بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر روی باکتری های *استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس*

مهناز محمدی[1*]

۱-استادیار، گروه زیست شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

یافته / دوره ۲۴ / شماره ۴ / زمستان ۱۴۰۱ / مسلسل ۹۴

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۸/۲۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۱۹

مقدمه: مطالعات فراوانی در زمینه آثار سوء مصرف مواد آنتی باکتریال صنعتی و شیمیایی بر سلامت بدن انسان و همچنین مقاومت طیف وسیعی از گونه های باکتریایی به مواد آنتی بیوتیک صورت گرفته است. خیار دریایی یکی از جانوران مهم آبزی است که دارای خواص درمانی و تغذیه ای و ضد باکتریایی می باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر روی باکتری های استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس است.

مواد و روش‌ها: فعالیت ضد باکتری عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم بر روی سه گونه باکتری به کمک روش های استاندارد انتشار دیسک، چاهک گذاری، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه فعالیت ضد باکتریایی سه نوع باکتری از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون مقایسات دوبدوی شفه استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، کـه عـصاره متانولی خیار دریایی با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، همچنین نانو ذرات سلنیوم با غلظت ۱میلی گرم در میلی لیتر ، و ترکیب غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره خیار دریایی با ۱ میلی گرم در میلی لیتر از نانو ذرات سلنیوم ، دارای بهترین اثـــر ضـــد بـــاکتریایی بر روی سه باکتری مورد نظر بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری: استفاده ترکیبی از عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم دارای میزان بالاتری از خاصیت آنتی باکتریال است.

واژه‌های کلیدی: خیار دریایی، نانوذرات سلنیوم،آنتی بیوتیک، باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه، باسیلوس سرئوس.*

***آدرس مکاتبه: اسلامشهر، دانشگاه آزاداسلامی، گروه زیست شناسی.**

پست الکترونیک: mh_mohamadi@yahoo,com

مقدمه

نگاهی به تاریخچه بیماری های انسان نشان می دهد که بیماری های عفونی یکی از مهم ترین عوامل درگیر کننده انسان ها بوده است. قبل از اواسط قرن نوزدهم، میکروارگانیسم های زیادی شناسایی شدند که مسئول ایجاد عفونت های مختلفی بودند. از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری های عفونی، باکتری ها هستند. یکی از باکتری های بیماری زا، *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureus*) است. *استافیلوکوک* ها باکتری های گرم مثبتی هستند که توسط کوکسی های منفرد در بیش از یک سطح تقسیم می شوند (۱). *استافیلوکوکوس ارئوس* یکی از جنس های *استافیلوکوک* ها می باشد که قادر است در هر بخشی از بدن به وجود آید و بیماری های مختلفی از جمله بیماری های جلدی و سیستمیک، را ایجاد نماید (۲-۴). تاکنون برای از بین بردن سمیت و عفونت های حاصل از *استافیلوکوکوس ارئوس*، آنتی بیوتیک های مختلفی از قبیل بتالاکتام ها، آمینوگلیکوزیدها، ماکرولیدها و غیره تولید و مورد استفاده قرار گرفته اند. اما متاسفانه باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* پس از مدتی نسبت به این آنتی بیوتیک ها مقاوم شده است (۵). *کلبسیلاها* باکتری های گرم منفی، غیر متحرک، اکسیداز منفی و استوانه ای شکل هستند. *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumonia*) شایع ترین گونه بیماریزا در جنس *کلبسیلا* است. به دلیل محدود بودن انتخاب های درمانی، علاوه بر چالش های کنترل عفونت که در حال افزایش هستند، عفونت های ناشی از این ارگانیسم، پزشکان را با چالش های جدی در درمان روبرو کرده است (۶،۷). *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) باکتری گرم مثبت و اسپورزایی است که به عنوان عامل مسمومیت در مواد غذایی شناخته شده است. انتشار وسیع این باکتری ها ناشی از مقاومت اسپورها به استرس های گوناگون و بقاء طولانی آنها در شرایط نامساعد است (۸). ظرفیت میکروارگانیسم ها در کسب مقاومت علیه مواد ضد میکروبی از تخیل ما پیشی گرفته است. در برخی موارد، عوامل ضد میکروبی که پیش تر موثر بوده اند، در حال حاضر به اندازه کافی مفید نیستند. از این رو در نسل جدید علم پزشکی تمایل شدیدی به شناسایی و استفاده از مواد طبیعی با خاصیت آنتی بیوتیکی برای مقابله با عوامل بیماری زای انسانی دیده می شود (۹).

