مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۲: از ۳۷-۴۹
تابستان ۱۳۸۸

اثر ضد باکتریایی عصاره‌های طبیعی خیار دریایی خلیج فارس *Holoturia. SP* بر سه سویه از باکتری اشرشیاکلی

سمیه جمالی[۱]، مژگان امتیازجو[۲*]، لادن تیموری‌طولابی[۳]، سیروس زینلی[۴]، سپیده کی‌پور[۵]، سروش سرداری[۶]، علی رمضانی[۷]، پریسا آزرنگ[۸]

۱- کارشناس ارشد، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۱-کارشناس گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه پزشکی مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۵- کارشناس ارشد، گروه بیولوژی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۶- استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۷- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۸- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۲/۲۹ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۵/۰۵

چکیده

هدف: استفاده غذایی و پزشکی خیار دریایی دارای قدمت بالایی است. آثار ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری آن در مطالعات نشان داده شده است.

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی چهار عصاره به‌دست آمده از خیار دریایی *Holoturia. SP* جمع‌آوری شده از سواحل جزیره هنگام در خلیج فارس است.

مواد و روش‌ها: عصاره‌های متانولی، هگزانی، آبی و کلروفرمی از بافت دیواره بدن خیار دریایی استخراج شد که آثار ضد باکتریایی این عصاره‌ها بر سه سویه TG1، K12 و TOP 10 F′ از باکتری‌های اشرشیاکلی با استفاده از دو روش سنجش باکتریایی انتشار دیسک و ریزرقیق‌سازی محیط کشت آزمایش شد.

نتایج: مهار رشد در تمامی سویه‌های بررسی شده در غلظت‌های ۰/۷۸ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی، هگزانی و کلروفرمی نشان داده شد. از میان این عصاره‌ها تنها عصاره متانولی و کلروفرمی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب باعث مرگ سویه‌های باکتریایی K12 و TG1 شدند. عصاره آبی نیز در هر سه سویه دارای اثر القاکنندگی بر رشد باکتری بوده است.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که خیار دریایی را می‌توان به‌عنوان یک منبع از ترکیباتی با توان ضد باکتریایی معرفی نمود که این ترکیبات می‌توانند کاندیدای مناسبی برای ساخت ترکیبات دارویی-پزشکی و آنتی‌بیوتیک‌ها باشند.

کلیدواژگان: ضد باکتریایی، خیار دریایی، انتشار دیسک، ریزرقیق‌سازی محیط کشت

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه بیولوژی دریا، صندوق پستی: ۱۸۱-۱۹۷۳۵
Email: moz_emtyazjoo@yahoo.com

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

۱- مقدمه

اقیانوس‌ها با عنوان مبدأ و خاستگاه زندگی و منبع و سرچشمه ترکیبات طبیعی هستند که این ترکیبات در موجودات مختلف انباشته شده است. ترکیبات طبیعی موجود در جانداران دریایی را می‌توان به‌عنوان 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 (Cnidaria)، خرچنگ‌ها، تونیکت‌ها (Tunicata)، بریوزون‌ها (Bryozoans)، خارپوستان (Echinodermata)، ماهیان و اسفنج‌ها جداسازی نموده‌اند [۱، ۲].

خیار دریایی (Sea cucumbers) جانوری با پوسته پوشیده شده از خار است و در شاخه خارپوستان، رده خیارسانان (Holothuroidea) قرار می‌گیرد. این موجود از جمله بی‌مهرگانی است که استفاده‌های سنتی، پزشکی و تغذیه‌ای از آن دارای قدمت بالایی است [۳]. چینی‌ها از نخستین مردمانی بودند که از خیار دریایی برای تغذیه استفاده نمودند، ژاپنی‌ها و کره‌ای‌ها نیز خیار دریایی آپوستیکوپوس جاپانیکوس (*Apostichopus japanicus*) را به‌صورت تازه مصرف می‌نمایند [٤]. خیار دریایی دارای درصد بالایی از پروتئین و البته فاقد کلسترول است و در زمره مواد غذایی نیروبخش نیز قرار می‌گیرد [۵]. در تحقیقاتی که اخیراً روی عصاره‌ها و ترکیبات به‌دست آمده از خیار دریایی صورت گرفته است، خواص سیتوتوکسیسیتی [٦، ۷] و آنتی اکسیدانی [۸]، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد سرطانی [٤، ۹] آن به اثبات رسیده است [۱۰-۱۳].

تأثیر ضد باکتریایی عصاره‌های به‌دست آمده از قسمت‌های مختلف بدن و تخم‌های خیار دریایی در پژوهش‌های بسیاری به اثبات رسیده است. در بررسی‌های انجام شده بر ترکیبات به‌دست آمده از سامانه گوارشی، غدد جنسی، ماهیچه و غدد تولیدمثلی و دیگر قسمت‌های بدن خیار دریایی کوکوماریا فروندوزا (*Cucumaria frondosa*)، علاوه بر اثرهای ضد باکتریایی، اثر آنتی اکسیدانی این عصاره‌ها نیز نشان داده شده است [٦، ۷].

هدف از انجام این مطالعه، بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی *Holoturia. SP* به‌دست آمده از سواحل خلیج فارس بر سه سویه باکتری اشرشیاکلی (*Escherichia coli*) با استفاده از دو روش آزمون انتشار دیسک (Disc Diffusion) و ریزرقیق‌سازی محیط کشت (Broth Microdilution tests) است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری

نمونه‌های خیار دریایی با اندازه ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر در آبان ماه سال ۱۳۸٦ از سواحل مرجانی جزیره هنگام در فاصله ۱/٤ مایلی (۱۳۸۹ متری) جنوب شرقی جزیره قشم در خلیج فارس جمع‌آوری و سپس به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شستشو با آب مقطر و پاک‌سازی در آزمایشگاه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد.

