J Oceanography (JOC). 12(47): 52-62, Autumn 2021

Journal of Oceanography
Homepage: joc.inio.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH PAPER (Marine Science)

Antibacterial Effect of the Extracts of the Muscle Wall of Four Sea Cucumber (*Holothuria* sp) Species on Some Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Pathogenic Bacteria

Mohana Mohammadi Movahed [1], Seyyed Abbas Hosseini [2], Paria Akbary [3,*], Abdolmajid Hajimoradloo [4], Seyyed Ali Akbar Hedayati [5]

[1] Ph.D. Graduated of Fisheries and Aquatic Ecology Group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

[2] Professor of Fisheries and Aquatic Ecology Group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

[3] Associate of Fisheries groups, Department of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chahbahar, Iran

[4] Professor of Fisheries and Aquaculture group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

[5] Associate of Fisheries and Aquatic Ecology Group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

ARTICLE INFO

Code: A-10-1387-2

Article History:
Received: 14/10/2020
Revised: 21/08/2021
Accepted: 01/07/2021

Keywords:
Sea cucumber
Extract
Antibacterial activity
Disk diffusion
Well diffusion

*Corresponding author:
paria.akbary@gmail.com
0000-0001-9108-8690

10.52547/joc.12.47.52

ABSTRACT

Background and Objectives: Today, the increasing failure of chemotherapy and antibiotic resistance displayed by pathogenic bacteria infectious agents have caused the screening of new secondary metabolites with various chemical structures of marine crustaceans, mollusks, and echinoderms with desirable antibacterial activity. This study was designed to determine the antimicrobial effect of muscle wall methanol and acetone extracts of four species of sea cucumber (*Holothuria arenicola*, *H. leucospilota*, *Stichopus hermanni*, *S.horrens*) in Chabahar coasts on some rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pathogenic bacteria (*Lactococcus garvieae*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri* and *Streptococcus iniae*).

Methods: An experimental study was conducted at in vitro conditions. Observed variables include sea cucumber species, different concentrations of extracts, and bacterial strains. After preparing extracts of mentioned sea cucumber by maceration method, the antimicrobial effect of outcome extracts from their muscle wall was investigated in two different ways: disk diffusion and well diffusion

Findings: At acetone extract of *S.horrens*, the highest growth inhibition zone for *Y. ruckeri* and *A. hydrophila* bacteria at 12 mg/mL concentration in disk diffusion method (11.10 and 13.03 mm) were seen, respectively. Different concentrations of *methanol* extract of *S. hermanni*, *H. leucospilota,* and *H. arenicola* were inactive on the tested bacteria. While Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of acetone extracts of *S.horrens* for *Y. ruckeri* and *A. hydrophila* was 0.625 and 1.25 mg/mL respectively, and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for *Y. ruckeri* and *A. hydrophila* bacteria were 2.5 and 2.5 mg/mL respectively in well diffusion method.

Conclusion: Generally, it type of extract, sea cucumber species and also bacterium strain are influenced on growth inhibition zone, MIC and MBC. Acetone extract of *S. hermanni* and *S. horrens* sea cucumbers can prevent the growth of *Y.ruckeri* bacterium tested by both methods (disk diffusion and well).

©2021 JOC. All rights reserved

NUMBER OF TABLES	NUMBER OF FIGURES	NUMBER OF REFERENCES
5	0	28

مقاله پژوهشی (علوم دریایی)

اثر ضد باکتریایی عصاره‌های دیواره عضلانی چهار گونه خیار دریایی روی برخی باکتری‌های بیماریزای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهنا محمدی‌موحد [۱]، سید عباس حسینی [۲]، پریا اکبری [۳،*]، عبدالمجید حاجی مرادلو [۴]، سید علی‌اکبر هدایتی [۵]

[۱] دانش آموخته دکتری گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده علوم شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲] استاد گروه تولید و بهره‌برداری آبزیان، دانشکده علوم شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۳] دانشیار گروه شیلات دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

[۴] استاد گروه، گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشکده علوم شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۵] دانشیار گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده علوم شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳
تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۰۵/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۰

واژگان کلیدی:
خیار دریایی
عصاره
فعالیت ضد باکتریایی
انتشار دیسک
انتشار چاهک

*نویسنده مسئول
paria.akbary@gmail.com

چکیده

پیشینه و اهداف: امروزه شکست فزاینده شیمی درمانی و مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داده شده توسط عوامل عفونی باکتری‌های بیماریزا باعث غربالگری متابولیت های ثانویه جدید با ساختارهای شیمیایی مختلف سخت پوستان دریایی، نرم تنان و اکینودرم ها با فعالیت ضد باکتری مطلوب شده است. این مطالعه با هدف بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره متانولی و استونی دیواره عضلانی چهار گونه خیار دریایی (*H.arenicola*، *Stichopus horrens*، *S.hermanni* و *H.leucospilota*) بر برخی باکتری‌های بیماریزای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncohrynchus mykiss*) از جمله *Lactococcus garvieae*، *Aeromonas hydrophila*، *Yersinia ruckeri* و *Streptococcus iniae* طراحی گردید. تحقیق به روش تجربی و invitro انجام شد.