به دلیل استفاده از ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال‌های اخیر اهمیت بیشتری یافته است. در علم پزشکی جدید تمایل شدیدی به شناسایی و استفاده از مواد طبیعی با خاصیت آنتی بیوتیکی برای مقابله با عوامل بیماری زای انسانی دیده می شود. خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهند و از نظر رده‌بندی متعلق به شاخه خارپوستان، رده خیارسانان و خانواده *Holothuroidea* هستند. موکوس تولید شده حاصل از متابولیت‌های صخره‌های مرجانی منبع دیگری از مواد آلی می‌باشند، که تمام عوامل فوق، بستر بسیار مناسبی را برای رشد باکتری‌ها فراهم می‌نماید (۱۰،۱۱). بنابراین باکتری ها یکی از تهدید کنندگان جانداران دریایی از جمله خیارهای دریایی هستند، به همین دلیل آن ها متابولیت‌های ثانویه متعددی با اثرات ضدباکتریایی تولید می‌نمایند (۱۲).

در سال‌های اخیر به دلیل استفاده از نانو ذرات فلزی به عنوان ترکیبات ضد باکتری روند رو به رشدی داشته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانو ذره باعث اتصال نانو ذرات به سطح سلول، در نتیجه باعث مرگ سلول می شود (۱۳). به علاوه این نانو ذرات به منظور دارو رسانی هدفمند آنتی‌بیوتیک‌ها به محل عفونت نیز استفاده شده‌اند. سلنیوم یکی از املاح معدنی کمیاب و ضروری برای بدن است که در قالب سلنوپروتئین‌ها در ساختار آنزیم‌های موثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سم

زدایی و سوخت و ساز بدن فعالیت می‌کند و دریافت روزانه کمتر از ۴۰ میکروگرم از آن سبب کاهش عملکرد سیستم ایمنی و افزایش مرگ و میر می‌شود (۱۴). در طول دهه‌ی گذشته، محققین به نانوذرات سلنیوم به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت پایین و خواص درمانی متعدد، بیش از پیش توجه نشان‌داده‌اند. استفاده ترکیبی از نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها به ما این امکان را می‌دهد که سمیت و عوارض ناخواسته‌ی هر دو را بر سلول‌های انسانی کاهش دهیم؛ زیرا دو ماده در ترکیب با هم اثرات ضدمیکروبی یکدیگر را افزایش داده و نیاز به استفاده از دوزهای بالای هرکدام را کاهش می‌دهند. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذرات سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر روی باکتری های *استافیلوکوکوس ارئوس، کلبسیلا پنومونیه و باسیلوس سرئوس* است.

مواد و روش ها

فعالیت ضد باکتری عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم بر روی سه گونه باکتری به کمک روش های استاندارد انتشار دیسک، چاهک گذاری، تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی و تعیین حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت.

جمع آوری نمونه های خیار دریایی

۱۰ عدد از گونه خیار دریایی مورد نظر، هر یک به وزن تقریبی ۰/۳۵ کیلوگرم، از عمق ۱۰ تا ۳۰ متری اطراف جزیره لارک جمع آوری و با استفاده از یخ به ساحل منتقل گردید. به محض رسیدن به ساحل نمونه ها منجمد و با استفاده از یخ خشک به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه تهران منتقل شد.

عصاره گیری خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی در ابتدا به صورت طولی برش داده شد و اندام های داخلی و گنادها خارج گردید و عضلات بدن به اندازه های ۱ سانتی متر قطعه قطعه شد، سپس نمونه ها (عضلات بدن و گنادها) به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفتند. نمونه های خشک شده توسط آسیاب پودر گردیدند. و۶۰۰ میلی گرم از پودر با ۱۲۰۰ سی سی از حلال پودر آماده شده با سه حلال هگزان، کلروفرم و متانول به مدت ۶ ساعت سوکسله شدند. سپس حلال ها در هر مرحله تحت شرایط خلاء تبخیر شد. نمونه حاصل متانول بعد از تبخیر در خلاء، بصورت هم حجم با آب مقطر و ان - بوتانل مخلوط و سپس جهت جداسازی فاز مورد نظر، محلول مورد نظر دکانته گردید. در نهایت فازهای حاصل از دکانته جهت حذف حلال تحت خلاء قرار گرفت (۱۵).

