13 (3) 307-314, Autumn 2021

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Antibacterial activity of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) extracts on *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila*

Banafsheh Payam [1], Mehdi Soltani [2], Mehdi Shamsaie Mehrgan [1*], Houman Rajabi Islami [1], Melika Nazemi [3]

[1]Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
[3]Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Key Words

Sea cucumber
Methanol extract
Antibacterial activity
Lactococcus garvieae
Aeromonas hydrophila

Abstract

Introduction: In the present study investigated the antibacterial activity of the methanol and n-hexane extracts of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* on *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila*.

Materials & Methods: The antibacterial activity was determined using a serial dilution method with concentration 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, and 500 mg/mL methanol and n-hexane extract of gonads and muscle tissue of sea cucumber. Then bacterial samples were added to dilutions, and optical density was recorded at 0 (before bacterial inoculation) after bacterial inoculation, 12 and 24 hours after inoculation. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of the extracts were determined by the pour plate method.

Result: The results showed that the n-hexane hexane extract from gonads and muscle tissue of sea cucumber did not affect MIC and MBC of the mentioned bacteria.

Conclusion: Meanwhile, methanol extract from gonads and muscle tissue of sea cucumber had antibacterial activity against *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila.*

* Corresponding Author's email: m.shamsaie@srbiau.ac.ir

Received: 4 July 2020; Reviewed: 7 September 2020; Revised: 5 October 2020; Accepted: 3 November 2020
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.254363.2387

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) بر باکتری‌های *Lactococcus garvieae* و *Aeromonas hydrophila*

بنفشه پیام[1]، مهدی سلطانی[2]، مهدی شمسایی‌مهرجان[1*]، هومن رجبی‌اسلامی[1]، ملیکا ناظمی[3]

[1] گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[2] گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[3] پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

کلمات کلیدی

خیار دریایی
عصاره متانولی
فعالیت ضدباکتری
خلیج فارس
Lactococcus garvieae
Aeromonas hydrophila

چکیده

مقدمه: تحقیق حاضر به بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های استخراج شده توسط حلال‌های متانول و ان-هگزان از بافت عضله و گناد خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) علیه باکتری‌های *Lactococcus garvieae* و *Aeromonas hydrophila* پرداخت.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضدباکتریایی عصاره متانولی و ان-هگزانی گناد و بافت عضله خیار دریایی با استفاده از روش رقت با غلظت‌های ۷/۸۱، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس نمونه‌های باکتری‌ها به رقت‌ها اضافه گردید و جذب نوری آن‌ها در زمان‌های ۰ (پیش از تلقیح باکتری)، پس از تلقیح باکتری، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تلقیح ثبت گردید. میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) با تهیه پورپلیت از هریک از محیط‌های کشت میکروبی تعیین گردید.

نتایج: نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که عصاره ان-هگزانی استخراج شده از گناد و عضله خیار دریایی تأثیری بر ممانعت رشد و کشندگی بر روی باکتری‌های ذکر شده ندارد.

نتیجه‌گیری و بحث: عصاره متانولی استخراج شده از گناد و عضله خیار دریایی دارای اثر ممانعت کنندگی و کشندگی در دو باکتری لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: m.shamsaie@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۷ شهریور ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۴ مهر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳ آبان ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2020.254363.2387