روش‌ها: متغیرهای تجربی شامل گونه‌های خیار دریایی، غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و سویه‌های باکتریایی است. پس از تهیه عصاره‌های خیار دریایی مذکور به روش خیساندن، اثر ضد میکروبی عصاره‌های حاصل از دیواره ماهیچه‌ای آن‌ها با دو روش مختلف انتشار دیسک و انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های *Y. ruckeri* و *A. hydrophila* در غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۱/۱۰ و ۱۳/۰۳ میلی‌متر در عصاره خیار دریایی *S.horrens* مشاهده شد. غلظت‌های مختلف عصاره متانولی خیارهای دریایی *S. Hermanni*، *H. arenicola* و *H. leucospilota* در برابر تمام باکتری‌های مورد آزمایش، اثر ضدباکتری نداشتند. در حالی‌که عصاره استونی خیار دریایی *S.horrens* از رشد باکتری‌های *Y. ruckeri* و *A. hydrophila* به ترتیب در غلظت‌های ۰/۶۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری نمود و منجر به مرگ باکتری‌های *Y. ruckeri* و *A. hydrophila* به ترتیب در غلظت‌های ۲/۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شد.

نتیجه‌گیری: در کل، به نظر می‌رسد که نوع عصاره، گونه خیار دریایی و همچنین توع باکتری در تشکیل قطر هاله عدم رشد، MIC و MBC تاثیرگذار باشد. عصاره خیارهای دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* از رشد باکتری *Y. ruckeri* به دو روش انتشار دیسکی و چاهک، می‌تواند جلوگیری نماید.

مقدمه

پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی سالیان اخیر با شتاب زیادی توسعه یافته است، مزارع جدید ساخته شده‌اند و میزان تولید در واحد سطح افزایش چشمگیری پیدا کرده است. همراه چنین توسعه‌ای که با افزایش تراکم ماهی در واحد سطح روبه‌رو است، انواع بیماری‌های عفونی با سرعت هرچه تمام‌تر در جمعیت ماهیان پرورشی گسترش می‌یابند، به طوری‌که خسارتی بیش از ده درصد تولیدات سالانه را به این صنعت وارد می‌کند [۱].

عوامل میکروبی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماریزایی در عصر حاضر در مزارع پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O.mykiss*) می‌باشد [۱]. در نتیجه تکامل مداوم میکروب‌های بیماریزا و مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و مواد مؤثر ضد میکروبی وجود داشته است [۲, ۳]. لذا در چند دهه گذشته، تحقیقات جهت کشف سرنخ‌های جدید داروهای ضد میکروبی از خشکی به اقیانوس گرایش پیدا کرده است و نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی، در علوم پزشکی و دارویی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴, ۵].

در عصر حاضر ترکیبات طبیعی نقش بسیار زیادی در علوم پزشکی و دارویی ایفا می‌نمایند، در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال‌های اخیر بسیار حائز اهمیت می‌باشد. به‌نظر می‌رسد وجود ترکیباتی با ساختار استروژنی و اتم‌های هیدروژن که به‌دلیل محیط زیست جانداران دریایی، آب، چنین ساختارهایی شکل می‌گیرد آن‌ها را از سایر ترکیبات طبیعی متمایز می‌نماید [۴]. با وجود آن‌که کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی جانداران دریایی می‌گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است [۶] 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 [۷]. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد 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 می‌شود [۸]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد خیارهای دریایی منبع غنی از ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک مانند اثرات ضد باکتریایی می‌باشند. خیار دریایی (*sea cucumber*) درشاخه خارپوستان و در رده خیارسانان (*Holothuroidea*)، جزء مهمی از اکوسیستم‌های دریایی هستند و محل سکونت این جانوران دریایی، اکوسیستم‌های مرجانی می‌باشد که این مناطق دارای تولیدات و بیوماس بالایی است [۹]. موکوس تولید شده از متابولیت‌های صخره‌های مرجانی منبع دیگری از مواد آلی می‌باشند که بستر بسیار مناسبی را برای رشد باکتری فراهم می‌نماید [۱۰, ۱۱]. لذا خیار دریایی با تولید متابولیت‌های ثانویه با اثرات ضدباکتریایی، خود را در مقابل انواع میکروارگانیسم‌ها به ویژه باکتری‌ها محافظت می‌کند [۱۲].

در تحقیقاتی که اخیراً روی عصاره‌های به‌دست آمده از خیار دریایی صورت گرفته است، خواص ضدباکتریایی آن به اثبات رسیده است [۱۱, ۱۳-۱۷]. به‌عنوان مثال، در تحقیقی عصاره متانولی خیار دریایی *Holothuria leucospilota* از رشد باکتری‌های گرم منفی آزمایش Escherichia *coli*، *Salmonella typhi* و *Serratia marcescens* جلوگیری نمود اما عصاره آبی بر روی هیچ یک از باکتری‌ها اثر ضدباکتریایی نشان نداد و منجر به مرگ باکتری *Staphylococcus aureus* در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر شد [۱۱]. در پژوهش دیگر مشخص شد که که عصاره کلروفرمی خیار دریایی *H. leucospilota* در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر ضد باکتریایی در برابر باکتری *E.coli* بود. در حالی‌که عصاره هگزانی استخراج شده از این خیار دریایی، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر سبب مرگ این باکتری گردید [۱۸]. در پژوهش دیگر مشخص شد که عصاره متانولی-استونی استخراج شده از دیواره بدن خیار دریایی *Parastichopus parvimensis* دارای اثرضدباکتری در برابر باکتری‌های *E.coli* و *Bacillus subtilis* به روش انتشار دیسک بود [۱۷].

خیار دریایی گونه آبزی با ارزشی است که علاوه بر برخورداری از پروتئین کافی و ارزش غذایی بالا (۵۵ درصد پروتئین و ۲ درصد 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 می‌باشند. بیشترین کاربرد اقتصادی این آبزیان در شرق آسیا در صنایع غذاسازی و داروسازی سنتی می‌باشند. خیارهای دریایی از لحاظ ارزش غذایی دارای ترکیبات باارزشی مانند ویتامین‌های A، ویتامین B1، ریبوفلاوین، نیاسین، مواد معدنی به‌خصوص کلسیم، منیزیم، آهن و روی هستند [۱۲].