تهیه نانوذرات سلنیوم

نانوذرات سلنیوم به روش احیای شیمیایی نمک سدیم سلنیت با اسیدآمینه ال سیستئین طبق روش گزارش شده ازسوی Fesharaki و همکاران سنتز شد (۱۲). برای این کار ابتدا ۰/۱۷۳۸گرم از نمک سدیم سلنیت در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردید. همچنین برای تهیه محلول ال سیستئین ۵۰ میلی مولار، مقدار ۰/۳۰۴۴ گرم آن در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. ۱۰ میلی لیتر از محلول سدیم سلنیت حاصل به یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل شد نمک سدیم سلنیت در آب مقطر حل گردید. همچنین محلول ال سیستئین تهیه شد. از محلول سدیم سلنیت حاصل به یک بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۴۰ میلی لیتر از محلول ال سیستئین به صورت قطره قطره با پیپت مدرج، به بالن محتوی محلول سدیم سلنیت اضافه شد و با افزودن آب مقطر، به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر افزایش پیدا کرد. ترکیب فوق به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تحت هم زدن مداوم با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد از طی این مدت محلول کلوئیدال نانوذرات سلنیوم به رنگ قرمز تا آجری تشکیل شد که به وسیله دستگاه اون در دمای۲۵-۳۰ درجه سانتی گراد خشک شد و پودر نانوذرات خشک به منظور مطالعات بعدی جمع آوری و نگهداری گردید.

بررسی فعالیت ضد میکروبی نانو ذرات سنتز شده

سویه باکتری های استاندارد مورد بررسی در این تحقیق، *استافیلوکوکوس ارئوس* (۲۵۹۲۳) ،*کلبسیلاپنومونیه* (۱۲۹۰) و *باسیلوس سرئوس* (۱۲۴۷) از بانک میکروبی دانشگاه تهران تهیه شد. سپس باکتری ها بعد از کشت خطی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سیلسیوس در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلنی های تک ایجاد شده برای آزمایش استفاده شود (۱۶).

به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم از روش Agar disc diffusion استفاده شد. در این روش یک کلونی از باکتری های *کلبسیلاپنومونیه* ، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *باسیلوس سرئوس* در ۵ میلی لیتر محیط مایع مولر هینتون براث تلقیح و تا زمان تطابق کدورت محیط ها با نیم مک فارلند در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس باکتری های رشد یافته در محیط مایع، با استفاده از سواپ استریل در پلیت های حاوی مولر هینتون آگار به صورت سه جهتی کشت چمنی داده شدند. عصاره خیار دریایی به منظور استریل شدن از فیلتر های ۰/۲۲ میکرون عبور داده شدند. سپس به دیسک های استریل تهیه شده از شرکت پادتن طب، غلظت های مورد آزمایش از عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم را به کمک سمپلر تلقیح و سپس برای خشک شدن در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا برای دیسک گذاری آماده شوند. سپس دیسک های آماده شده بر روی پلیت های کشت داده شده قرار گرفته و پلیت ها به منظور ایجاد شرایط مناسب باکتری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. در این پژوهش سنجش مقاومت به آنتی بیوتیک ها در باکتری های مذکور با روش دیسک دیفیوژن با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار و دیسک های آنتی بیوتیکی که از شرکت پادتن طب ایران خریداری شده بود، صورت گرفت. دیسک های آنتی بیوتیک توسط پنس استریل در کنار شعله در پلیت های پاساژ داده شده از باکتری های نام برده، قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حساسیت هر کدام از باکتری ها نسبت به داروهای ضد میکروبی از طریق اندازه گیری منطقه هاله عدم رشد در اطراف هر دیسک مشخص گردید.