مقدمه

خیارهای دریایی از شاخه خارپوستان و متعلق به رده خیارسانان هستند که در عرض‌های جغرافیایی مختلف از منطقه بین جزر و مدی تا اعماق دریاها یافت می‌شوند (شادی و عبادی، ۱۳۹۶). آن‌ها دارای بدنی دراز و پوستی چرم مانند با یک غده جنسی شاخه شاخه می‌باشند. خیارهای دریایی از جانوران مهم و مغذی دریایی محسوب شده که برای تهیه انواع دارو و غذا در بخش‌هایی از آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Aydın و همکاران، ۲۰۱۱). تعدادی از گونه‌های خیار دریایی برای مصارف انسانی از محیط آبی تهیه شده و برخی دیگر نیز در مزارع پرورش ماهی تولید می‌شوند (McCauley و همکاران، ۲۰۱۲). این موجودات دارای درصد بالایی از پروتئین بوده و فاقد کلسترول می‌باشند، از ای‌نرو در زمره مواد غذایی انرژی‌زا قرار می‌گیرند. امروزه در سراسر جهان ترکیبات طبیعی به‌عنوان منبع بیولوژیکی از ترکیبات فعال که قادرند فعالیت آنتی‌باکتریال داشته باشند، شناخته می‌شوند (Mokhlesi و همکاران، ۲۰۱۲). منشأ وجود خواص زیستی در عصاره‌های خیار دریایی به حضور ترکیباتی چون ساپونین و تری‌ترپن گلیکوزیدها وابسته است که از جمله محصولات بیولوژیک این جاندار محسوب می‌گردد (Bryan و همکاران، ۱۹۹۲). ازجمله آثار بیولوژیکی شناخته شده خیار دریایی می‌توان به اثرات ضدسرطانی، ضدانعقادی خون، ضدفشارخون، ضدالتهاب، ضد میکروبی، ضدتصلب‌شرائن، ضدتوموری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تسریع در بهبود زخم‌اشاره کرد (James، ۲۰۰۱؛ Kariya و همکاران، ۲۰۰۴؛ Sugawara و همکاران، ۲۰۰۶). گونه‌های بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila*، *Vibrio harveyi*، *Staphylococcus aureus* و *Aspergillus* جداسازی شده از ماهیان نسبت به عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی حساسیت نشان دادند (Bordbar و همکاران، ۲۰۱۱). به‌علاوه Mokhlesi و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی خیار دریایی (*Bohadschia marmorata*) در سواحل شمالی خلیج فارس دریافتند که عصاره استخراج شده از این گونه دارای اثر ضدقارچی می‌باشد. باکتری لاکتوکوکوس گارویه (*Lactococcus garvieae*)، کوکوباسیل گرم مثبت و بدون تحرک با همولیز آلفا می‌باشد که جداسازی آن از بسیاری از گونه‌های ماهی‌ها، حیوانات خشکی‌زی و محصولات غذایی به‌عنوان عامل بیماری لاکتوکوکوزیس گزارش شده است (Ravelo و همکاران، ۲۰۰۳). این باکتری در ماهیان وحشی و پرورشی، در آب‌های شیرین و شور در دمای بالاتر از ۱۵ درجه سانتی‌گراد با بروز سپتی سمی خونریزی دهنده دیده می‌شود (Ture و Altinok، ۲۰۱۶). بیش‌ترین تلفات این باکتری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گزارش شده است (حسینی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Soltani و همکاران، ۲۰۰۸). باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) باکتری گرم منفی، متحرک و فرصت‌طلبی است که عامل سپتی سمی در ماهیان آب‌های شیرین و شور می‌باشد (Janda و همکاران، ۱۹۹۶). این باکتری باعث خونریزی در زیر شکم، اطراف مخرج، باله‌ها، اطراف دهان و همچنین زخم‌هایی در پوست و باله دمی ماهی می‌گردد. در کالبدگشایی، خونریزی‌های نقطه‌ای در اندام‌های داخلی نیز مشاهده شده است (Austin، ۲۰۰۶). امروزه استفاده از محرک‌های ایمنی، ازجمله راه‌های پیشگیری برای کاهش تلفات در مزارع پرورش ماهی و به‌حداقل رساندن مشکلات زیست‌محیطی حاصل از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. هرچند اطلاعات ارزشمندی در خصوص فعالیت‌های خیار دریایی (ضدمیکروبی، ضدقارچی و سیتوتوکسیک) گزارش شده است، اما مطالعات کمی درباره فعالیت زیستی گونه (*Holothuria leucospilota*) در خلیج فارس صورت گرفته است (Mokhlesi و همکاران، ۲۰۱۱). از این‌رو، مطالعه حاضر به بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های استخراج شده توسط حلال‌های متانول و ان-هگزان از عضله و گناد خیار دریایی (*H. leucospilota*) به‌عنوان آنتی‌بیوتیک طبیعی در فعالیت‌های آبزی پروری علیه باکتری‌های *L. garvieae* و *A. hydrophila* پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خیار دریایی (*H. leucospilota*) با اندازه متوسط ۱۱ تا ۱۳ سانتی‌متر در شهریورماه سال ۱۳۹۵ از اطراف جزیره لارک و در عمق ۳۰ متری جمع‌آوری و به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای مشخص نمودن رده‌بندی خیار دریایی در حد جنس و گونه، ویژگی‌های ظاهری خیارهای دریایی صید شده بررسی و با کلید شناسایی Purcell و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داده شدند تا جنس و گونه نمونه مورد نظر مشخص و تأیید گردید.

عصاره‌گیری: پاکسازی خیارهای دریایی از طریق تخلیه حفره شکمی با برشی از مخرج به سمت دهان پس از خروج از فریزر و انجمادزدایی صورت گرفت. سپس بخش‌های دیواره و گناد به‌صورت جداگانه به قطعات کوچک خرد شدند. سپس، نمونه‌ها در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ روز باقی ماندند تا کاملاً خشک شدند. نمونه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه خردکن (Worldstar, Germany) خرد شده و در ادامه توسط هاون به‌صورت پودر درآمدند. پودر آماده شده با دو حلال ان-هگزان و متانول (Merck, Darmstadt, Germany) سوکسله شد. نمونه‌های حاصل از حلال متانول و ان-هگزان پس از تبخیر در شرایط خلأ با آب مقطر به‌صورت هم حجم

مخلوط شدند. محلول به‌دست آمده برای جداسازی هریک از حلال‌ها، دکانته شد، سپس محلول‌های حاصل برای حذف حلال‌ها تحت خلأ قرار گرفتند (Farjami و همکاران، ۲۰۱۳). عصاره‌های ان-هگزان و متانولی عضله و گناد خیار دریایی برای انجام تست ضدباکتریایی به آزمایشگاه داروسازی پویش منتقل شدند.

تعیین اثر ضدباکتری: استوک‌هایی با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از ۲ عصاره موجود برای هر سری از رقت‌ها تهیه گردید. برای ساختن محلول عصاره از دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده شد. محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) (Merck, Darmstadt, Germany) در آب مقطر بر روی شعله تکان داده و حرارت داده شد تا زمانی‌که رنگ محیط شفاف گردید. دامنه غلظت هر کدام از عصاره‌ها از ۵۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر شروع شده و به ۷/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر خاتمه یافت. سپس چهار میلی‌لیتر از آن در لوله استریل ریخته شد. برای رسیدن به غلظت‌های کم‌تر برای هر عصاره ابتدا به وسیله محیط کشت (TSB)، ۷ رقت ۷/۸۱، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌روش رقت‌سازی متوالی (serial dilution) تهیه گردید. تعداد نمونه‌های تهیه شده ۸ سری با ۹ لوله آزمایش با سه تکرار برای سویه‌های باکتری‌استاندارد مورد بررسی که در این تحقیق آئروموناس هیدروفیلا (ATCC201535) و لاکتوکوکوس گارویه (ATCC918779) از بانک میکروبی دانشگاه دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. بعد از کشت خطی، باکتری‌ها در انکوباتور به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا از کلنی‌های تک برای انجام آزمایش استفاده گردد. سپس عصاره‌های استخراج شده از عضله دیواره بدن و گناد خیار دریایی که با استفاده از دو حلال متانول و ان-هگزان تهیه شده‌بودند به باکتری‌ها اضافه گردید (Adibpour و همکاران، ۲۰۱۴).

حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration): تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) با استفاده از روش رقیق‌سازی محیط کشت انجام شد. بدین‌منظور، از ۹ لوله آزمایش استریل (۳ تیمار به‌همراه ۳ تکرار) شامل (اولین لوله آزمایش فاقد محیط کشت، دومین لوله آزمایش حاوی عصاره و باکتری و سومین لوله آزمایش حاوی محیط کشت و باکتری) برای هر عصاره استفاده گردید. داخل هر لوله ۲ سی‌سی محیط کشت استریل ریخته شد، سپس برای رسیدن به رقت‌های مورد اشاره از لوله استوک (اولین لوله حاوی عصاره) دو سی‌سی به لوله دوم و از لوله دوم دو سی‌سی به لوله سوم و به‌همین ترتیب تا لوله هفتم عصاره رقیق شد و دو سی‌سی از لوله آخر خارج گردید. بدین‌ترتیب حجم تمامی لوله‌ها دو سی‌سی بود و رقت‌های آن‌ها به‌ترتیب ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲، ۰/۰۶، ۰/۰۳، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۷ بود. اولین لوله آزمایش به‌عنوان لوله صفر برای ارزیابی عملکرد عصاره خالص و لوله آخر تنها حاوی محیط کشت به‌منظور صحه گذاری بر عملکرد محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، جذب نوری (OD) هر لوله آزمایش در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد. سپس بلافاصله از هر یک از باکتری‌ها با کدورت نیم مک فارلند به میزان ۱۰ میکرولیتر به دامنه غلظت عصاره‌ها اضافه گردید و جذب نوری (OD) هر لوله ثبت شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند و هر ۱۲ ساعت جذب نوری (OD) آن‌ها ثبت گردید. پس از آن از هر لوله کشت‌میکروبی (pour plate) به‌عمل آمد (Soltani و همکاران، ۲۰۱۴).

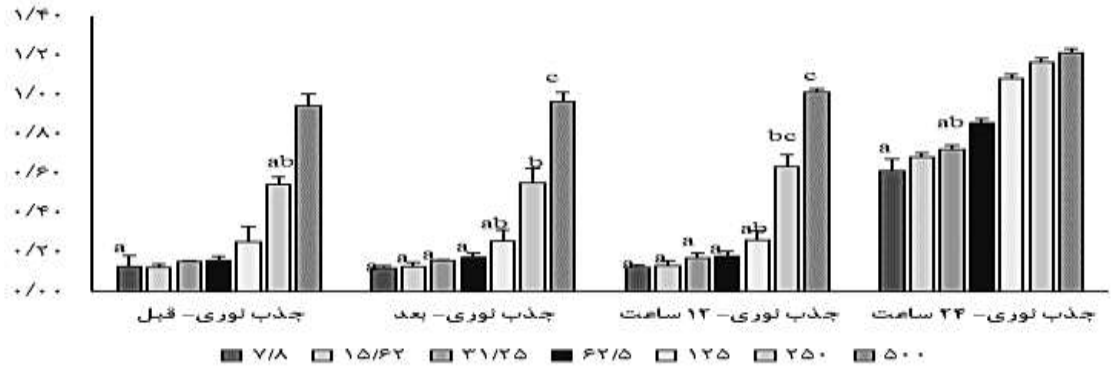
حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration): نمونه‌هایی که در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) رشد نداشتند، روی محیط کشت تریپتیک سویا آگار (Merck, Darmstadt, Germany)(TSA) کشت داده شدند. پلیتی که ۹۹/۹ درصد از تلقیح اولیه باکتری کم شده بود و یا رشدی به اندازه ۰/۱ درصد تلقیح اولیه داشت، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که تعداد دفعات تکرار آزمایش سه مرتبه بود (Soltani و همکاران، ۲۰۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری: ابتدا داده‌های به‌دست‌آمده‌از مشاهدات آزمایشگاهی به‌منظور دسته‌بندی داده‌ها در نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ مرتب شد. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov موردارزیابی قرارگرفت و با استفاده از واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA)، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها نیز توسط آزمون Tukey در سطح ۵ درصد انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ صورت گرفت.