خیار دریایی گونه آبزی با ارزشی است که علاوه بر برخورداری از پروتئین کافی و ارزش غذایی بالا (۵۵ درصد پروتئین و ۲ درصد 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 می‌باشند. بیشترین کاربرد اقتصادی این آبزیان در شرق آسیا در صنایع غذاسازی و داروسازی سنتی می‌باشند [۱۲]. با توجه به خواص بیولوژیک متابولیت‌های ثانویه خیارهای دریایی، به‌ویژه اثرات ضد باکتریایی موجود در آن‌ها و از طرف دیگر شناسایی برخی از بیماری‌های باکتریایی نظیر استرپتوکوکوزیز، لاکتوکوکوزیز و یرسینوزیز در برخی از مزارع پرورش قزل آلای کشور، این مطالعه با هدف بررسی خواص

ضد باکتریایی عصاره‌های استونی و متانولی به‌دست آمده از دیواره عضلانی چهار گونه خیار دریایی (*Holothuria arenicola*، *Stichopus horrens*، *S.hermanni* و *H. leucospilota*) بر برخی باکتری‌های بیماریزای ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Lactococcus garvieae*، *Aeromonas hydrophila*، *Yersinia ruckeri* و *Streptococcus iniae*) به دوروش انتشار دیسک (Disk diffusion) و چاهک (Well diffusion) طراحی گردید.

روش پژوهش

۱. تهیه خیارهای دریایی

در بهمن ماه ۱۳۹۷ از منطقه زیر جذر و مدی دریا با موقعیت جغرافیایی ۲۵º۱۷′ N،۶۰º ۳۷′E و ۲۵º۱۶′ N،۶۰º ۳۹′E از اعماق ۱۵ الی ۲۰ متری،۹ عدد از هر چهار گونه خیار دریایی، (*H.arenicola*، *Stichopus horrens*، *S.hermanni* و *H.leucospilota*) به روش غواصی صید و درون ظروف شیشه‌ای حاوی آب دریا به آزمایشگاه انتقال داده شدند. برای شناسایی جنس و گونه خیارهای دریایی مورد مطالعه، ویژگی‌های ظاهری آن‌ها بررسی و با کلید شناسایی معتبر (فائو) مطابقت داده شد. ابتدا با برش خیار دریایی از سمت مخرج به سمت دهان، ارگان‌های داخلی تخلیه و عضلات دیواره بدن شسته شده و به تکه‌های کوچک یک سانتی‌متر بریده شدند. سپس تکه‌های بریده شده از هرگونه خیار دریایی، درون کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان عصاره‌گیری نگهداری شدند [۱۹].

۲. عصاره‌گیری از چهار گونه خیار دریایی

پس از خارج کردن خیارهای دریایی از فریزر و انجمادزدایی، ۷۵ گرم از هر گونه، به مدت ۲ روز در دستگاه انکوباتور با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا کاملاً خشک شود. سپس نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب خرد و به صورت پودر در آمدند. تمام مراحل عصاره‌گیری، در شرایط استریل و در زیر هود صورت گرفت. به منظور تهیه عصاره متانولی و استونی از هر گونه، به روش خیساندن، مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها (استون و متانول) به پودر هر گونه خیار دریایی اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و درتاریکی قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت، محلول حاصل از صافی عبور داده شد تا ذرات معلق خیارهای دریایی جدا گردد و در انتها حلال به همراه ترکیبات آلی موجود در نمونه باقی بماند. سپس به منظور تبخیر حلال، عصاره به‌دست آمده از هر حلال، به دستگاه روتاتوری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۵ منتقل و عصاره حاصل درون یخچال، تا زمان استفاده نگهداری شد [۱۹].

۳. تهیه باکتری

از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی کشور (مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی)، باکتری‌های (PTCC1884) *Lactococcus garvieae*، (PTCC1691) *Aeromonas hydrophila*، (PTCC1887) *Yersinia ruckeri* و (PTCC188) *Streptococcus iniae* به صورت لیوفیلیزه خریداری شد. سپس هر کدام از سویه‌ها به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بسته به سرعت رشد باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلنی‌های تک ایجاد شده برای انجام آزمایش استفاده شود [۱۵]

۴. سنجش خواص ضد میکروبی به روش انتشار دیسک

بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی و استونی چهار گونه خیار دریایی به روش انتشار دیسک (disc diffusion) به شرح ذیل صورت گرفت. پس از تشکیل کلنی‌های تک ایجاد شده، هر یک از سویه‌های باکتری از انکوباتور خارج شده و با استفاده از آنس کلنی‌های تک ایجاد شده به محیط کشت مولر هینتون براث در لوله آزمایش اضافه شد. این کار تا زمانی که کدورت محیط کشت با کدورت لوله نیم مک فارلند (معادل ۱/۵×۱۰^۸CFU/mL) معادل گردد، ادامه یافت. همچنین جذب نوری آن نیز با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR600، ساخت HACH آمریکا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی باکتری در ۶ پلیت حاوی محیط مولر هینتون آگار پخش شد. دیسک‌های خالی (شرکت پادتن طب، ۶/۴ میلی متر) به ۲۵ میکرولیتر از هر یک از عصاره‌های استونی و متانولی با غلظت‌های ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آغشته گردیدند. همچنین به عنوان کنترل منفی دیسک‌هایی آغشته به دی متیل سولفواکسید (Dimethyl solfoxide, DMSO) شدند. از دو دیسک آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین (۲۵ مبکروگرم در هر دیسک) و انروفلوکساسین (۳۰ میکروگرم در هر دیسک) تهیه شده از شرکت پادگین طب به عنوان کنترل مثبت در پلیت دیگر استفاده شد. هر پلیت به دو ناحیه تقسیم شد و در هر قسمت دیسک آغشته به عصاره قرار گرفت. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های مورد نظر برای هر یک از عصاره‌ها و آنتی بیوتیک‌ها با کولیس اندازه‌گیری و به واحد میلی‌متر بیان شد [۱۷, ۲۰]