۲-۲- تعیین جنس خیار دریایی

برای مشخص نمودن رده‌بندی خیار دریایی در حد جنس و گونه بر مبنای اسیکل‌های (Scales) حاضر در پوست، ابتدا تکه‌ای از بافت اپیدرمی نمونه خیار دریایی با ضخامت ۱ میلی‌متر و مساحت ۱×۱ سانتی‌متر مربع به‌وسیله اسکالپل (Scalpel) برش داده شد و در یک فالکون (Phalcon) حاوی٦ تا ۷ میلی‌لیتر مایع سفیدکننده قرار گرفت. پس از گذشت حدود ۲۰ دقیقه، رسوب سفید رنگی در انتهای فالکون جمع شد که همان اسیکل‌ها هستند. با کمک پیپت پاستور یک قطره از این رسوب را روی لام آزمایشگاهی قرار داده و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی و با لنز ۱۰ و ٤۰ مشاهده شد. طرح اسیکل‌های مشاهده شده با کلید شناسایی FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation) مطابقت داده شد تا جنس نمونه مورد نظر مشخص شود [۱۳].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

۲-۳- عصاره‌گیری

خیارهای دریایی از مخرج به سمت دهان برش داده شدند و محتویات حفره شکمی نمونه‌ها خارج شد. سپس هریک از بافت‌های ماهیچه‌ای به قطعات کوچک برش داده شدند. این بافت به نسبت ۱ میلی‌لیتر آب مقطر با ٤ گرم بافت در ظرف استریل حاوی متانول ۹٦ درصد ریخته شد و برای مدت یک هفته در دمای محیط آزمایشگاه قرار گرفت و بعد از این مدت محلول از کاغذ صافی عبور داده شد. در حدود ۲۰۰ سی‌سی از عصاره خام متانولی در دمای اتاق در دستگاه روتاری (Rotary evaporation) در شرایط خلاء تبخیر شد. سپس این عصاره متانولی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

۲۰۰ سی‌سی دیگر از عصاره خام متانولی را با ۲۰۰ سی‌سی کلروفرم در ظرفی دیگر ریخته که بعد از گذشت چند دقیقه دو بخش جداگانه را تشکیل دادند. بعد از ۳ روز بخش کلروفرم جدا شد و در شرایط خلاء تبخیر شد. عصاره کلروفرمی به‌دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. عصاره هگزانی نیز در شرایط مشابه عصاره کلروفرمی تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد.

در حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت دیواره بدن خیار دریایی با نسبت ۱:۲ با آب مقطر برای مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه همگن کننده (Homogenizer) قرار داده شد تا بافت همگن شود. سپس این ترکیب برای ٤ روز در دمای آزمایشگاه روی شیکر (Shaker) قرار داده شد. بعد از این مدت با سرعت g ۲۸۰۰ و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی از رسوب جدا شد. این عصاره آبی به‌دست آمده مجدداً برای ۱۰ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با سرعت g ۱٤۰۰۰ سانتریفوژ شد تا عصاره آبی به‌دست آید. در هر عصاره‌گیری به دلیل قطبیت حلال، ترکیباتی با قطبیت مشخص خارج می‌شود که براساس افزایش درجه قطبیت در هر حلال، این ترکیبات متفاوتند. بدین ترتیب طیفی از ترکیبات با درجه قطبیت متفاوت را خواهیم داشت.

برای تعیین غلظت هریک از عصاره‌ها، در حدود ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره در لوله ۱/۵ میکرولیتری وزن شده ریخته و در شرایط خلاء در دستگاه تغلیظ کننده (Concentrator, Eppendorf) (Germany) قرار داده شد و در نهایت پس از تبخیر محلول، وزن لوله دارای رسوب سنجش شد. با توجه به وزن ابتدایی لوله، وزن رسوب عصاره‌ها برحسب میلی‌گرم به‌دست آمد. سپس به رسوب هریک از عصاره‌ها آب مقطر دیونیزه اضافه شد تا عصاره‌هایی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌دست آید. به عصاره کلروفرمی به جای آب مقطر محلول دی متیل سولفوکسید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) اضافه شد و رسوب در این محلول حل شد.

۲-٤- محیط کشت و سویه‌های باکتریایی

سویه باکتریایی اشرشیاکلی K12 از بخش باکتری‌شناسی و دو سویه TG1 و TOP 10 F' از بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) (Merck, Darmstadt, Germany) به میزان ۲۰ گرم در لیتر در آب مقطر دیونیزه و محیط کشت مایع لاکتوز براث (Lactose Broth) (Merck, Darmstadt, Germany) به میزان ۱۳ گرم در لیتر در آب مقطر دیونیزه تهیه شد.

۲-۵- کشت باکتریایی و آزمون انتشار دیسک

از ۳ سویه باکتری با روش خطی پلیت تهیه شد. در شرایط کاملاً استریل و در کنار شعله از پلیت کشت باکتری تک کلونی برداشت شد و در لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع لاکتوز براث کشت داده شد. این لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیکردار به‌مدت ٦ ساعت قرار داده شد تا باکتری رشد کند. کدورت محیط حاوی باکتری با استاندارد مک‌فارلند نیم (McFarland 0.5) (تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد کلونی باکتری در میلی‌لیتر) سنجش شد و سپس این کار با دستگاه اسپکتوفتومتر (BioRad, USA) نیز بررسی شد و جذب نوری

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

(Optical Density: OD) آن در طول موج ٦٥٠ نانومتر سنجش شد. سپس ٢٠٠ میکرولیتر از محیط حاوی باکتری در ٦ پلیت حاوی محیط نوترینت آگار پخش شد. از هریک از عصاره‌های آبی، متانولی، هگزانی و کلروفرمی با غلظت ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در حدود ٤٠ میکرولیتر در دیسک‌های خالی (Disc Blank) قرار گرفت. دیسک‌هایی نیز به DMSO خالص به‌عنوان کنترل منفی آغشته شد. هر پلیت به دو ناحیه تقسیم و در هر قسمت یک دیسک آغشته به عصاره قرار داده شد. علاوه بر آن از چهار دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین (Ampicilin) (١٠ میکروگرم در هر دیسک)، سفالکسین (Cefalexin) (٣٠ میکروگرم در هر دیسک)، اریترومایسین (Erythromycin) (١٥ میکروگرم در هر دیسک) و آموکسی‌سیلین (Amoxicilin) (٢٥ میکروگرم در هر دیسک) به‌عنوان کنترل مثبت در پلیت دیگری استفاده شد [١٤]. پلیت‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از این دوره زمانی با کمک کولیس (Colis) قطر ناحیه ممانعتی (Inhibitory Zone) رشد باکتری‌ها برای هریک از محلول‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های مختلف برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

٢-٦- تعیین کمترین غلظت ممانعتی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC)

برای تعیین کمترین غلظت ممانعتی هر یک ازعصاره‌ها، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت مایع لاکتوز براث کشت داده شدند و در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد شیکردار قرار گرفتند تا باکتری رشد کند. زمانی که OD محیط حاوی باکتری در طول موج ٦٥٠ نانومتر به حدود ٠/٢٥ تا ٠/٣رسید، حدود ٣٧٥ میکرولیتر از آن با ١٢/٥ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد (نسبت رقت معادل ١:٣٣ است) [١٥]. سپس ١٠٠ میکرولیتر از باکتری با رقت ١:٣٣ در چاهک‌های میکروپلیت ٩٦تایی (NUNCLON®, DELTA, Denmark) ریخته شد.