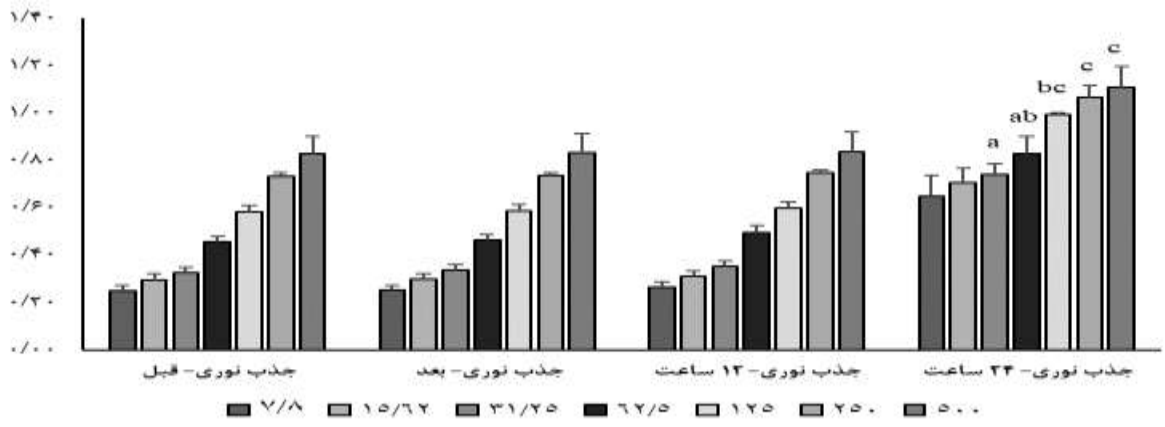
نتایج

نتایج حاصل از بررسی اثر ضدباکتریایی عصاره هگزانی عضله در خیار دریایی (*H. leucospilota*) تفاوت معنی‌داری را در زمان‌های مختلف در بین تیمارهای آزمایش نشان داد ($p<۰/۰۵$). میزان جذب نوری (OD) در غلظت ۵۰۰ در تمامی مقاطع زمانی بیش‌تر از سایر غلظت‌ها بود. هم‌چنین جذب نوری (OD) عصاره هگزانی عضله خیار دریایی پس از گذشت ۲۴ ساعت نسبت به زمان پیش از تلقیح باکتری آئروموناس هیدروفیلا افزایش نشان داد (شکل ۱). بررسی اثر عصاره هگزانی گناد خیاردریایی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیانگر تفاوت

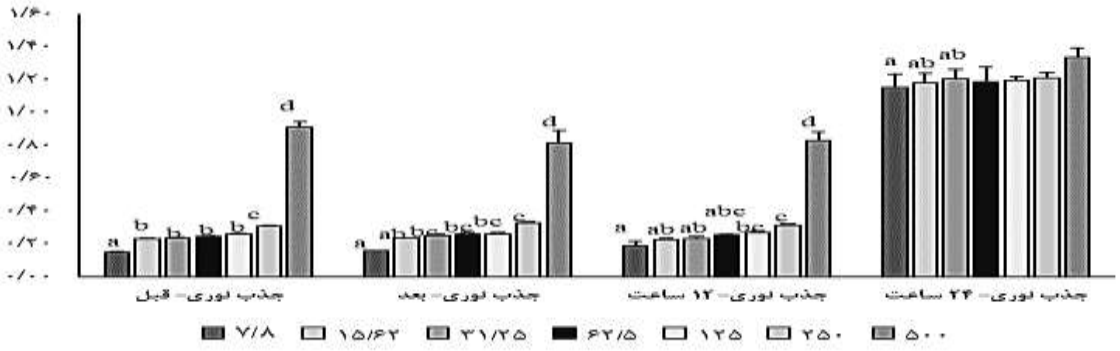
معنی‌دار در غلظت‌های مختلف پس از ۲۴ ساعت از تلقیح باکتری بود ($p<0/05$)، به‌طوری‌که کم‌ترین و بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) به‌ترتیب در غلظت ۷/۸ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۲). اثر عصاره هگزانی عضله و گناد خیار دریایی (*H. leucospilota*) بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه بیانگر تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف و در زمان‌های متفاوت بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میزان جذب نوری (OD) در تمامی مقاطع زمانی به‌ترتیب در غلظت ۵۰۰ و ۷/۸ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۳ و ۴). اثر عصاره متانولی عضله خیاردریایی (*H. leucospilota*) بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا نشان داد که تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در زمان‌های متفاوت وجود دارد ($p<0/05$). کم‌ترین و بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) پس از ۲۴ ساعت از تلقیح باکتری به‌ترتیب در تیمارهای ۶۲/۵ میلی‌گرم‌درلیتر(۰/۰۷±۰/۴۵)و ۵۰۰ میلی‌گرم‌در لیتر(۰/۰۸±۲/۳۵) مشاهده شد (شکل ۵). بررسی اثر عصاره متانولی گناد خیاردریایی (*H. leucospilota*) بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا نتایج مشابهی با اثر عصاره متانولی عضله خیاردریایی بر این باکتری نشان داد، به‌طوری که کم‌ترین و بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) پس از ۲۴ ساعت از تلقیح باکتری به‌ترتیب در تیمارهای ۶۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (شکل ۶). تفاوت معنی‌داری در میزان غلظت‌های مختلف عضله خیار دریایی (*H. leucospilota*) بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه در زمان‌های مختلف مشاهده شد ($p<0/05$). بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌میزان (۰/۲۵±۲/۴۰) در زمان پس از تلقیح باکتری مشاهده شد. هم‌چنین بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) در تمامی مقاطع زمانی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۷). بررسی اثر عصاره متانولی گناد خیاردریایی (*H. leucospilota*) بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف در تمامی مقاطع زمانی آزمایش بود ($p<0/05$). بیش‌ترین میزان جذب نوری (OD) پس از ۲۴ ساعت از تلقیح باکتری در غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به میزان (۰/۱۳±۱/۶۰) مشاهده شد و کم‌ترین میزان جذب نوری (OD) در این بازه زمانی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به میزان (۰/۰۸±۰/۹۲) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نشان نداد (شکل ۸).