۵. سنجش خواص ضد میکروبی به روش انتشار چاهک

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration,MIC) عصاره‌های متانولی و استونی چهارگونه خیار دریایی به روش انتشار چاهک (well diffusion) صورت گرفت. پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند در محیط کشت مولر هینتون براث و رسیدن جذب نوری محیط حاوی باکتری به حدود ۰/۲۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با ۱۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری با رقت معادل ۱:۳۳ در چاهک‌های میکروپلیت‌های ۹۶ تایی (ساخت کشور چین) ریخته شد. سپس از هر یک از عصاره‌های متانولی و استونی چهار گونه خیار دریایی مورد

مطالعه، ۱۰ سری رقت (serial dilution) (۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶، ۰/۰۷۸، ۰/۰۳۹ و ۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با رقت ۲:۱ تهیه شد و ۴۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده از هر عصاره در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت و به صورت سه تایی روی محیط کشت حاوی باکتری ریخته شد.

چاهک‌های کنترل مثبت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر باکتری و ۴۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و چاهک‌های کنترل منفی نیز حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون براث و ۴۰ میکرولیتر عصاره و محلول DMSO در نظر گرفته شد. جذب نوری، قبل و بعد از قرار گرفتن در انکوباتور (در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت) با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (مدل MRP4 Plus کمپانی Hiperion، اروپا) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۱, ۲۲].

به منظور تعیین کمترین غلظت کشندگی (Minimum bactericidal Concentration, MBC) از چاهک‌هایی که با اثر دادن عصاره‌ها بعد از گذشت ۲۴ ساعت در انکوباتور شفاف باقی مانده بودند و تغییری در جذب نوری آن‌ها مشاهده نشد، در کنار شعله در پلیت‌های حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و سپس پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. تشکیل کلنی باکتری در سطح پلیت، نشان دهنده این بود که عصاره دارای اثر کشندگی بر سویه باکتری نبود و تنها اثر مهار بر رشد را داشته است. در حالی‌که عدم تشکیل کلنی در سطح پلیت نشان دهنده این بود که عصاره مورد نظر دارای خاصیت کشندگی بوده و باکتری را از بین برده است و به این ترتیب حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های متانولی و استونی بر سویه باکتری مورد نظر مشخص شد [۲۳].

۶. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه (one way analysis of variance ANOVA) انجام گرفت نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون کالموگراف اسمیرنوف با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ و جهت مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده شد. و جهت محاسبات آماری از نرم افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده شد.

نتایج و بحث

مطالعات اخیر نشان داده است که عصاره‌های محلول گونه‌های مختلف خیار دریایی دارای ترکیبات فعال طبیعی نظیر ساپونین، گلوکز آمینوگلیکان، پلی‌ساکارید سولفاته و اسیدهای چرب ضروری هستند که دارای خواص زیستی متفاوتی نظیر خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدتصلب شرائین، ضدتومور و ضدمیکروبی است[۱۰, ۲۴]. بنابراین، در دهه‌های گذشته، اکثر محققان سعی کرده‌اند کیفیت و اهمیت گونه‌های خیار دریایی بومی را تعیین کنند.

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی و استونی دیواره عضلانی چهارگونه خیاردریایی و باکتری‌های مورد آزمایش بر قطر هاله عدم رشد به روش انتشار دیسکی در جدول ۱ و ۲ آورده شده است. تنها غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره متانولی خیار دریایی *S.horrens* باعث مهار رشد باکتری گرم منفی *Y. ruckeri* شد و بر مهار رشد باکتری‌های *S. iniae*, *A. hydrophila* و *L. garvieae* تاثیری نداشت. همچنین غلظت‌های مختلف عصاره متانولی (۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) سه گونه خیار دریایی (*S. hermanni*، *H. arenicola* و *H. leucospilota*)، اثری بر مهار رشد هیچ یک از باکتری‌های مورد آزمایش نداشتند.

در بین چهارگونه خیار دریایی، تنها عصاره استونی خیار دریایی *S. hermanni* در غلظت‌های ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر باعث مهار رشد باکتری *Y. ruckeri* شد (جدول ۲). در حالی‌که غلظت‌های مختلف عصاره استونی خیار دریایی *S.horrens* در مهار رشد باکتری مذکور نقش داشتند. غلظت‌های مختلف عصاره استونی خیارهای دریایی *H. arenicola* و *H. leucospilota* بر روی باکتری‌های مورد آزمایش، اثر ضدباکتری از خود نشان ندادند.