از هریک از چهار عصاره مورد بررسی ٨ سری رقت (Serial dilution) با نسبت ٢:١ تهیه شد. در حدود ٤٠ میکرولیتر از رقت‌های متفاوت از هر عصاره در هریک از چاهک‌های میکروپلیت و به‌صورت سه‌تایی روی محیط کشت همراه با باکتری ریخته شد. چاهک‌های کنترل مثبت حاوی ١٠٠ میکرولیتر از باکتری و ٤٠ میکرولیتر از محیط مایع لاکتوز براث و چاهک‌های کنترل منفی نیز حاوی ١٠٠ میکرولیتر محیط مایع لاکتوز براث و ٤٠ میکرولیتر عصاره و محلول DMSO در نظر گرفته شد. با دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader) (BioTek, USA) OD چاهک‌ها در طول موج ٦٥٠ نانومتر خوانده شد و سپس میکروپلیت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از دوره‌های زمانی ٤، ٨، ١٢ و ٢٤ ساعت مجدداً میکروپلیت در دستگاه قرائت‌گر الایزا گذاشته شد و OD سنجش شد. آنالیز داده‌ها با سنجش خطای استاندارد (Standard Error) و ضریب همبستگی (Correlation) و روش‌های آنالیز آماری آنووای یک سویه (One way ANOVA) و آزمون T (T-test) با استفاده از بسته نرم‌افزاری SPSS نسخه ١٦/٠ (http://www.winwrap.com/) انجام پذیرفت.

٢-٧- کمترین غلظت کشنده (Minimum Bactericidal Concentration: MBC)

برای تعیین MBC، از چاهک‌هایی که با اثر دادن عصاره‌ها، بعد از گذشت دوره زمانی ٢٤ ساعت به‌صورت شفاف باقی مانده بود و افزایش میزان OD را نداشتند و احتمال می‌رفت که باکتری در آن‌ها رشد نکرده باشد، در کنار شعله در پلیت حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شد و سپس پلیت‌ها برای ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. چنانچه کلونی باکتری در سطح محیط مشاهده می‌شد، نشان‌دهنده این بود که عصاره مورد نظر دارای اثر کشندگی بر سویه باکتری نبوده و تنها اثر مهاری بر رشد را داشته است. چنانچه در سطح پلیت کلونی باکتری رشد نکرده بود، نشان‌دهنده این بود که عصاره دارای اثر کشندگی بوده و باکتری را از بین برده است. بدین ترتیب MBC عصاره بر سویه مورد نظر مشخص شد.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

۳- نتایج

۳-۱- خیار دریایی *Holoturia. SP*

با مقایسه شکل اسیکل‌های نمونه خیار دریایی با کلید شناسایی FAO، جنس *Holoturia. SP* برای نمونه خیار دریایی مورد آزمایش در این مطالعه تشخیص داده شد [۱۳].

۳-۲- روش انتشار دیسک

در کار سنجش حساسیت باکتری‌ها با استفاده از روش دیسک، تمامی سویه‌های مورد آزمایش نسبت به عصاره‌های مورد بررسی واکنش نشان دادند. نوع و میزان آن در عصاره‌های مختلف و در سویه‌ها متفاوت بوده است. نتایج و قطر منطقه ممانعتی هریک از عصاره‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

با توجه به قطر منطقه ممانعتی در دیسک‌های کنترل منفی و کنترل مثبت، عصاره متانولی دارای بیشترین اثر مهاری رشد بر سویه‌های TG1 و K12 بوده است. عصاره‌های متانولی و هگزانی بیشترین تأثیر را بر سویه Top 10 F′ داشت که میزان تأثیر آن یا قطر منطقه ممانعتی هر دو عصاره تقریباً یکسان بوده است.

پس از مقایسه رشد باکتری در موارد کنترل و مواردی که دیسک‌های آغشته به عصاره آبی استفاده شده است، مشخص شد که عصاره آبی در همه سویه های مورد مطالعه به عنوان القاکننده رشد، عمل نموده و باعث افزایش رشد آن‌ها شده است. این عصاره در هر سه سویه TG1، K12 و Top 10 F′ هاله‌ای با رشد مضاعف باکتری و البته به قطر ۱۰ میلی‌متر را ایجاد نمود. با مقایسه عملکرد عصاره‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها و غلظت‌های استفاده شده از هریک می‌توان گفت که عصاره‌های مورد آزمایش در قیاس با آنتی‌بیوتیک‌ها دارای اثر ضد باکتریایی کمتری هستند.

۳-۳- ریزرقیق‌سازی محیط کشت

۳-۳-۱- عصاره متانولی

در بررسی و تعیین MIC و MBC، عصاره متانولی در سویه TG1 با کاهش غلظت عصاره سرعت رشد باکتری افزایش یافته است. در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ٤ ساعت نخستین آزمایش رشد بسیار ضعیفی در باکتری مشاهده شد ولی پس از این زمان تقریباً رشد باکتری متوقف شد و OD در مقایسه با کنترل منفی در حد پایین و به‌صورت ثابت باقی ماند؛ ولی در دیگر غلظت‌ها تنها در ۱۲ ساعت نخستین رشد به کندی انجام پذیرفت و بعد از آن تا دوره زمانی ۲٤ ساعت به جز نمونه غلظت ۱:۲ و ۱:۱۲۸ بقیه به رشد و OD معادل کنترل منفی رسیدند. بعد از کشت محلول حاصل از غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روی پلیت نوترینت آگار از آن‌جایی که هیچ‌گونه کلونی باکتریایی بعد از ۲٤ ساعت در پلیت مشاهده نشد، مشخص شد که عصاره متانولی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مرگ سویه TG1 شده است.

