، گناد (وسط) و روده (چپ) خیاردریایی بر *اشریشیا کلی*

بررسی عصاره‌های کلروفرمی استخراج شده از بخش‌های مختلف خیاردریایی بر باکتری *اشریشیاکلی* نشان داد که هر سه نوع عصاره (کلروفرمی گناد، دیواره و روده) در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری اثر ضدباکتری داشتند (شکل ۲). نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره‌های هگزانی بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* نشان داد که عصاره هگزانی دیواره در غلظت‌های ۵ و ۱۰ و عصاره هگزانی روده در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضدباکتری داشت (شکل ۳).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی

در مورد عصاره‌های متانولی در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش اثر بازدارندگی مشاهده نشد. عصاره‌های کلروفرمی گناد، دیواره و روده خیاردریایی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* کمترین غلظت بازدارندگی را در دوز ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان دادند. عصاره هگزانی دیواره و روده کمترین غلظت بازدارندگی را به ترتیب در دوزهای ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در برابر باکتری داشتند. حداقل غلظت بازدارندگیِ عصاره هگزانی گناد در برابر باکتری *اشریشیاکلی* در هیچ‌یک از

غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش مشخص نگردید (جدول ۱).

جدول ۱: حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگیِ عصاره‌های مختلف خیاردریایی برباکتری *اشریشیا کلی*

اندام	عصاره	MIC mg/ml	MBC mg/ml
		E. coli	*E. coli*
دیواره	متانولی	–	–
	کلروفرمی	۵	–
	هگزانی	۵	–
گناد	متانولی	–	–
	کلروفرمی	۵	–
	هگزانی	–	–
روده	متانولی	–	–
	کلروفرمی	۵	–
	هگزانی	۲/۵	۱۰

بحث

در سال‌های اخیر، توجه زیادی به بررسی فعالیت‌های زیستی محصولات طبیعی و استفاده دارویی بالقوه از آنها شده است (۲۶). توسعه داروهای ضدمیکروبیِ بی‌خطر و موثر در ۷۰ سال گذشته متحول گردیده است (۲۷). با این حال استفاده گسترده از پادزیست، ظهور پاتوژن‌های مقاوم به پادزیست را افزایش داده است (۲۸). توسعه مقاومت دارویی در پاتوژن‌های انسانی در برابر پادزیست‌هایی که بطور معمول استفاده می‌شود، جستجو برای مواد ضدمیکروبی از سایر منابع از جمله منابع طبیعی اعم از منابع خشکی و دریایی را لازم کرده است (۲۹). در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی استخراج شده از بخش‌های دیواره، گناد و روده خیاردریایی بر باکتری *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی هیچ‌گونه اثر ضدباکتری نداشتند، عصاره‌های کلروفرمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰، عصاره هگزانی دیواره در غلظت‌های ۱۰ و ۵ و عصاره هگزانی روده در غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضدباکتری داشتند. مطالعات داروشناسی و شیمیایی متعددی بر روی چندین گونه خیاردریایی انجام شده است که مشخص کرده این بی‌مهرگان شامل گلیکوزیدهای تری‌ترپنی با خواص ضدقارچی، ضدباکتری و سیتوتوکسیک می‌باشند. در تحقیقی که توسط Kuznetsova و همکاران (۱۹۸۲) انجام شد، اثر عصاره‌های مختلف خیاردریایی گونه‌های *Holothuria atra* و *Holothuria scabra* در برابر ۷ گونه باکتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی مشخص کرد که عصاره‌های متانولی و چربی هیچ اثر بازدارندگی نداشتند ولی عصاره یک بافر نمکی فسفات، بر رشد باکتری‌ها اثر ضدباکتری نشان داد (۳۰). در مطالعه دیگر عصاره متانولی-استونی بدست آمده از دیواره بدن خیاردریایی *پاراستیکوپوس پارویمنسیس* (*Parastichopus parvimensis*) جزیره سانتا کاتالینای کالیفرنیا بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* به روش انتشار دیسک اثر داده شد. در پایان، اثر ضدباکتری این عصاره بر باکتری‌های مورد مطالعه تایید شد (۳۱). در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری عصاره‌های کلروفرمی و هگزانی بیش از متانولی بود، این نشان می‌دهد که این حلال‌ها، سیستم حلال خوبی برای حلالیت مواد فعال زیستی موجود در خیار دریایی می‌باشند. یکی از عوامل مهم که باعث ایجاد خاصیت ضدباکتری در عصاره‌های استخراج شده از خیاردریایی شده است، وجود متابولیت‌های ثانویه مانند گلیکوزیدهای تری‌ترپنی می‌باشد (۳۲). این ترکیبات باعث افزایش تولید آنتی‌بادی‌ها، افزایش اثر حفاظتی واکسن‌ها و تحریک مقاومت ضدباکتری موش‌ها در برابر میکروارگانیسم‌های گرم منفی متعلق به جنس *اشریشیا*، *پروتئوس* و *سالمونلا* شد (۳۳). پتانسیل ضد میکروبیِ این عصاره‌ها به احتمال زیاد می‌تواند به حضور عوامل ضد میکروبی مانند ساپونین‌های استروئیدی نسبت داده شود (۳۴). متابولیت‌های دیگری نیز مانند اسیدهای چرب چندغیر اشباعی (۳۵)، گلیکولیپیدها (۳۶)، پلی‌آمین‌ها (۳۷)، کاروتنوئیدها (۳۸) یا استرول‌ها (۳۹) ممکن است در خارتنان بعنوان ترکیبات فعال عمل کنند. ممکن است که اثر ضدباکتری عصاره‌های خیار دریایی بدلیل تجمعی از چندین ترکیب زیست‌فعال باشد. مکانیسم اثر عصاره‌ها به احتمال فراوان بر اساس تاثیر عصاره‌ها بر روی دیواره و غشا می‌باشد که با تضعیف عمل ممانعت کنندگی غشا و دیواره باکتری مذکور موجب نفوذ عصاره به داخل سلول و متلاشی شدن سلول می‌شود. در این مطالعه، عصاره‌های متانولی جدا شده از بخش‌های مختلف خیاردریایی در هیچ غلظتی در برابر باکتری *اشریشیاکلی* اثر ضدباکتری نداشت، این امر ممکن است به این خاطر باشد که باکتری *اشریشیا کلی* یک باکتری گرم منفی است و وجود لایه اضافی غشای خارجی در این باکتری می‌تواند باعث کاهش نفوذ