نتایج مربوط به مقایسه اثر گونه خیار دریایی دز قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره استونی در باکتری‌های مورد آزمایش به روش انتشار دیسکی در جدول ۳ نشان داد که قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های مختلف عصاره استونی دیواره عضلانی خیارهای دریایی *S.horrens* و *S. hermanni* با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($p<0/05$). بیشترین قطر هاله عدم رشد در باکتری‌های *Y. ruckeri* و *A. hydrophila* در غلظت ۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱۱/۱۰ و ۱۳/۰۳ میلی‌متر در عصاره استونی خیار دریایی *S.horrens* مشاهده شد. بیشترین قطر هاله عدم رشد در استفاده از تتراسایکلین، بر روی باکتری‌های *A. hydrophila* و *Y. ruckeri* مشاهده شد، در حالی‌که بیشترین قطر هاله عدم رشد در استفاده از انروفلوکساسین مربوط به باکتری *S. iniae* بود که اختلاف معنی‌داری را با بقیه باکتری‌های مورد آزمایش از این نظر نشان داد ($p<0/05$).

به نظر می‌رسد که هر یک از عصاره‌ها دازای ترکیبات زیستی با توان ضدباکتریایی متفاوت هستند. حضور مولد فعالی مانند ساپونین، گلوکز آمینوگلیکان، پلی ساکارید سولفاته و اسیدهای چرب ضروری را می‌توان عامل اصلی پیدایش این خواص در عصاره استونی استخراج شده از دو گونه خیار دریایی *S.horrens* و *S.hermanni* در این تحقیق دانست. لذا می‌توان انتظار داشت که با شناسایی و استخراج این ترکیبات مؤثره این عصاره اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری به جای گذاشت.

جدول ۱: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی چهار گونه خیار دریایی و باکتری‌های مورد آزمایش بر قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) به روش انتشار دیسکی

Table 1: Table 1: Comparison of the effect of different concentrations of methanolic extracts of four species of sea cucumber and the tested bacteria on the diameter of the growth inhibition zone (mm) by disk diffusion method

گونه خیار دریایی و غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	*Y. ruckeri*	*S. iniae*	*A. hydrophila*	*L. garvieae*
S. Hermanni				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	–	–
۱۲	–	–	–	–
S.horrens				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	–	–
۱۲	۸/۱۶±۰/۱۵ [a]	–	–	–
H. leucospilota				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	–	–
۱۲	–	–	–	–
H. arenicola				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	–	–
۱۲	–	-	–	–
آنتی‌بیوتیک	**قطرهاله عدم رشد (میلی‌متر)**			
تتراسایکلین	۱۸/۰۳±۰/۱۵ [a]	۷/۰۰±۰/۲۰ [c]	۱۹/۰۳±۰/۱۵ [a]	۶/۰۰±۰/۲۰ [d]
انروفلوکساسین	۱۰/۰۰±۰/۲۰ [c]	۱۷/۰۳±۰/۱۵ [a]	۷/۰۳±۰/۱۵ [d]	۱۶/۰۳±۰/۱۵ [b]

در هر ردیف، ارقام نشانه گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشند (p<۰/۰۵).-عدم مهار کنندگی

جدول ۲: مقایسه اثر غلظت‌های مختلف عصاره استونی چهار گونه خیار دریایی و باکتری‌های مورد آزمایش بر قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) به روش انتشار دیسکی

Table 2: Table 2: Comparison of the effect of different concentrations of Estonian extracts of four species of sea cucumber and the tested bacteria on the diameter of the growth inhibition zone (mm) by disk diffusion method

گونه خیار دریایی و غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)			
	Y. ruckeri	*S. iniae*	*A. hydrophila*	*L. garvieae*
S. Hermanni				
۴	–	–	–	–
۸	۹/۱۳±۰/۱۸ [a]	–	–	–
۱۲	۱۱/۰۷±۰/۱۴ [a]	–	–	–
S.horrens				
۴	–	–	۸/۰۳±۰/۱۵ [a]	–
۸	۸/۱۰±۰/۱ [b]	–	۱۱/۱۶±۰/۱۵ [a]	–
۱۲	۱۱/۱۰±۰/۱ [b]	–	۱۳/۰۳±۰/۱۵ [a]	–
H. leucospilota				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	–	–
۱۲	–	–	–	–
H. arenicola				
۴	–	–	–	–
۸	–	–	-	–
۱۲	–	-	-	–

در هر ردیف، ارقام نشانه گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشند (p<۰/۰۵).-عدم مهار کنندگی

جدول ۳:. مقایسه اثر گونه خیار دریایی دز قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) ایجاد شده توسط غلظت‌های مختلف عصاره استونی در باکتری‌های مورد آزمایش به روش انتشار دیسکی

Table 3: Comparison of the effect of sea cucumber species on growth inhibition zone diameter (mm) caused by different concentrations of Estonian extract in bacteria tested by disk diffusion method

باکتری و گونه خیار دریایی	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر)		
	۴	۸	۱۲
Y. ruckeri			
S. Hermanni	-	۹/۱۳±۰/۱۸ a	۱۱/۰۷±۰/۱۴ b
S.horrens	-	۸/۱۰±۰/۱ b	۱۱/۱۰±۰/۱ a
H. leucospilota	-	–	–
H. arnicola	-	–	–
S. iniae			
S. Hermanni	-	-	-
S.horrens	-	–	–
H. leucospilota	-	–	–
H. arnicola	-	-	-
A. hydrophila			
S. Hermanni	-	–	–
S.horrens	۸/۰۳±۰/۱۵ a	۱۱/۱۶±۰/۱۵ a	۱۳/۰۳±۰/۱۵ a
H. leucospilota	–	–	–
H. arnicola	-	–	–
L. garvieae			
S. Hermanni	-	-	-
S.horrens	-	-	-
H. leucospilota	-	-	-
H. arnicola	-	-	-

در هر ردیف، ارقام نشانه گذاری شده با حروف لاتین مختلف دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشند (p<۰/۰۵).-عدم مهار کنندگی