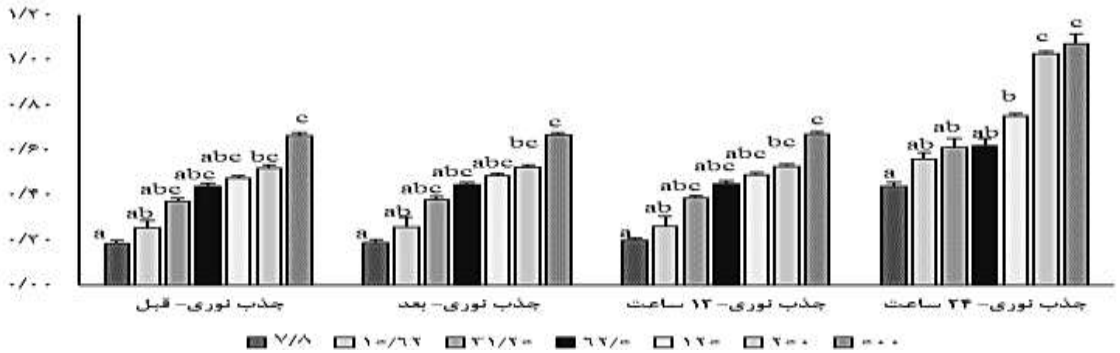
شکل ۱: اثر عصاره هگزانی عضله خیاردریایی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا



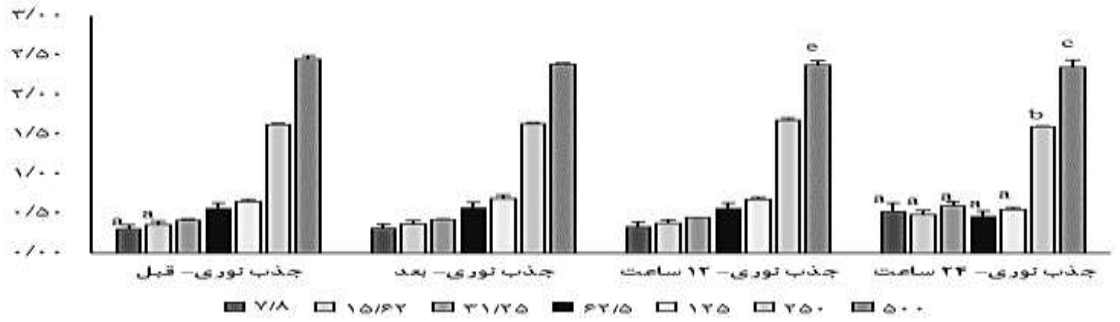
شکل ۲: اثر عصاره هگزانی گناد خیاردریایی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا



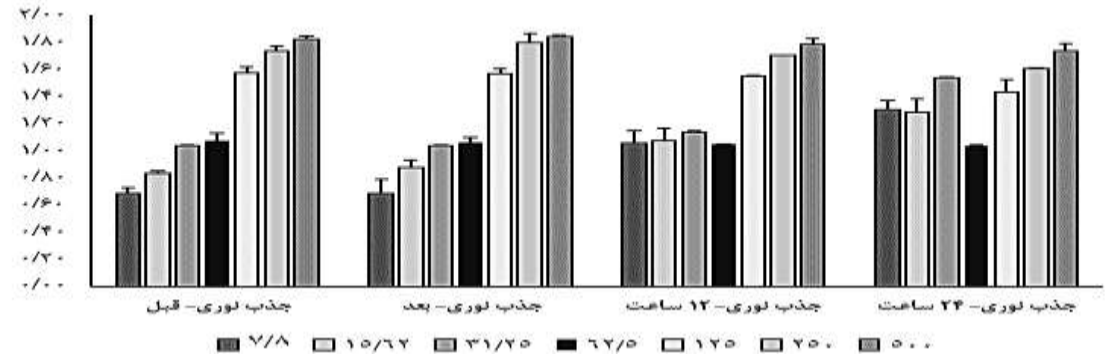
شکل ۳: اثر عصاره هگزانی عضله خیاردریایی بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه



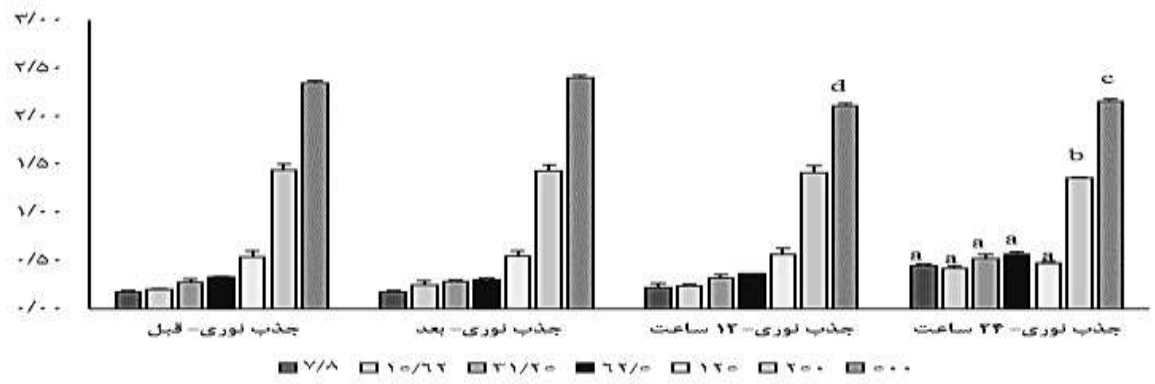
شکل ۴: اثر عصاره هگزانی گناد خیاردریایی بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه



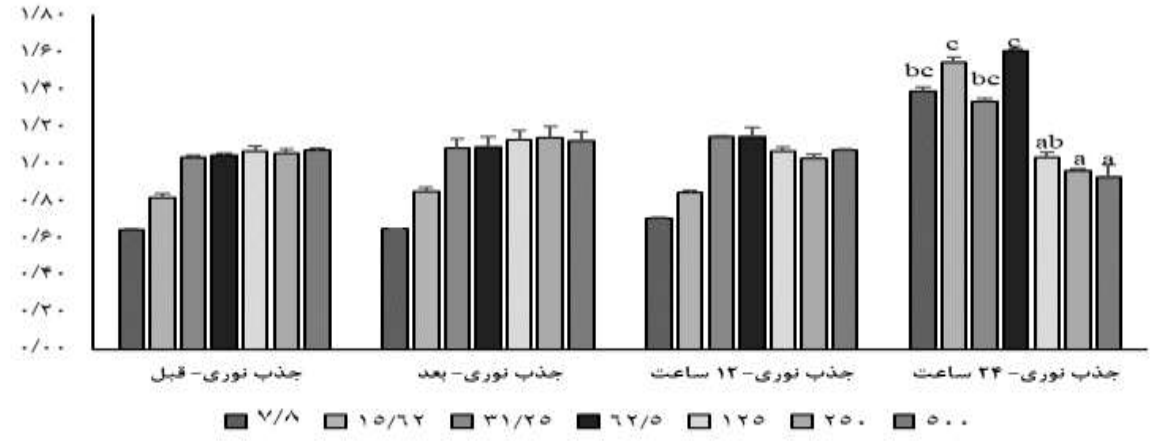
شکل ۵: اثر عصاره متانولی عضله خیاردریایی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا



شکل ۶: اثر عصاره متانولی گناد خیاردریایی بر باکتری آئروموناس هیدروفیلا



شکل ۷: اثر عصاره متانولی عضله خیاردریایی بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه



شکل ۸: اثر عصاره متانولی گناد خیاردریایی بر باکتری لاکتوکوکوس گارویه

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC): حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی در هیچ‌یک از غلظت‌های تهیه شده‌ازعصاره‌های‌هگزانی گناد و عضله خیار دریایی (*H. leucospilota*) بر علیه دو باکتری *L. garvieae* و *A. hydrophila* مشاهده نگردید (جدول ۱). عصاره‌های متانولی گناد و عضله خیار دریایی بر باکتری (*L. garvieae*) اثر بازدارندگی و کشندگی مشابهی‌داشتند، به‌طوری‌که غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر اثر بازدارندگی و غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر اثر کشندگی را نشان دادند. هم‌چنین عصاره‌های متانولی گناد و عضله خیاردریایی اثر بازدارندگی و کشندگی‌مشابهی بر علیه باکتری (*A. hydrophila*) نشان دادند. حداقل غلظت بازدارندگی در این دو عصاره در غلظت ۶۲/۵ میلی‌گرم در لیتر و اثر ممانعت کنندگی در غلظت‌های ۱۲۵ مشاهده شد.

جدول ۱: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) عصاره‌های مختلف خیاردریایی بر باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا و لاکتوکوکوس گارویه

عصاره	اندام	باکتری	MIC	MBC
هگزان	گناد	*L. garvieae*	-	-
هگزان	گناد	*A. hydrophila*	-	-
هگزان	عضله	*L. garvieae*	-	-
هگزان	عضله	*A. hydrophila*	-	-
متانول	گناد	*L. garvieae*	۱۲۵	۲۵۰
متانول	گناد	*A. hydrophila*	۶۲/۵	۱۲۵
متانول	عضله	*L. garvieae*	۱۲۵	۲۵۰
متانول	عضله	*A. hydrophila*	۶۲/۵	۱۲۵