جدول۱ اندازه قطر منطقه ممانعتی در سویه‌های مختلف باکتریایی بر حسب میلی‌متر

قطر منطقه ممانعتی								
سویه باکتریایی	عصاره متانولی[۱]	عصاره هگزانی[۱]	عصاره کلروفرمی[۱]	DMSO	آمپی‌سیلین[۲]	سفالکسین[۳]	آموکسی‌سیلین[٤]	اریترومایسین[٥]
TG1	۱۲ میلی‌متر	۱۰ میلی‌متر	۱۳ میلی‌متر	۱۲ میلی‌متر	۱۳ میلی‌متر	۱۵ میلی‌متر	۱۱ میلی‌متر	۱۵ میلی‌متر
K12	۹ میلی‌متر	۸/۵ میلی‌متر	۱۲ میلی‌متر	۹ میلی‌متر	۱۵ میلی‌متر	۱۱ میلی‌متر	۲۰ میلی‌متر	۹ میلی‌متر
TOP 10 F′	۹ میلی‌متر	۹ میلی‌متر	۱۲ میلی‌متر	۱۰ میلی‌متر	۱۵ میلی‌متر	۱۳ میلی‌متر	۲۲ میلی‌متر	۱۱ میلی‌متر

۱: ٤۰۰۰ میکروگرم در دیسک، ۲: ۱۰ میکروگرم در دیسک، ۳: ۳۰ میکروگرم در دیسک، ٤: ۲۵ میکروگرم در دیسک، ۵: ۱۵ میکروگرم در دیسک

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

در سویه K12 در تمامی غلظت‌ها رشد باکتری مهار شد که این اثر به‌ترتیب با کاهش غلظت عصاره متانولی کمتر شده است. در ۵ غلظت ٦/٢٥ تا ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پس از گذشت ٢٤ ساعت رشد باکتری مهار شد که بعد از کشت روی پلیت نوترینت آگار و با مشاهده کلونی باکتری در سطح پلیت، مشخص شد که عصاره متانولی در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد آزمایش اثر کشندگی بر سویه K12 را نداشته است و تنها رشد آن را مهار نموده است (شکل ١).

در سویه TOP10 F′ دو غلظت ابتدایی (١٠٠ و ٥٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) این عصاره مانع از رشد باکتری شده است. در غلظت ٥٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پس از گذشت ٢٤ ساعت OD اندازه‌گیری شده، معادل نصف کنترل منفی بوده و در غلظت ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد بسیار کمتر بوده است. بنابراین عصاره متانولی باعث کاهش OD شده است که نشان‌دهنده ممانعت از رشد باکتری است ولی باعث مرگ سویه باکتری TOP10 F′ نشده است.

با بررسی و آنالیز آماری به روش آنووای یک سویه، مشخص شد که عصاره متانولی در غلظت‌های مختلف بر رشد هر سه سویه از باکتری‌ها تغییر معنی‌داری را اعمال نموده است (P<٠/٠٠٠١). این عصاره در ساعت‌های متفاوت در رشد هیچ‌یک از سویه‌های باکتریایی تغییر معنی‌داری را اعمال نکرد. از سوی دیگر، نتایج آنالیز آماری به روش آزمون T نشان داد که عصاره متانولی در کاهش رشد در سویه‌های TG1 و TOP 10 F′ در غلظت ١٠٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (در مقایسه با غلظت صفر یا نمونه کنترل) تغییر معنی‌دار (P<٠/٠٥٥) و همچنین کاهش معنی‌داری در رشد سویه K12 در غلظت‌های ١٠٠، ٥٠، ٢٥ و ١٢/٥ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (در مقایسه با غلظت صفر) به‌ترتیب با P<٠/٠٢٢، P<٠/٠٣٥، P<٠/٠٣٥ و P<٠/٠٥٨ داشته است.

٣-٣-٢- عصاره هگزانی

عصاره هگزانی در غلظت ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر ممانعتی خود را بر رشد سویه TG1 اعمال نموده است به‌طوری که حتی بعد از گذشت ٢٤ ساعت رشد باکتری در این چاهک تقریباً نصف رشد باکتری در نمونه کنترل منفی بوده است. در آزمون تعیین MBC مشخص شد که عصاره هگزانی باعث مرگ باکتری نشده و تنها بر رشد آن اثر مهاری داشته است.

در سویه K12 نتایج متفاوت بوده و با کاهش غلظت عصاره هگزانی رشد باکتری نیز کاهش یافته و در مقابل بعد از گذشت ١٢ ساعت رشد باکتری سرعت یافته است.

در سویه TOP 10 F′ نیز تأثیر مهاری این عصاره بسیار ضعیف بوده است به‌طوری که در مقایسه با نمونه کنترل منفی، میزان رشد تغییر محسوسی نکرده است (شکل ٢).

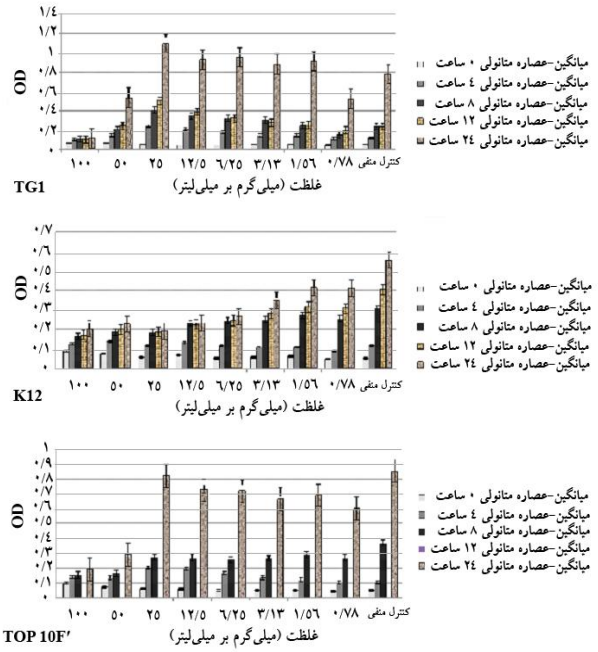
آنالیز آماری به روش آنووای یک سویه، نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره هگزانی بر رشد هر سه سویه از باکتری‌ها تغییرات معنی‌داری را اعمال نموده است (P<٠/٠٠٠١). این عصاره در ساعت‌های متفاوت در رشد هیچ‌یک از سویه‌های باکتریایی تغییر معنی‌داری را اعمال ننمود.