پادزیست (آنتی‌بیوتیک) به داخل سلول شود، و از طرفی به این معنا که حلال متانول بر خلاف هگزان و کلروفرم، توانایی جدا کردن ترکیبات بیولوژیکی موثر موجود در نمونه مورد بررسی این تحقیق را ندارد تا آن ترکیبات بتوانند با عبور یا تخریب این لایه غشای اضافی به اندام های حساس باکتری آسیب برسانند و بدین وسیله موجب عدم رشد و در نهایت مرگ باکتری شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از خانم دکتر عظیمی (دانشکده پزشکی دانشگاه ایران) و آقای دکتر احمدی(دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی) که در انجام آزمایش‌ها همکاری نمودند، تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Althunibat O, Hashim RB, Taher M, Daud J, Iked MA, Zali BI. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Three Malaysian Sea Cucumber Species. Eur J Sci Res. 2009; 37:.376-387.
2. Graham J, Battaglene S. Periodic movement and sheltering behaviour of *Actinopyga mauritiana* (Holothuroidae: Aspidochirotidae) in Solomon Island. SPC Beche-de- mer Inf. Bull. 2004; 19: 23-31.
3. Taiyeb-Ali TB, Zainuddin SLA, Swaminathan D, Yaacob H. Efficacy of “Gamadent” toothpaste on the healing of gingival tissues: A preliminary report. J Oral Sci. 2003; 45: 153–159.
4. Conand C. Ecology and reproductive biology of Stichopus variegatus, an Indo-Pacific coral reef sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea). Bull Mar Sci. 1993; 52: 970-81.
5. Bruckner A, Gohnson K, Field J. Conservation strategies for sea cucumbers: Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade. SPC Beche-de-mer Inf. Bull. 2003; 18: 24- 33.
6. Lawrence AJ, Afifi R, Ahmed M, Khalifa S, Paget T. Bioactivity as an options value of sea cucumbers in the Egyptian Red Sea. Con Bio. 2009; 24: 217–225.
7. Mehmet A, Hüseyin S, Bekir T, Yilmaz E, Sevim K. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. Int J Food Sci Tech. 2011; 46: 500–508.
8. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Pérez P, García-Grávalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC Biotech. 2002; 2:17.
9. Bryan PJ, McClintock JB, Marion K, Watts SA, Hopkins TS. Feeding deterrence and chemical defense in echinoderm body wall tissues from the northern Gulf of Mexico. Amer Zool. 1992; 32: 5, 100A.
10. Villasin J, Pomory CM. Antibacterial activity of extracts from the body wall of Parastichopus parvimensis (Echinodermata: Holothuroidea). Fish & Shell Immun. 2000; 10: 465-467.
11. Hawa I, Zulaikah M, Jamaludin M, Zainal Abidin AA, Kaswandi MA, Ridzwan BH. The potential of the coelomic fluid in sea cucumber as an antioxidant. Mal J Nutr. 1999; 5: 55-9.
12. Sugawara T, Zaima N, Yamamoto A, Sakai S, Noguchi R, Hirata T. IIsolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebrosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. Biosci, Biotech Biochem. 2006; 70(12): 2906-12.
13. Ding XZ, Witt R, Tong WG, Li XQ, Betts H, Collin P, Adrian TE. Anti-Pancreatic Cancer Effects of Myristoleic Acid. J Pancre. 2003; 3: 209–69.
14. Chen J. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC Beche-de- mer Inf. Bull. 2003; 18: 18-23.
15. Farouk AEA, Abd F, Ghouse H, Ridzwan BH. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. Amer J Biochem Biotech. 2007; 3(2): 60-5.
16. Munro MHG, Blunt JW, Barns G, Battershill CH, Lake RJ, Perry NB. Biological activity in New Zealand marine organisms. Pure and Appl Chem. 1989; 61(3): 529-34.
17. Kariya Y, Mulloy B, Imai K, Tominaga A, Kaneko T, Asari A, Suzuki K, Masuda H, Kyogashima M, Ishii T. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber Stichopus japonicus and their ability to inhibit osteoclastogenesis. Carb Res. 2004; 339(7): 1339-46.
18. Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Kushmaro A, Loya Y. Antimicrobial activity of Red Sea corals. Mar Biol. 2006; 149: 357-63.
19. Jawahar AT, Nagarajan J, Shanmugam SA. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. Indian J Geo-Mar Sci. 2002; 31: 161–164.
20. Heding SG. Echinoderms of the Iranian Gulf Holothuroidea. Danish Scientific Investigations Iran. 1940; 2: 113–137.
21. Mokhlesi A, Saeidnia S, Gohari AR, Shahverdi AR, Mollazadeh-Moghaddam K, Eshaghi N.