بحث

بررسی اثرات ضداکتریایی عصاره‌های متانولی و هگزانی استخراج شده از دیواره عضله و گناد خیار دریایی بر باکتری‌های لاکتوکوکوس گارویه (*L. garvieae*) و آئروموناس هیدروفیلا (*A. hydrophila*) در این تحقیق نشان داد که میزان جذب نوری (OD) گرفته شده از تیمارهای آزمایش پیش از تلقیح باکتری نیز دارای تفاوت معنی‌داری می‌باشد، که علت آن می‌تواند غلظت‌های مختلف عصاره‌های هگزانی و متانولی استخراجی از خیار دریایی باشد. به‌علاوه میزان جذب نوری (OD) در عصاره‌های هگزانی استخراج شده از گناد و عضله خیار دریایی علیه باکتری‌های *L. garvieae* و *A. hydrophila* پس از گذشت ۲۴ ساعت افزایش نشان داد، که این افزایش میزان جذب نوری (OD) بیانگر رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها بود. درصورتی‌که، میزان جذب نوری (OD) عصاره‌های متانولی گناد و عضله خیار دریایی بر علیه باکتری *L. garvieae* در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و عصاره‌های متانولی گناد و عضله خیار دریایی بر علیه باکتری *A. hydrophila* در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ کاهش یافت. نتایج به‌دست آمده از کشت باکتری‌ها تیز در تحقیق حاضر نشان داد که عصاره هگزانی استخراج شده از گناد و عضله خیار دریایی تأثیری بر ممانعت رشد و کشندگی بر روی باکتری‌های ذکر شده ندارد. درحالی‌که، عصاره متانولی استخراج شده از گناد و عضله خیار دریایی دارای اثر ممانعت کنندگی و کشندگی در دو باکتری لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت که متانول، حلال مناسبی برای حلالیت مواد فعال زیستی موجود در خیار دریایی (*H. leucospilota*) است. نتایج حاصل از تحقیق ناظمی و همکاران (۱۳۹۵) نیز مشابه نتایج تحقیق حاضر بود، به‌طوری‌که عصاره متانولی استخراج شده از خیار دریایی (*H. leucospilota*) دارای اثر باکتریواستاتیک نسبت به باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و *Serratia marcescens* بود. هم‌چنین Villason و Pomory (۲۰۰۰) با بررسی اثر عصاره متانولی-استونی استخراج شده از دیواره بدن خیاردریایی (*Parastichopus parvimensis*) بیان کردند که این عصاره اثر ضد باکتریایی بر باکتری‌های *E. coli* و *Bacillus subtilis* دارد. Mokhlesi و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی عصاره‌های خیارهای دریایی (*H. leucospilota*) دریافتند که عصاره‌های متانولی و متانولی-آبی دارای اثر مهارکنندگی قوی و بیش‌ترین میزان فعالیت سمیت بود. Shakouri و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان کردند که غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره آبی-متانولی استخراج شده از خیار دریایی (*H. leucospilota*) اثر مهارکنندگی در رشد باکتری‌های *Staphylococcus epidermidis*، *Proteus vulgaris*، *Shigella dysenteriae* و *E. coli* دارد. هم‌چنین عصاره‌های اتانولی و متانولی استخراج شده از خیار دریایی *Holothuria parva* فعالیت مهاری و کشندگی باکتری‌های *E. coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Enterococcus fecalis* را نشان داد (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۱۸). مطالعات داروشناسی و شیمیایی بر روی گونه‌های مختلف خیار دریایی بیانگر حضور گلیکوزیدهای تریترپنی با خواص ضدقارچی، ضدباکتریایی و سیتوتوکسیک می‌باشد (Mulyndin و Kovalev، ۲۰۰۱؛ Kiani و همکاران، ۲۰۱۴؛ Shi و همکاران، ۲۰۱۶). تحقیقات مختلف نشان داده است که عامل اصلی وجود این خواص در خیار دریایی، حضور مواد زیست فعالی مانند ساپونین‌ها، کندروتین سولفات، گلیکوزآمینوگلیکان، پلی‌ساکاریدهای سولفاته، گلیکوپروتئین‌ها، گلیکواسفنگولیپید و اسیدهای چرب ضروری می‌باشد (Bordbar و همکاران، ۲۰۱۱؛ Patar و همکاران، ۲۰۱۲). هم‌چنین Sedov و همکاران (۱۹۹۰) افزایش تولید آنتی‌بادی‌ها، اثربخشی واکسن‌ها و هم‌چنین افزایش مقاومت ضدباکتری موش در مقابل عوامل بیماری‌زای جنس‌های *Escherichia*، *Proteus* و *Salmonella* را به حضور ترکیبات گلیکوزیدهای تریترپنی نسبت داده‌اند. مکانیسم اثر عصاره‌های خیار دریایی ممکن است به‌علت تأثیر عصاره بر روی دیواره و غشای باکتری‌ها باشد که با کاهش عمل ممانعت‌کنندگی موجب نفوذ عصاره به‌داخل سلول باکتری و در نتیجه متلاشی شدن آن گردد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره‌های استخراج شده توسط حلال متانول دارای اثر ضد باکتریایی می‌باشد به نحوی که ترکیبات بیولوژیکی مؤثر در عصاره خیار دریایی (*H. leucospilota*) توانسته‌اند با عبور از غشای باکتری‌های *L. garvieae* و *A. hydrophila* یا تخریب غشاء به اندام‌های حساس باکتری آسیب رسانده و موجب عدم رشد و در نهایت مرگ باکتری شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از آقای دکتر امینی (رئیس اداره شیلات بندر دیر) که در انجام آزمایش‌ها همکاری نمودند، تشکر می‌نمایند.

منابع

۱. **شادی، ا. و عبادی، خ.، ۱۳۹۶.** مقایسه ویژگی ضد اکسیدانی بافت تر و خشک خیار دریایی *Holothuria leucospilota*. فصلنامه محیط زیست جانوری. دور ۱۰، شماره ۳، صفحات ۴۷۱ تا ۴۷۶.

۲. **حسینی، ص.؛ سلطانی، م.؛ حیدری، م.؛ مسعودی، م. و پورمعافی‌اصفهانی، ا.، ۱۳۹۴.** تاثیر فعالیت ضدباکتریایی عصاره

جفت میوه بلوط (*Quercus brantii var.persica*) بر رشد لاکتوکوکوس گارویه در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۷، شماره ۴، صفحات ۱۶۵ تا ۱۷۲.

۳. **ناظمی، م.؛ مرادی، ی.؛ گذری، م.؛ لکزایی، ف. و کریم‌پور، م.، ۱۳۹۵.** بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و آبی دیواره بدن خیاردریایی گونه *Holothuria leucospilota* روی برخی باکتری‌های بیماریزای انسانی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان. دوره ۲۳، شماره ۱، صفحات ۷۵ تا ۸۲.

4. **Adibpour, N.; Nasr, F.; Nematpour, F.; Shakouri, A. and Ameri, A., 2014.** Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea. Jundishapur J. Microbiol. Vol. 7, pp: 1-4.

5. **Austin, B., 2006.** The bacterial microflora of fish revised. Sci. World. J. Vol. 6, pp: 931-945.

6. **Aydın, M.; Sevgili, H.; Tufan, B.; Emre, Y. and Köse, S., 2011.** Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. Int. J. Food. Sci. Tech. Vol. 4, pp: 500-508.

7. **Bordbar, S.; Anwar, F. and Saari, N., 2011.** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. Mar. Drugs. Vol. 9, pp: 1761-1805.

8. **Bryan, P.; McClintock, J.; Marion, K.; Watts, S. and Hopkins, T., 1992.** Feeding deterrence and chemical defense in echinoderm body wall tissues from the Northern Gulf of Mexico. Amer. Zool. Vol. 32, pp: 100A.

9. **Ebrahimi, H.; Vazirizadeh, A.; Nabipour, I.; Najafi, A.; Tajbakhsh, S. and Nafisi Bahabadi, M., 2018.** In vitro study of antibacterial activities of ethanol, methanol and acetone extracts from sea cucumber *Holothuria parva*. Iran. J. Fish. Sci. Vol. 17, pp: 542-551.

10. **Farjami, B.; Nematollahi, M.A.; Moradi, Y.; Irajian, Gh.R.; Nazemi, M.; Ardebili, A. and Pournajaf, A., 2013.** Antibacterial activity of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. Int. J. Mol. Microbiol. Vol. 3, pp: 225-230.