تعیین حداقل رقت مهار کنندگی (MIC)

آزمایش MIC بر طبق استاندارد ویژه آن که توسط CLSI منتشر شده است، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از هر باکتری در مرحله قبل (با تراکم 10× 1-2 CFU 6 در هر میلی لیتر از MHB) به طور جداگانه با سه بار تکرار در ستون های سه تایی درون چاهک های پلیت های ۹۶ خانه استریل از جنس پلی استیرن از ردیف A تا F ریخته شد. در ادامه ۵۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث درون هر یک از ۹۶ چاهک میکروپلیت ریخته شد. سپس به اولین چاهک هر ردیف ۵۰ میکرولیتر عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم (از دامنه غلظت های استفاده شده در آزمایشات قبلی) اضافه گردید و از خانه دوم به سوم و به همین طریق تا خانه دهم رقیق شدند. پس از انجام مراحل آزمایش پلیت ها را به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده و بعد از گذشت زمان ۲۴ ساعت OD آن ها توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانو متر خوانده شد. سپس از طریق فرمول زیر درصد مهار را برای هر یک از چاهک ها محاسبه می کنیم (۱۶).

تعیین حداقل غلظت کشندگی

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

$$\text{درصد مهاری} = \frac{\text{جذب هر یک نمونه ها}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times 100$$

آنالیز آماری

برای مقایسه آماری پارامترهای مورد نظر بین گروه ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون شفه برای مقایسات دوبدو استفاده شد. کلیه آنالیز آماری با استفاده از نرم افزارهای GB-Stat نسخه ۵ و SPSS نسخه ۱۶ استفاده شد و سطح معنی داری معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد، که عصاره متانولی خیار دریایی با غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر، همچنین نانو ذرات سلنیوم با غلظت ۱میلی گرم در میلی لیتر ، و ترکیب غلظت ۱۰میلی گرم در میلی لیتر عصاره خیار دریایی با ۱میلی گرم در میلی لیتر از نانو ذرات سلنیوم ، دارای بهترین اثر ضد باکتریایی را بر روی سه باکتری مورد نظر داشته است.

بررسی خواص آنتی باکتریایی عصاره خیار دریایی

در این پژوهش اثر آنتی باکتریایی عصاره متانولی خیار دریایی که از عصاره های دیگر آن (هگزانی و کلرفرومی) اثر دهی بهتری داشت، بر سه باکتری بیماری زای انسانی بررسی گردید. در هر پلیت مورد بررسی از نمونه های باکتریایی غلظت های ۲/۵ ، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره خیار دریایی به همراه دیسک کنترل منفی (آب مقطر) قرار داده شد و میانگین هاله های عدم رشد محاسبه گردید. نتایج حاصله در این مرحله نشان دهنده فعالیت آنتی باکتریال عصاره متانولی خیار دریایی بر فعالیت هر ۳ نمونه باکتریایی مورد بررسی می باشد. بهترین فعالیت آنتی باکتریال در غلظت۱۰ میلی گرم در هر میلی لیتر عصاره خیار دریایی در مقابله با باکتری باسیلوس سرئوس مشاهده شد. (جدول۱)

جدول ۱. میانگین هاله عدم رشد باکتری ها در مجاورت عصاره متانولی خیار دریایی بر حسب میلی متر

غلظت / باکتری	۱۰ mg/ml	۷/۵ mg/ml	۵ mg/ml	۲/۵ mg/ml
استافیلوکوکوس ارئوس	۱۲ mm	۱۰ mm	۱۰ mm	۸ mm
باسیلوس سرئوس	۱۳ mm	۱۰ mm	۱۰ mm	۷ mm
کلبسیلا پنومونیه	۱۱ mm	۱۰ mm	۹ mm	۷ mm

بررسی خواص آنتی باکتریایی نانوذرات سلنیوم

سه باکتری مورد بررسی در مجاورت نانو ذره سلنیوم قرار داده شد و رقت های مورد استفاده از این ماده ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد. طبق نتایج به دست آمده، بهترین نتیجه حاصله مربوط به مجاورت نانو ذرات سلنیوم در غلظت ۱ میلی گرم در هر میلی لیتر با باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* مشاهده شد (جدول ۲).