Antibacteria, antifungal and cytotoxic activity of Bohadshia marmorata, a sea cucumber from north coastal of Persian Gulf. Pharmacyonline. 2011; 3: 1029-1038.
22. Jamali S, Emtiyazjoo M, Teymoori Toolabi L, Zeinali S, Keypoor S, Sardari S et al. [Anti-bacterial Natural extracts Persian Gulf sea cucumber *Holothuria* sp. on three strains of *Escherichia coli*]. Modares J of Med Sci: Pathol of Life. 2010; 2: 37-49. (Persian)
23. Diliello LR. Methods in Food and Dairy Microbiology.AVI Publishing Co. Inc. Westport Connt. USA. 1982; 39.
24. Estrada A, Katselis G, Laarveld B, Barl B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. Com Immun, Microb & Infect Dis. 2000; 23: 27-43.
25. McDermott PF, Barry AL, Jones RN, Stein GE, Thornsberry C, Wu CC et al. Standardization of broth micro dilution and disk diffusion susceptibility tests for *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Haemophilus somnus*: quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, tetracycline, tilmicosin, and trimethoprimsulfamethoxazole. J Clin Microbiol. 2001; 39(12): 4283–7.
26. Kumaravel K, Ravichandran S, Balasubramanian T, Siva Subramanian K, Bilal AB. Antimicrobial effect of five seahorse species from the Indian coast. British J Pharm and Toxicol. 2010; 1: 62–66.
27. Franklin TJ, Snow GA. Biochemistry and molecular biology of antimicrobial drug action.6th edition. New York: Springer. 2005; 135.
28. Normark BH, Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Int Med Res. 2002; 252: 91–106.
29. Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. Nat Pro Report. 2009; 21: 1–49.
30. Kuznetsova TA, Anisimov MM, Popov AM, Baranova SI, Afiyatullov SS. IIKe. A comparative study in vitro of physiological activity of triterpene glycosides of marine invertebrates of echinoderm type. Comp. Biochem. Physiol. 1982; 73: 41-43.
31. Yasoda HN, Chi Z, Zhu K. Probiotics and sea cucumber farming.SPC Beche demer Inf Bull. 2006; 24: 458.
32. Mulyndin VA, Kovalev VV. Effects of the Extraction of Internal Organs of the Holothurian Cucumaria japonica on the Indices of Nonspecific Resistance. Russ J Mar Biol. 2001; 27(6): 406-8.
33. Sedov AM, Apollonin AV, Sevastyanova EK. Stimulation of Non-Specific Antibacterial Resistance of Mice Against Conditional Pathogenic Gram-Negative Microorganisms by Triterpene Glycosides. Anti kiiK. 1990; 1: 23–26.
34. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High- value components and bioactives from sea cucumber for functional foods. Mar Drugs. 2011; 9: 1761-1895.
35. Svetashev VI, Levin VS, Lam C, Nga DT. Lipid and Fatty Acid Composition of Holothurians From Tropical and Temperate Waters. Comp. Biochem. Physiol. 1991; 98: 489–494.
36. Vaskovsky, VE, Kostetsky EY, Svetashev VI. Glycolipids of Marine Invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 1970; 34: 163–177.
37. Hamana K, Niitsu M, Samejima K, Matsuzaki S. Novel Tetra mines, Pentamines and Hexamines in Sea Urchin, Sea Cucumber, Sea Squirt and Bivalves. Comp. Biochem. Physiol. 1991; 100: 59–62.
38. Bullock E, Dawson CJ, Carotenoid Pigments of the Holothurian *Psolus fabricii* Dubenet Koren (the *Scarlet psolus*). Comp. Biochem. Physio. 1970; 34. 799–804.
39. Makarieva TN, Stonik VA, Kapustina II. Biosynthetic Studies of Marine Lipids. 42. Biosynthesis of Steroid and Triterpenoid Metabolites in the Sea Cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Steroids. 1993; 58: 508–517.