٣-٣-٣- عصاره کلروفرمی

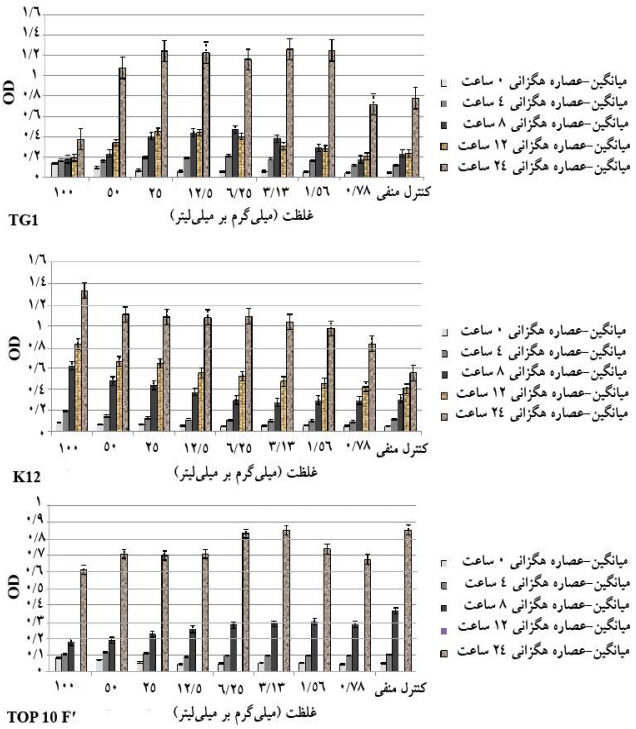
در عصاره کلروفرمی با در نظر گرفتن نمونه کنترل مثبت، مشاهده شد که در دو غلظت ١٠٠ و ٥٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با گذشت زمان، رشد سویه TG1 روند رو به کاهش را طی نموده است. در دیگر غلظت‌ها، باکتری‌ها در حد نمونه کنترل منفی رشد داشته‌اند. پس از این‌که باکتری‌هایی که رشدشان با دو غلظت ذکر شده مهار شده بود، روی پلیت کشت داده شدند، باکتری‌ها رشد کردند؛ در نتیجه عصاره کلروفرمی باعث مرگ سویه باکتریایی TG1 نشده بود.

در بررسی عصاره کلروفرمی بر سویه K12 اثر بخشی دو غلظت ٥٠ و ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای با سایر غلظت‌ها بود. رشد باکتری در این غلظت‌ها مهار شده بود به‌طوری که در دوره‌های زمانی متفاوت، غلظت باکتری در حد ثابت نگه داشته شده بود و حتی پس از گذشت ٢٤ ساعت رشد باکتری مهار شده است. در غلظت ١٠٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با گذشت زمان، OD نیز کاهش یافته است (شکل ٣).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

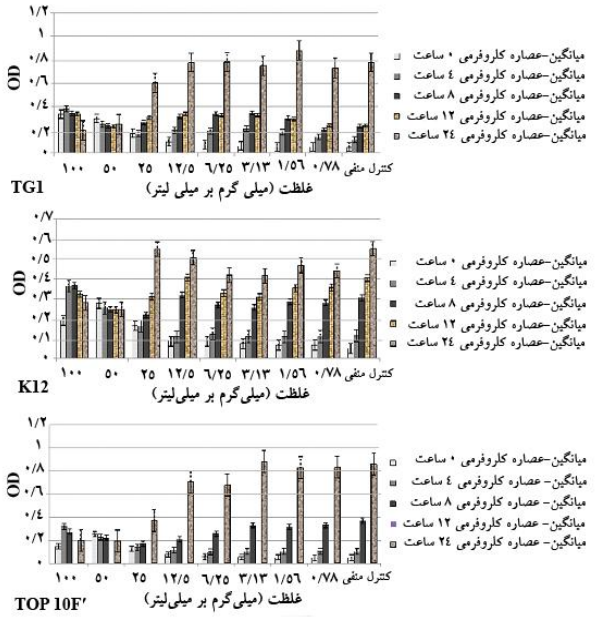


شکل ۱ اثر عصاره متانولی در زمان‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت بر OD در سویه‌های باکتریایی اشرشیا K12، TG1، TOP 10 F′؛ در نمونه باکتری TG1 در مقایسه با نمونه کنترل منفی در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی، مهار رشد باکتری مشاهده می‌شود که بعد از گذشت ۲٤ ساعت OD آن افزایش نیافته است و به‌طور ثابت باقی مانده است.

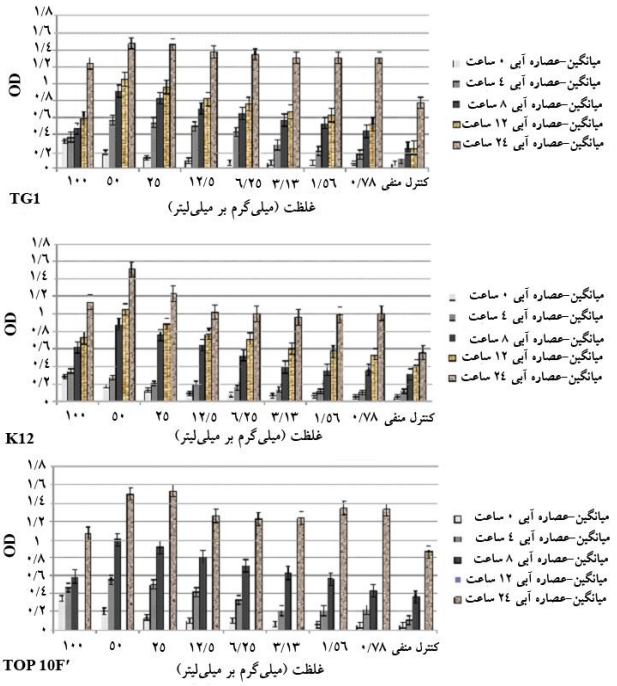


شکل ۲ اثر عصاره هگزانی در زمان‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت بر OD در سویه‌های باکتریایی اشرشیا K12، TG1، TOP 10 F′

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]



شکل ۳ اثر عصاره کلروفرمی در زمان‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت بر OD در سویه‌های باکتریایی اشرشیا K12، TG1، TOP 10 F′



شکل ٤ اثر عصاره آبی در زمان‌های مختلف و غلظت‌های متفاوت بر OD در سویه‌های باکتریایی اشرشیا K12، TG1، TOP 10 F′؛ در مقایسه با نمونه کنترل منفی با اثر دادن غلظت‌های متفاوت از عصاره آبی به سویه‌های باکتریایی K12، TG1، TOP 10 F′ افزایش میزان رشد در آن‌ها قابل مشاهده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

در سویه TOP 10 F′ در دو غلظت ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر روند کاهش رشد باکتری مشاهده می‌شد. در غلظت سوم رشد باکتری بسیار ضعیف و در حد نصف نمونه کنترل بود. در دو غلظت چهارم و پنجم نیز میزان رشد باکتری کمتر از نمونه کنترل بوده است.