جدول ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری ها در مجاورت نانو ذرات سلنیوم

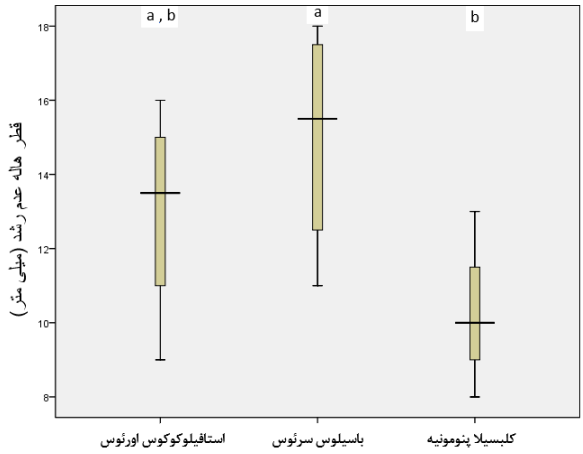
غلظت / باکتری	۱ mg/ml	۰/۷۵ mg/ml	۰/۵ mg /ml	۰/۲۵ mg/ml
استافیلوکوکوس ارئوس	۱۲ mm	۱۰ mm	۹ mm	۷ mm
باسیلوس سرئوس	۹ mm	۹ mm	۸ mm	۷ mm
کلبسیلا پنومونیه	۱۰ mm	۱۰ mm	۹ mm	۷ mm

بررسی اثر مهاری سینرژیک عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم

اثر توام عصاره خیار دریایی در غلظت های مختلف و نانو ذرات سلنیوم بر سه نوع باکتری مورد پژوهش نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ثبت شده نشان داد بهترین اثر مربوط به غلظت ۱۰ میلی گرم عصاره متانولی خیار دریایی با ۱ میلی گرم از نانو ذرات سلنیوم می باشد که افزایش خاصیت آنتی باکتریال این دو ماده در کنار یکدیگر نسبت به حالت خالص هر ماده بیشتر است (جدول ۳).

جدول ۳. اثر مهاری سینرژیک عصاره خیار دریایی در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر و غلظت های مختلف نانو ذرات سلنیوم

غلظت مواد	استافیلوکوکوس اورئوس	باسیلوس سرئوس	کلبسیلا پنومونیه
عصاره خیار دریایی: ۱۰ mg/ml نانوذرات سلنیوم: ۱ mg/ml	۱۶ mm	۱۸ mm	۱۳ mm
عصاره خیار دریایی: ۱۰ mg/ml نانوذرات سلنیوم: ۰/۷۵ mg/ml	۱۴ mm	۱۷ mm	۱۰ mm
عصاره خیار دریایی: ۱۰ mg/ml نانوذرات سلنیوم: ۰/۵ mg/ml	۱۳ mm	۱۴ mm	۱۰ mm
عصاره خیار دریایی: ۱۰ mg/ml نانوذرات سلنیوم: ۰/۲۵ mg/ml	۹ mm	۱۱ mm	۸ mm
میانگین کل غلظت های نانو ذرات سلنیوم	۱۳ mm	۱۵ mm	۱۰/۲۵ mm



نمودار ۱. مقایسه اندازه قطر هاله عدم رشد اطراف باکتری های مختلف (غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی خیار دریایی). استفاده از حروف مشترک در بالای نمودار جعبه ای دو گروه به منزله عدم وجود تفاوت معنادار بین گروه های مورد نظر است.

بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، بین سه نوع باکتری از نظر قطر هاله عدم رشد تفاوت آماری معناداری وجود ندارد (P=۰/۱۰۲ و F=۲/۹۷۸)؛ با وجود این، آزمون مقایسات دوبدوی شفه نشان داد که بیشترین تاثیر پذیری مربوط باکتری *باسیلوس سرئوس* و کمترین آن مربوط به باکتری *کلبسیلا پنومونیه* می باشد (نمودار ۱). به عبارت بهتر، می توان گفت بزرگترین هاله های عدم رشد در اطراف باکتری *باسیلوس سرئوس* مشاهده شده که با افزایش غلظت نانوذره سلنیوم و با مشارکت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از عصاره متانولی خیار دریایی افزایش یافته است.

نتایج تست های MBC و MIC

نتایج تست های انجام شده نشان دهنده فعالیت ضدباکتریایی عصاره خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم در مقابله با سه باکتری مورد مطالعه (استافیلوکوکوس ارئوس، باسیلوس سرئوس و کلبسیلا پنومونیه) است. حداقل غلظت برای تاثیر مهار کنندگی عصاره خیار دریایی برابر با ۲/۵ میلی گرم در هر میلی لیتر برای هر سه باکتری و حداقل غلظت مهاری نانوذره سلنیوم برای هر سه باکتری ۰/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر است. حداقل غلظتی که در تیمار باکتری ها با مواد آنتی باکتریال مورد مطالعه موجب مرگ باکتری ها شده برای عصاره متانولی خیار دریایی برابر ۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای نانوذرات سلنیوم برابر ۰/۵ میلی گرم در هر میلی لیتر است (جدول ۷ و ۶).