Mokhlesi و همکاران (۲۰۱۲) [۱۶] گزارش کردند که عصاره متانولی گونه *H.leucospilota* متعلق به سواحل بستانه در خلیج فارس فاقد اثرات ضد باکتریایی بود. همچنین در تحقیق دیگر گزارش شد که هیچ یک از غلظت‌های مختلف عصاره متانولی، هگزان و کلزوفرمی دیواره بدن خیار دریایی *H.leucospilota* اثر ضدباکتریایی در برابر باکتری *B.subtilis* از خود نشان نداد [۱۵] که با تحقیق حاضر همخوانی داشتند. با بررسی فعالیت ضد باکتریایی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی *S.hermanii* مشاهده شد که ساپونین استروئیدی و گلیکوزید استروئیدی بر باکتری *Staphylococcus aureus* شد [۲۵]. در مطالعه دیگری فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره الکلی برخی گونه خیار دریایی مانند *Actinopyga echinites*، *A. miliaris* و *A. scabra* نشان داد که به استثنای گونه باکتری *Bacillus* sp سایر گونه باکتری‌های مورد مطالعه مانند *E.coli* و *A.hydrophila* نسبت به عصاره‌های مورد آزمایش حساس بودند [۱۳] که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. به نظر می‌رسد که اثر ضدمیکروبی این عصاره، احتمالاً به دلیل حضور عوامل میکروبی نظیر ساپونین های استروئیدی در عصاره خیار دریایی است.

میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی و استونی چهار گونه خیار دریایی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش به روش چاهک به ترتیب در جدول ۴ و ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تنها عصاره متانولی خیار دریایی *S.horrens* از رشد باکتری *Y.ruckeri* در غلظت ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری نمود و منجر به مرگ باکتری مذکور در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش چاهک شد. همچنین عصاره استونی خیارهای دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* از رشد باکتری‌های *Y. ruckeri* به ترتیب در غلظت ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری نمود و منجر به مرگ باکتری *Y.ruckeri* به ترتیب در غلظت ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش چاهک شد. همچنین عصاره استونی خیار دریایی *S.horrens* به ترتیب در غلظت ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به مهار رشد و مرگ باکتری *A.hydrophila* گردید و در غلظت‌های مختلف، مانع مهار رشد باکتری‌های گرم مثبت *L. garvieae* و *S. iniae* نشد (جدول ۵ و شکل ۳). رسم نمودار جذب نوری غلظت‌های مختلف عصاره استونی خیارهای دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* بر باکتری‌های *Y.ruckeri* و *A.hydrophila* و عصاره متانولی خیار دریایی *S.horrens* بر باکتری *Y.ruckeri* نشان داد که در رقت‌های بالاتر با کاهش غلظت عصاره میزان جذب نوری افزایش یافته است. بیشترین جذب نوری در غلظت ۰/۰۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دو گونه خیار دریایی مشاهده شد.

نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که تنها عصاره متانولی خیار دریایی *S.horrens* از رشد باکتری *Y.ruckeri* در غلظت

۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری نمود و منجر به مرگ باکتری مذکور در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش انتشار چاهک شد. همچنین عصاره متانولی سه گونه دیگر خیارهای دریایی در غلظت‌های مختلف، اثری بر فعالیت باکتریواستاتیک و باکتریسیدی چهار سویه باکتری مورد مطالعه نداشتند. همسو با نتایج این تحقیق، بررسی اثر ضدباکتری عصاره متانولی، متانولی/ آبی خیار دریایی *H. tubulosa* بر سویه‌های باکتری *E.coli*، *S. typhimurium*، *S. aureus* و *B. cereus* نشان دادکه اثر باکتریواستاتیک عصاره‌های خیار دریایی مذکور بیشتر از اثر باکتریسیدی آن‌ها بود و باکتری *B.cereus* در برابر غلظت‌های مختلف عصاره‌های خیار دریایی مقاومت نشان داد[۲۶]. همچنین در تحقیقی مشخص شد که عصاره آبی و متانولی *H.arta* و *H.edulisa* اثری بر مهار شد باکتری‌های مورد مطالعه نداشتند [۲۷]. در پژوهش‌های دیگر با بررسی اثر عصاره متانولی خیار دریایی با بررسی اثر عصاره متانولی خیارهای دریایی *Bohadschia marmorata* [۱۶] و *Bohadschia marmorata* و *H. H.leucospilota* [۱۸] مشخص شد که عصاره متانولی در هیچ یک از غلظت‌های به‌کار برده شده اثر ضدباکتری از خود نشان نداد. به نظر می‌رسد هر یک از عصاره‌ها دارای ترکیبات زیستی با توان ضدباکتریایی متفاوت هستند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان ترکیبات آنتی‌بیوتیکی مطرح نمود.