با آنالیز آماری به روش آنووای یک سویه، مشخص شد که عصاره کلروفرمی در غلظت‌های مختلف بر رشد هر سه سویه از باکتری‌ها تغییر معنی‌داری را اعمال نموده است (P<۰/۰۰۰۱) در حالی‌که این عصاره در ساعت‌های متفاوت در رشد هیچ‌یک از سویه‌های باکتریایی تغییر معنی‌داری را اعمال ننموده است. روش آزمون T نشان داد که عصاره کلروفرمی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد سویه‌های TG1 و TOP 10 F′ را به میزان معنی‌دار (به‌ترتیب با P<۰/۰۶۱ و P<۰/۰۴۷) نسبت به باکتری‌های تیمار نشده با عصاره کاهش داده است. همین آنالیز نشان داد که این عصاره در غلظت‌های ۱۰۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌داری در رشد سویه K12 (به‌ترتیب P<۰/۰۵۳ و P<۰/۰۸) شده است.

۳-۳-٤- عصاره آبی

عصاره آبی در هر سه سویه مورد بررسی در مقایسه با نمونه کنترل منفی، اثر القاکنندگی رشد را نشان داد. بیشترین تأثیر را در دو غلظت ابتدایی خود اعمال نمود و با کاهش غلظت عصاره این اثر نیز کاهش یافت ولی با وجود این پس از ٢٤ ساعت میزان رشد در نمونه آزمون با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تقریباً دو برابر میزان رشد در نمونه کنترل منفی بود (شکل٤).

آنالیز با روش آنووای یک سویه، در مورد غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اثر آن بر رشد هر سه سویه از باکتری‌ها تغییر معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۰۱). این عصاره در ساعت‌های متفاوت در رشد هیچ‌یک از سویه‌های باکتریایی تغییر معنی‌داری را اعمال ننموده است. آنالیز آماری به روش آزمون T مشخص کرد که عصاره آبی در دو غلظت متفاوت (غلظت صفر با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و غلظت صفر با غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر رشد سویه K12 تغییر معنی‌دار را اعمال نموده است (به‌ترتیب با P<۰/۰٤۹ و P<۰/۰٥٦). نتایج آنالیز همبستگی اسپیرمن (Correlation spearman) مشخص نمود که غلظت‌های متفاوت از عصاره آبی بر رشد سویه K12 تغییر معنی‌دار (P<۰/۰۱۹) با ضریب همبستگی ۰/۳٤۹ و بر رشد سویه TG1 نیز تغییر معنی‌دار (P<۰/۰۱۹) با ضریب همبستگی ۰/۳۲۱ را اعمال نموده است.

در میان عصاره‌های مورد بررسی، تنها عصاره‌های متانولی و کلروفرمی هر دو در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب باعث مرگ سویه‌های TG1 و K12 شده است. بنابراین MBC در این دو عصاره، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بر دو سویه باکتریایی ذکر شده، بوده است.

٤- بحث

در بررسی و سنجش اثر ضد باکتریایی در اکثر موارد از دو روش انتشار دیسک و ریزرقیق‌سازی محیط کشت استفاده می‌شود [۱۵-۱۹] که به‌عنوان دو روش مناسب در این راستا کاربرد دارند.

کار و مطالعه روی آثار ضد باکتریایی موجودات مختلف دریایی از جمله خارپوستان در سال‌های اخیر و در کشورهای مختلف به فراوانی انجام شده است [۲۰]. در بررسی‌های انجام شده، مشخص شده که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله پوریفرا (Porifera)، بریوزوا (Bryozoa)، نرم‌تنان (Mollusca)، مرجان‌ها و کرم‌های حلقوی آنلیدا (Annelida) و ... دارای بیشترین آثار ضد باکتریایی هستند [۱۲]. در سال ۱۹۹۵ رایدزوان (Ridzwan) و همکارانش سه گونه خیار دریایی هولوتوریا آترا (*Holothuria atra*)، هولوتوریا اسکاراب (*H. scarab*) و بوهادچیا آرگوس (*Bohadschia argus*) را از چهار ساحل صبا (Sabah) در کشور مالزی جمع‌آوری نموده و سه عصاره چربی، متانولی و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

بافر نمکی فسفات (Phosphate-buffered saline: PBS) را از آن‌ها استخراج کردند و در ادامه این عصاره‌ها را بر ۷ گونه باکتری استرپتوکوکوس فکالیس (*Streptococcus faecalis*)، استرپتوکوکوس ویریدنس (*S. viridens*)، استرپتوکوکوس نمونیا (*S. pneumonia*)، استافیلوکوکوس اورئوس (*Staphylococcus aureus*)، اشرشیاکلی، شیگلا سونی (*Shigella sonnei*) و پروتئوس میرابیلیس (*Proteus mirabilis*) به روش سنجش دیسک آزمایش نمودند. نتایج نشان داد که عصاره چربی و عصاره متانولی مانع از رشد باکتری‌ها نمی‌شود و در مقابل عصاره PBS بر این باکتری‌ها اثر ممانعتی رشد را داشته و مانع از رشد آن‌ها می‌شود [۲۱].

در مطالعه دیگر عصاره متانولی- استونی به‌دست آمده از دیواره بدن خیار دریایی پاراستیکوپوس پارویمنسیس (*Parastichopus parvimensis*) جزیره سانتا کاتالینای (Santa catalina island) کالیفرنیا بر باکتری‌های اشرشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillis subtilis*) نیز به روش انتشار دیسک اثر داده شد. در این مطالعه از دو آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و تتراسایکلین (Tetracyclin) نیز به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد که در پایان اثر ضد باکتریایی این عصاره بر باکتری‌های مورد مطالعه تأیید شد. البته در مقایسه با قطر منطقه ممانعتی رشد در آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش، تأثیر این عصاره بسیار کمتر از آنتی‌بیوتیک‌ها بوده است [۲].