11. **James, D.B., 2001.** Twenty sea cucumbers from seas around India, Naga. The ICLARM Quarterly. Vol. 24, pp: 4-9.

12. **Janda, J.M.; Abboh, S.L.; Khashe, S.; Kellogg, G.H. and Shimada, T., 1996.** Biochemical characteristics and serological properties of the genus *Aeromonas*. J. Clin. Microbiol. Vol. 34, pp: 1930-1983.

13. **Kariya, Y.; Mulloy, B.; Imai, K.; Tominaga, A.; Kaneko, T.; Asari, A.; Suzuki, K.; Masuda, H.; Kyogashima, M. and Ishii, T., 2004.** Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. Carbohydr. Res. Vol. 339, pp: 1339-1346.

14. **Kiani, N.; Heidari, B.; Rassa, M.; Kadkhodazadeh, M. and Heidari, B., 2014.** Antibacterial activity of the body walls extracts of sea cucumber (Invertebrata; Echinodermata) on infectious oral streptococci. J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. Vol. 25, pp: 367-373.

15. **McCauley, B.S.; Wright, E.P.; Exner, C.; Kitazawa, Ch. and Hinman, V.F., 2012.** Development of an embryonic skeletogenic mesenchyme lineage in a sea cucumber reveals the trajectory of change for the evolution of novel structures in echinoderms. McCauley et al. EvoDevo, Vol. 3, pp: 17.

16. **Mokhlesi, A.; Saeidnia, S.; Gohari, A. R.; Shahverdi, A.R.; MollazadehMoghaddam, K. and Eshaghi, N., 2011.** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activity of *Bohadschia marmorata*, a sea cucumber from north coastal of Persian Gulf. Pharmacologyonline, Vol. 3, pp: 1029-1038.

17. **Mokhlesi, A.; Saeidnia, S.; Gohari, A. R.; Shahverdi, A.R.; Nasrolahi, A.; Farahani, F.; Khoshnood, R. and Es`haghi, N., 2012.** Biological Activities of the Sea Cucumber *Holothuria leucospilota.* Asian. J. Anim. Vet. Adv. Vol. 7, pp: 243-249.

18. **Mulyndin, V.A. and Kovalev, V.V., 2001.** Effects of the Extraction of Internal Organs of the Holothurian *Cucumaria japonica* on the Indices of Nonspecific Resistance. Russ J Marin Biology. Vol. 27, pp: 406-408.

19. **Patar, A.; Jamalullail, S.M.S.S.; Jaafar, H. and Abdullah, J.M., 2012.** Analysis of sea cucumber body wall extracts from Perhentian stichopus variegatus species using gas chromatography mass spectrophotometry. Eur. J. Res. Vol. 68, pp: 54-59.

20. **Purcell, S.W.; Samyn, Y. and Conand, C., 2012.** Commercially important sea cucumbers of the world. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6. Rome, 150 P.

21. **Ravelo, C.; Magarin˜os, B.; Lo´pezRomalde, S.; Toranzo, A.E. and Romalde, J.L., 2003.** Molecular fingerprinting of fish-pathogenic *Lactococcus garvieae* strains by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. Vol. 41, pp: 751-756.

22. **Sedov, A.M.; Apollonin, A.V.; Sevastyanova, E.K.; Alekseeva, I.A.; Batrakov, S.G.; Batrakov, S.G.; Sakandelidze, O.G.; Likhoded, V.G.; Stonik, V.A.; Avilov, S.A. and Kupera, V.V., 1990.** *Holothurian triterpene* glycoside stimulation of non-specific antibacterial resistance of mice to opportunistic gram-negative microorganisms. Antibiot. Khimioter. Vol. 35, pp: 23-26.

23. **Shakouri, A.; Nematpour, F.; Adibpour, N. and Ameri, A., 2014.** The investigation of anti-bacterial activity of *Holothuria Leucospilota* sea cucumber extracts (body wall, guts and white strings) at chabahar bay in Oman sea. E. S. P. G. Vol. 1, pp: 135-140.

24. **Shi, S.; Feng, W.; Hu, S.; Liang, S.; An, N. and Mao, Y., 2016.** Bioactive compounds of sea cucumbers and their therapeutic effects. Chin. J. Oceanol. and Limn. Vol. 34, pp: 549-558.

25. **Soltani, M.; Nikbatht, G.H.; Mousavi, H. and Ahmadzadeh, N., 2008.** Epizootic outbreak of lactococcosis caused by *Lactococcus garvieae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol. Vol. 28, pp: 209-214.

26. **Soltani, M.; Mohamadian, S.; Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A.; Mirzargar, S.; Taheri Mirghaed, A.; Rouholahi, Sh. and Ghodratnama, M., 2014.** Shirazi thyme (*Zataria multiflora*) essential oil suppresses the expression of the epsD capsule gene *in Lactococcus garvieae*, the cause of lactococcosis in farmed fish. Aquaculture. Vol. 433, pp: 143-147.

27. **Sugawara, T.; Zaima, N.; Yamamoto, A.; Sakai, S.; Noguchi, R. and Hirata, T., 2006.** Isolation of sphingoid bases of sea cucumber cerebrosides and their cytotoxicity against human colon cancer cells. Biosci. Biotechnol. Biochem. Vol. 70, pp: 2906-2912.

28. **Ture, M. and Altinok, I., 2016.** Detection of putative virulence genes of *Lactococcus garvieae*. Dis. Aquat. Org. Vol. 119, pp: 59-66.

29. **Villason, J. and Pomory, C.M., 2000.** Antibacterial activity of extracts from the body wall of *Parastichopus parvimensis* (Echinodermata: Holothuroidea). Fish. Shellfish. Immunol. Vol. 10, pp: 465-467.