جدول ۴: میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره متانولی چهار گونه خیار دریایی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش به روش انتشار چاهک

Table 4: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) of methanolic extracts of four species of sea cucumber on bacteria tested by well diffusion method

گونه خیار دریایی	MIC و MBC (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)							
	Y. ruckeri		*L. garvieae*		*A. hydrophila*		*S. iniae*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. Hermanni	-	-	-	-	-	-	-	-
S.horrens	۰/۶۲۵	۵	-	-	-	-	-	-
H. leucospilota	-	-	-	-	-	-	-	-
H. arnicola	-	-	-	-	-	-	-	-

جدول ۵: میزان حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره استونی چهار گونه خیار دریایی بر روی باکتری‌های مورد آزمایش به روش چاهک

Table 5: Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MBC) of Estonian extracts of four species of sea cucumber on bacteria tested by well

گونه خیار دریایی	MIC و MBC (میلی گرم بر میلی لیتر)							
	Y. ruckeri		*L. garvieae*		*A. hydrophila*		*S. iniae*	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
S. Hermanni	۱/۲۵	۱/۲۵	-	-	-	-	-	-
S.horrens	۰/۶۲۵	۲/۵	-	-	۱/۲۵	۲/۵	-	-
H. leucospilota	-	-	-	-	-	-	-	-
H. arnicola	-	-	-	-	-	-	-	-

از طرف دیگر، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره استونی خیارهای دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* از رشد باکتری‌های Y. ruckeri به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جلوگیری نمود و منجر به مرگ باکتری *Y. ruckeri* به ترتیب در غلظت ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شد. همچنین عصاره استونی خیار دریایی *S.horrens* به ترتیب در غلظت‌های ۱/۲۵ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به مهار رشد و مرگ باکتری *A.hydrophila* گردید و در غلظت‌های مختلف، مانع مهار رشد باکتری‌های *L. garvieae* و *S. iniae* نشد. همسو با نتایج این تحقیق، عصاره استونی خیار دریایی *H.parva* دارای اثر باکتریواستاتیک و باکتریسیدی بر روی سه باکتری *E.coli*، *Pseudomonas aeroginosa* و *Enterococus fecalis* بود [۲۸]. به نظر می‌رسد که حلال استون بر خلاف حلال متانول، توانایی جدا کردن ترکیبات بیولوژیکی مؤثر موجود در غلظت‌های مختلف خیارهای دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* را دارد تا آن ترکیبات بتوانند با عبور از غشای باکتری *Y.ruckeri* و *A.hydrophila* به اندام حساس باکتری آسیب برسانند و موجب عدم رشد و در نهایت مرگ باکتری شوند. همچنین می‌توان گفت که غلظت‌های مختلف عصاره، گونه خیار دریایی، نوع عصاره و همچنین توع باکتری در فعالیت ضدباکتریایی تاثیرگذار هستند [۱۱].

نتیجه‌گیری

در کل، نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره، گونه خیار دریایی و همچنین توع باکتری در تشکیل قطر هاله عدم رشد، MIC و MBC تاثیرگذار باشد. بنابراین عصاره استونی دو گونه خیار دریایی *S.hermanni* و *S.horrens* بهترین طیف اثر باکتری کش را در برابر باکتری *Y.ruckeri* با استفاده از هر دو روش انتشار دیسک و انتشار چاه نشان داد.

مشارکت نویسندگان

کلیه نویسندگان وظیفه مکاتبات و پاسخگویی به نظرات داوران را به اینجانب به عنوان نویسنده مسئول محول نموده‌اند و تمام نگارندگان در تولید مقاله مشارکت نموده‌اند و مسئولیت محتوای مقاله را بر عهده می‌گیرند.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از رساله دکترای رشته شیلات بوده و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به انجام رسیده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری مسئول آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز جناب آقای مهندس محمد سعید فریدونی که امکانات این پژوهش را فراهم آوردند، تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

«هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

References

1. Soltani M, Pirali E, Shayan P, Eckert B, Rouholahi S, Sadr SN. Development of a Reverse Line Blot Hybridization method for Detection of some treptococcal/Lactococcal Species, the causative agents of Zoonotic Streptococosis/Lactococosis in farmed fish. *Iran J Microbiol*. 2012;**4**(2):70-74.
2. Austin B, Austin DA. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. (3rd ed.). Springer Netherlands New. York, USA1999.
3. Bercovier H, Ghittino C, Eldar A. Immunization with bacterial antigens: infections with streptococci and related organisms.In: Gudding, R., Lillehaug, A., Midtlyng, P.J., Brown, F.(Eds, 1sd ed). Fish Vaccinology. Karger.Basel.Switzeland. UK1997.
4. Mancini I, Defant A, Guella G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. *Anti Infect Agent Med Chemistr*. 2007;**6**(1):17-48. **doi:** 10.2174/187152107779314151
5. Murniasih T, Putra MY, Pangestuti R. Antioxidant Capacities of Holothuria Sea cucumbers. *Annual Bogor*. 2015;**19**:21-26.
6. Munro MHG, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJH, Lill RE, Li S. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Biotechnol*. 1999;**70**:15-25. **doi:** 10.1016/S0079-6352(99)80093-9
7. Newman DJ, Cragg GM. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J Nat Prod*. 2004;**67**(8):1216-1238. **doi:** 10.1021/np040031y **pmid:** 15332835
8. Harvey A. The continuing value of natural products to drug discovery. *GIT Laborator*. 2001;**5**(6):284-285.
9. Faulkner K, Lecomber AR, Downes SL, Mokhtari M. Optimisation of patient doses in programmable dental panoramic radiography. *Dentomaxillofac Radiol*. 2000;**29**(2):107-112. **doi:** 10.1038/sj/dmfr/4600513 **pmid:** 10808225
10. Mashjoor S, Yousefzadi M, Pishevarzad F. In vitro biological activities of Holothurians edible sea cucumbers in the Persian Gulf. *India J Geo Marine Sci*. 2018;**47**(7):1518-1526.
11. Nazemi M, Moradi Y, Gazari S, Legzaee F, Karimpoor M. Investigations of Antibacterial Activity of Methanol and Aqueous Extracts of the Body Wall of Sea Cucumber Holothuria leucospilota on some Human Pathogenic Bacteria. *Avicenna J Clinic Med*. 2016;**23**(1):74-82.
12. Bordbar S, Anwar F, Saari N. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods--a review. *Mar Drugs*. 2011;**9**(10):1761-1805. **doi:** 10.3390/md9101761 **pmid:** 22072996
13. Abraham TJ, Nagarajan J, Shanmugam SA. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *India J Marine Sci*. 2002;**31**(2):161-164.
14. Adibpour N, Nasr F, Nematpour F, Shakouri A, Ameri A. Antibacterial and Antifungal Activity of Holothuria leucospilota Isolated From Persian Gulf and Oman Sea. *Jundishapur J Microbiol*. 2014;**7**(1):e8708. **doi:** 10.5812/jjm.8708 **pmid:** 25147657
15. Farjami B, Nematollahi MA, Moradi Y, Irajian GR, Nazemi M, Ardebili A, et al. Antibacterial activity of the sea cucumber Holothuria leucospilota. *Iran J Microbiol Clinic Microbiol*. 2015;**3**(1):225-230.
16. Mokhlesi A, Saeidnia FE, Gohari AR, Shahverdi AR, Nasrolahi A, Farahani F, et al. Biological activities of the sea cucumber Holothuria leucospilota. *Asia J Animal Veterinar Advanc*. 2012;**7**(3):243-249. **doi:** 10.3923/ajava.2012.243.249
17. Villasin J, Pomory CM. Antibacterial activity of extracts from the body wall of Parastichopus parvimensis (Echinodermata: Holothuroidea). *Fish Shellfish Immunol*. 2000;**10**(5):465-467. **doi:** 10.1006/fsim.2000.0265 **pmid:** 10994590
18. Farjami B, Nematollahi MA, Moradi Y, Irajian GR. Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (Holothuria leucospilota) of Persian Gulf on the Escherichia coli. *Iran J Med Microbiol*. 2016;**8**(1):26-32.
19. Ridzwan BH, Kaswandi MA, Azman Y, Fuad M. Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacol*. 1995;**26**(7):1539-1543. **doi:** 10.1016/0306-3623(95)00041-0
20. Connie R, Mahon GM. Textbook of diagnostic microbiology. (5rd Ed.). Elsevier Health Sciences. London, UK2000.
21. Thornsberry C, McDougal LK. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol*. 1983;**18**(5):1084-1091. **doi:** 10.1128/jcm.18.5.1084-1091.1983 **pmid:** 6643661
22. Tsai PJ, Tsai TH, Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase

activity of Streptococcus sobrinus. *Food Chemistr*. 2007;**105**(1):311-316. **doi:** 10.1016/j.foodchem.2006.11.051

23. Kang CG, Hah DS, Kim CH, Kim YH, Kim E, Kim JS. Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. *Toxicol Res*. 2011;**27**(1):31-36. **doi:** 10.5487/TR.2011.27.1.031 **pmid:** 24278548
24. Nobsathian S, Tuchinda P, Sobhon P, Tinikul Y, Poljaroen J, Tinikul R, et al. An antioxidant activity of the whole body of Holothuria scabra. *Chemic Biolog Technol Agricultur*. 2017;**4**:1-5. **doi:** 10.1186/s40538-017-0087-7
25. Salari Z, Sourinejad I, Nazemi M, Yousefzadi M. Antibacterial activity of Saponin extracted from Sea cucumber (Stichopus hermanni) collected from the Persian Gulf. *Iran J Fisheries Sci*. 2018;**27**:58-70.
26. Künili IE, Çolakoğlu FA. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Sea Cucumber (Holothuria tubulosa, Gmelin 1791) Extracts. *COMU J Marine Sci Fisher*. 2018;**1**(2):66-71.
27. Dobretsov S, Al-Mammari IM, Soussi B. Bioactive Compounds from Omani Sea Cucumbers. *J Agriculture Marine Sci*. 2009;**14**:49-53. **doi:** 10.24200/jams.vol14iss0pp49-53
28. Ebrahimi H, Vazirizadeh A, Nabipour I, Najafi A, Tajbakhsh S, Nafisi Bahabadi M. In vitro study of antibacterial activities of ethanol, methanol and acetone extracts from sea cucumber Holothuria parva. *Irain J Fisheries Sci*. 2018;**17**(3):542-551.

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Mohammadi Movahed, M., PhD Graduated of Fisheries and Aquatic Ecology group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran.

(*mohanamohammadi.m@gau.ac.ir*

.....

Hosseini, S. A., Professor of Fisheries and Aquatic Ecology group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

(

0000-0001-5694-0366

Akbary, P., Associate of Fisheries groups,, Department of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chahbahar, Iran

(*akbary@cmu.ac.ir*

0000-0001-9108-8690

Hajimoradloo, A.M., Professor of Fisheries and Aquaculture group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

(*a.hajimoradloo@ gau.ac.*ir

.....

Hedayat, S.A.A., Associate of Fisheries and Aquatic Ecology group, Faculty of Fisheries and Environment Sciences, Gorgan University of Agricultural, Science and Natural Resources, Gorgan, Iran

✉ *hedayati@gau.ac.ir*

0000-0001-7658-5314

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Citation (Vancouver) *Mohammadi Movahed M, Hosseini SA, Akbary P, Hajimoradloo A, Hedayati SAA. Antibacterial Effect of the Extracts of the Muscle Wall of Four Sea Cucumber (Holothuria sp) Species on Some rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) Pathogenic Bacteria. J Oceanography. 2021; 12(47): 52-62*

http://doi.org/10.52547/joc.12.47.52

http://joc.inio.ac.ir/article-1-1596-fa.html

https://orcid.org/0000-0002-8311-5238

COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.