در سال ۲۰۰۱، نمونه‌های بالغ خیار دریایی هولوتوریا کوکوماریا جاپونیکا (*Holothuria Cucumaria japonica*) از مناطق باز پتر (Peter)، بزرگترین خور دریای ژاپن، جمع‌آوری شد و عصاره سرم فیزیولوژی از اندام‌های درونی بدن این نمونه‌ها به‌دست آمد و به نمونه‌های گاو ٤ تا ٦ ساله که تقریباً در ماه هشتم بارداری بودند و به نوزادان تازه متولد شده تزریق شد و سپس آزمایش‌هایی روی خون این حیوانات صورت گرفت. در این آزمایش‌ها مشاهده شد که عصاره به‌دست آمده از اندام‌های درونی خیار دریایی ساکن دریای ژاپن سازوکارهای غیراختصاصی محافظتی بدن (Nonspecific Resistance) را در گاوهای بالغ و تازه متولد شده، فعال می‌سازد [۲۲].

در پژوهشی که در سال ۲۰۰۲ توسط هوگ (Haug) و همکارانش انجام شد [۲۰]، آثار ضد باکتریایی سه گونه خارپوست، توتیا (*Strongylocentrotus droebachiensis*)، ستاره دریایی (*Asterias rubens*) و خیار دریایی کوکوماریا فروندوزا به‌دست آمده از سواحل نروژ بررسی شد. نتایج حاصل نشان داد که عصاره‌های طبیعی به‌دست آمده از اندام‌های این سه گونه خارپوست به‌خصوص عصاره‌های تهیه شده از دیواره بدن و مایع درون حفره شکمی (Coelomocyte) دارای اثر ضد باکتریایی بوده که البته از این میان بیشترین اثر مربوط به عصاره‌های به‌دست آمده از قسمت‌های معده- روده‌ای و تخم‌های ستاره دریایی (*A. rubens*) و تخم‌های خیار دریایی (*C. frondosa*) بوده است. آن‌ها در پژوهش خود اختلاف بین میزان اثربخشی این ترکیبات را به‌علت تفاوت در آب‌دوست بودن و حساسیت به حرارت در ترکیبات مختلف به‌دست آمده بیان نموده‌اند. همچنین فعالیت شبه لیزوزومی (Lysozyme-like) حاصل از عصاره چندین بافت ستاره دریایی (*A. rubens*) و فعالیت همولیتیک (Haemolytic) اغلب عصاره‌های این سه گونه خارپوست، به‌ویژه عصاره دیواره بدنشان را تأیید نمودند [۲۳].

در این مطالعه با انجام دو آزمون مختلف سنجش باکتریایی، اثر ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی، هگزانی و کلروفرمی بر سویه‌های مورد آزمایش به تأیید رسید. میزان آن بسته به نوع عصاره و سویه خاص و البته غلظت عصاره و همچنین دوره‌های زمانی متفاوت بوده است. در آزمون انتشار دیسک و قیاس اثربخشی عصاره‌های مورد آزمایش با یکدیگر بیشترین اثر ضد باکتریایی در عصاره‌های متانولی و هگزانی و بر سویه TG1 مشاهده شد که البته در قیاس با غلظت ماده مؤثره آنتی‌بیوتیک‌های به‌کار گرفته شده با غلظت ماده مؤثره هر

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

عصاره روی دیسک، می‌توان اظهار داشت که عصاره‌های مورد نظر تأثیر کمتر و ضعیف‌تری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده (آمپی‌سیلین، سفالکسین، اریترومایسین و آموکسی‌سیلین با مقادیر به‌کار گرفته شده) بر سویه‌های باکتریایی اشرشیاکلی اعمال نموده‌اند که البته اثری مشابه با این نتایج در مقالات دیگر نیز به‌دست آمده است [۲].

MIC برای سویه TG1 غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های متانولی و کلروفرمی و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره هگزانی بوده است. این میزان برای سویه K12 غلظت ۶/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی و غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره کلروفرمی بوده است. همچنین در سویه TOP 10 F´ نیز غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره متانولی و غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره کلروفرمی MIC محسوب می‌شوند. البته عصاره هگزانی در غلظت‌های مورد بررسی چنین اثری را بر دو سویه K12 و TOP 10 F´ اعمال ننموده است.

MBC نیز غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره متانولی و عصاره کلروفرمی بوده است که به‌ترتیب باعث مرگ سویه‌های TG1 و K12 شده است. هریک از این سویه‌ها دارای یک‌سری ویژگی‌هایی منحصر به خود هستند که با هم متفاوتند؛ بنابراین تفاوت‌هایی که در ساختار این سویه‌ها است باعث این تفاوت‌ها در نتایج شده است. نتایج آماری به‌دست آمده در روش‌های آنالیزی مختلف و معنی‌دار بودن تغییرات رشد در باکتری‌ها با اثردهی غلظت‌های متفاوت از هر ٤ عصاره روی سویه‌های باکتریایی نشان می‌دهد که هریک از این عصاره‌ها دارای ترکیبات زیستی با توان ضد باکتریایی متفاوت هستند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان ترکیباتی آنتی‌بیوتیکی مطرح نمود. اما در مقابل، عصاره آبی به‌دست آمده از خیار دریایی *Holoturia. SP* خلیج فارس بر سویه‌های باکتری مورد مطالعه اثر عکس داشته و نه تنها مانع از رشد آن‌ها نشده، بلکه با مقایسه رشد باکتری در آن نمونه کنترل می‌توان این عصاره را به‌عنوان برانگیزنده رشد سویه‌های اشرشیاکلی معرفی نمود. بنابراین می‌توان احتمال وجود فاکتورهای رشد باکتری را در این عصاره مطرح نمود. در یک‌سری از تحقیقات نشان داده شده است که عصاره آبی خیار دریایی دارای آثار ضد درد (Antinociceptive) [٢٤] و سیتوتوکسیسیتی [۲۵] و ضد باکتریایی است. تناقص موجود در این مطالعه و دیگر پژوهش‌های به‌عمل آمده شاید به تفاوت در گونه‌های متفاوت خیار دریایی و حتی سویه‌های باکتریایی مورد آزمایش یا اختلاف در نحوه عصاره‌گیری مربوط باشد. در اکثر مطالعاتی که روی عصاره آبی به‌دست آمده از گونه‌های متفاوت خیار دریایی انجام شده است، به ترکیبات در مرحله عصاره‌گیری، حرارت داده شده که این می‌تواند باعث تخریب و تغییر ساختار زیستی ترکیبات حساس به حرارت موجود در عصاره آبی شود. اما در این مطالعه عصاره‌گیری در دمای آزمایشگاه و بدون اعمال هرگونه عمل تخریبی انجام شده است.

مطالعه حاضر نشان داد که خیار دریایی *Holoturia. SP* بومی آب‌های خلیج فارس دارای ترکیبات زیستی است که می‌تواند مانع از رشد سویه‌های مختلف باکتری‌های اشرشیاکلی شود. با توجه به تأثیر عصاره آبی بر این باکتری و از آن‌جایی که اشرشیاکلی جزء باکتری‌های فلور طبیعی سیستم گوارشی انسان است، باید در مصرف تغذیه‌ای خیار دریایی موارد بهداشتی خاصی، مورد نظر قرار گیرد. در واقع باید محصولات فرآوری شده که آزمایش‌های تأیید کیفیت روی آن انجام شده است را مصرف نمود. خیار دریایی استیکوپوس جاپانیکوس (*Stichopus japanicus*) به‌صورت تازه محتوی ۷٦ درصد آب، ۲۱/۵ درصد پروتئین، ۰/۳ درصد چربی، ۱ درصد کربوهیدرات، ۱/۱ درصد خاکستر (Ash) و ۱۱۸ میلی‌گرم کلسیم، ۲۲ میلی‌گرم فسفر و ۱/٤ میلی‌گرم آهن در هر ۱۰۰ گرم وزن بدن است [۵، ۱۳] . با توجه به میزان بالای آب در این نمونه و تغذیه به‌صورت تازه و بدون هیچ عملیات فرآوری از این گونه خیار دریایی در کشورهای ژاپن و کره و نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، نیاز به تحقیق بیشتر و بررسی روش‌های فرآوری نوین و البته تغذیه سالم از این

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

نمونه مفید دریایی لازم به‌نظر می‌آید. در زمینه دارویی نیز نیاز است که با شناسایی این ترکیبات و تعیین نقش اختصاصی آن‌ها در برای ساخت ترکیبات دارویی و پزشکی و همچنین آنتی‌بیوتیک‌های زیستی و جایگزینی آن‌ها با آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی اقدام نمود.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله حاضر از کلیه همکاران و دانشجویان بخش پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران، به دلیل مساعدت‌های فراوان و فراهم آوردن تمامی امکانات برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Jha RK, Xu ZR. Biomedical Compounds from Marine organisms. Mar Drugs 2004; 2: 123-46.

[1] Villasin J, Pomory CM. Antibacterial activity of extracts from the body wall of Parastichopus parvimensis (Echinodermata: Holothuroidea). Fish Shellfish Immunol 2000; 10(5): 465-7.

[2] Yasoda HN, Chi Z, Zhu K. Probiotics and sea cucumber farming. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 2006; 24: 45-8.

[3] James DB. Twenty sea cucumber from seas around India. Naga, ICLARM Quart 2001; 24(1&2):4-8.

[4] Chen J. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. SPC Beche-de-mer Information Bulletin 2003;18: 18-23.

[5] 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 Biotechnol 2002; 2:17.

[6] 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 Biotechnol Biochem 2006; 70(12): 2906-12.

[7] 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.

[8] Ding XZ, Witt R, Tong WG, Li XQ, Betts H, Collin P, Adrian TE. Anti-Pancreatic Cancer Effects of Myristoleic Acid. Pancreatology 2003; 3: 209–69.

[9] Farouk AEA, Abd F, Ghouse H, Ridzwan BH. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. Am J Biochem & Biotech 2007; 3(2): 60-5.

[10] 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. Carbohydr Res 2004; 339(7): 1339-46.

[11] Munro MHG, Blunt JW, Barns G, Battershill Ch, Lake RJ, Perry NB. Biological activity in New Zealand marine organisms. Pure & Appl Chem 1989; 61(3): 529-34.

[12] Shakouri A, Aminrad T, Nabavi MB, Kochanian P, Savari A, Safahiye A. New Observation of

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]

Three Species of Sea Cucumber from Chabahar Bay (Southeast Coasts of Iran). J Biological Sci 2009; 9(2): 184-7.

[13] Kelman D, Kashman Y, Rosenberg E, Kushmaro A, Loya Y. Antimicrobial activity of Red Sea corals. Marine Biology 2006; 149: 357-63.

[14] Connie R, Mahon GM. Textbook of diagnostic microbiology. 2000:67-77.

[15] McDermott PF, Barry AL, Jones RN, Stein GE, Thornsberry C, Wu CC, Walker RD. Standardization of broth microdilution and disk diffusion susceptibility tests for Actinobacillus pleuropneumoniae and Haemophilus somnus: quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, tetracycline, tilmicosin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4283–7.

[16] Bala M, Ray K, Gupta SM. Comparison of disc diffusion results with minimum inhibitory concentration (MIC) values for antimicrobial susceptibility testing of Neisseria gonorrhoeae. Indian J Med Res 2005; 122(1): 48-51.

[17] Saiman L, Burns JL, Whittier S, Krzewinski J, Marshall SA, Jones RN. Evaluation of reference dilution test methods for antimicrobial susceptibility testing of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37(9):2987–91.

[18] Kokare CR, Mahadik KR, Kadam SS, Chopade BA. Isolation, characterization and antimicrobial activity of marine halophilic Actinopolyspora species AH1 from the west coast of India. Curr Sci 2004; 86(4): 593-7.

[19] Haug T, Kjuul AK, Styrvold OB, Sandsdalen E, Olsen QM, Stensvåg K. Antibacterial activity in Strongylocentrotus droebachiensis (Echinoidea), Cucumaria frondosa (Holothuroidea), and Asterias rubens (Asteroidea). J Invertebr Pathol 2002; 81(2): 94-102.

[20] Ridzwan BH, Kaswandi MA, Azman Y, Fuad M. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. Gen Pharmacol 1995; 26(7): 1539-43.

[21] 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.

[22] Petzelt C. Are echinoderms of interest to biotechnology? Prog Mol Subcell Biol 2005; 39: 1-6.

[23] Ridzwan BH, Leong TC, Idid SZ. The Antinociceptive Effects of Water Extracts from Sea Cucumber Holothuria Leucospilota Brandt, Bohadschia marmorata vitiensis Jaeger and Coelomic Fluid from Stichopus hermanii. Pakistan J Biol Sci 2003; 6(24): 2068-72.

[24] Mariko O, Yumiko YS, Takeshi S. Cytostatic Activity of Hot Water Extracts from the Sea Cucumber in Caco-2. Food Sci Technol Res 2005; 11(2): 202-6.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-01-24]