جدول ۶. حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی عصاره خیار دریایی

باکتری	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
استافیلوکوکوس ارئوس	۲/۵	۵
باسیلوس سرئوس	۲/۵	۵
کلبسیلا پنومونیه	۲/۵	۵

جدول ۷. حداقل غلظت مهار کنندگی و حداقل غلظت کشندگی نانو ذرات سلنیوم

باکتری	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)
استافیلوکوکوس ارئوس	۰/۲۵	۰/۵
باسیلوس سرئوس	۰/۲۵	۰/۵
کلبسیلا پنومونیه	۰/۲۵	۰/۵

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعات زیادی در مورد اثر ضد باکتریایی خیار دریایی و نانو ذرات سلنیوم صورت گرفته است . در مطالعه حاضر نیز بر اساس مطالعات قبلی ما اثر ضد باکتریایی این مواد و همچنین تاثیر توام این مواد بر سه باکتری ذکر شده را بررسی نمودیم. اقیانوس ها به عنوان مبدا و خاستگاه زندگی، منبع و سرچشمه ترکیبات طبیعی هستند که خواص دارویی دارند. ترکیبات طبیعی موجود در جانداران دریایی را میتوان به عنوان یک منبع غنی از ترکیباتی با کاربرد غذایی، عطریات، رنگدانه های، دارویی و پزشکی استفاده نمود. ترکیبات دارای فعالیت های زیستی را از گروه های مختلف جانوری از جمله مرجان ها، خرچنگ ها، تونیکت ها، خارپوستان، ماهیان و اسفنج ها جداسازی نموده اند (۱۷). نتایج مطالعات نشان می دهد بیشتر این ترکیبات از بی مهرگان دریایی استخراج شده و دارای ساختارهای پپتیدی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی و استروئیدی هستند (۱۸). بررسی های انجام شده در رابطه با خواص بیولوژیک خارپوستان نشان می دهد که بیشترین ترکیبات شیمیایی دارای خواص بیولوژیک متعلق به خیارهای دریایی می باشد (۱۹). یکی از خواص بیولوژیک موجود در خیار دریایی خواص ضد باکتریایی می باشد، به همین منظور در این پژوهش علمی، به خواص ضدباکتریایی عصاره های متانولی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* پرداختیم.

در مطالعه ایی که توسط جمالی و همکاران در سال ۱۳۸۸ روی عصاره های استخراج شده از خیار دریایی گونه *H. leucospilota* نسبت به باکتری *اشرشیاکولای* انجام شد ؛ نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره های متانولی، هگزانی و کلروفرمی در غلظت های ۰/۷۸ تا ۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از اثر باکتریواستاتیک نسبت به این باکتری از خود نشان می دهند (۲۰). در پژوهش دیگری که روی عصاره های خیار دریایی گونه *H.leucospilota* از جزیره لارک انجام شد عصاره های کلروفرمی در غلظت های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر ضد باکتری روی باکتری اشرشیاکلای نشان داد و عصاره هگزانی استخراج شده در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر منجر به مرگ باکتری گردید (۲۱).

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

در پژوهش دیگری که روی عصاره‌های خیار دریایی گونه *H . leucospilota* از جزیره لارک انجام شد عصاره‌های کلروفرمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اثر ضد باکتری روی باکتری اشرشیاکلای نشان داد و عصاره هگزانی استخراج شده در غلظت ۱۰ میلی گرم پر میلی لیتر منجر به مرگ باکتری گردید (۲۲)

در پژوهش دیگری که اثر عصاره متانولی ـ استونی استخراج شده از دیواره بدن خیاردریایی گونه *Parastichopus parvimensis* از جزیره سانتا کاتالینای کالیفرنیا روی باکتری های *اشریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس* به روش انتشار دیسک انجام شده، مشخص گردید که این عصاره دارای اثر ضد باکتری می باشد (۲۳).

بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره های آبزیان دریایی نشان می دهد که بیشترین تأثیر آن ها روی باکتری های گرم مثبت است (۲۴). همان طور که از نتایج این مطالعه برداشت می گردد عصاره های استخراج شده از خیار دریایی بیشترین اثر ضد باکتریایی را روی باکتری های گرم مثبت دارند. به همین علت این ماده درکمترین غلظت منجر به مرگ باکتری های باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس ارئوس که از باکتری های گرم مثبت هستند، می گردد. Mariana و همکاران فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی خیار دریایی*Stichopus badionotus* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره متانولی خیار دریایی فعالیت ضد - باکتریایی علیه باکتری *S.aureus* داشته است. حداقل غلظت ممانعتی بر علیه سویه هایی با مقاومت کم برابر با ۳/۷۵ میلی گرم بر میلی لیتر و برای سویه های مقاوم برابر با ۷/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود(۲۵). نتایج بدست آمده در این تحقیق نیز حاکی از حساس تر بودن باکتری های گرم مثبت نسبت به باکتری های گرم منفی بود. به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتری های گرم منفی منطقی به نظر می رسد که این باکتری ها در برابر اثرات ضد باکتریایی ترکیب حساسیت کمتری از خود نشان می دهند. بنظر می رسد تفاوت های گزارش شده در خواص بیولوژیک گونه های مختلف خیارهای دریایی مانند اثرات ضد باکتریایی به علت وجود و نوع متابولیت های ثانویه ای می باشد که در شرایط مختلف اکولوژی، در فصول مختلف سال و مواجه با آلودگی میکروبی سنتز می گردند .در واقع متابولیت های ثانویه سلاح های شیمیایی هستند که آبزیان مانند خیار دریایی برای ادامه حیات از آنها استفاده می کنند. بنابراین، این سیستم ایمنی ذاتی می تواند به عنوان یک منبع بالقوه برای کشف ترکیبات ضد میکروبی در نظر گرفته شود.

در طول دهه‌ی گذشته، محققین به نانوذرات سلنیوم به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، سمیت پایین و خواص درمانی متعدد، بیش از پیش توجه نشان‌داده‌اند (۲۶،۲۷). همچنین استفاده از نانو ذرات فلزی به عنوان ترکیبات ضد باکتری روند رو به رشدی داشته است. اختلاف بین بار

منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانو ذرات باعث اتصال نانو ذره به سطح سلول، در هدف قرار گرفتن ساختارهای مختلف سلول باکتری و در نتیجه مرگ سلول می-شود(۲۸). نتایج به دست آمده، در تحقیق حاضر ، نیز فعالیت آنتی باکتریال نانو ذرات سلنیوم بر باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* را ثابت کرد. به علاوه این نانو ذرات به منظور دارو رسانی هدفمند آنتی‌بیوتیک‌ها به محل عفونت نیز استفاده شده است. استفاده ترکیبی از نانوذرات و آنتی‌بیوتیک‌ها به ما این امکان را می‌دهد که سمیت و عوارض ناخواسته‌ی هر دو را بر سلول‌های انسانی کاهش دهیم؛ زیرا دو ماده در ترکیب با هم اثرات ضد-میکروبی یکدیگر را افزایش داده و نیاز به استفاده از دوزهای بالای هرکدام را کاهش می‌دهند (۲۹). در مطالعات ما همچنین ،اثر توام عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم بر سه نوع باکتری مورد پژوهش مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که انتظار می رفت نتایج ثبت شده نشان دهنده افزایش خاصیت آنتی باکتریال این دو ماده در کنار یکدیگر نسبت به حالت خالص هر ماده بود.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که عصاره متانولی خیار دریایی *گونه H.leucospilota* دارای اثرات ضد باکتریایی روی باکتری های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارئوس و باسیلوس سرئوس* و باکتری گرم منفی *کلبسیلا پنومونیه* می باشد. از سوی دیگر نانو ذرات سلنیوم با خاصیت آنتی باکتریال روی این باکتری ها بررسی شد. در نهایت با بررسی خواص مهاری سینرژیک این دو ترکیب توانستیم به مقادیر بالاتری از خاصیت آنتی باکتریال این دو ترکیب در مجاورت با یکدیگر دست یابیم. همان طور که پیش تر اشاره کردیم به دلیل مطالعات فراوانی که در زمینه آثار سوء مصرف مواد آنتی باکتریال صنعتی و شیمیایی بر سلامت بدن انسان و همچنین مقاومت طیف وسیعی از گونه های باکتریایی به مواد آنتی بیوتیک صورت گرفته، احساس نیاز به شناسایی مواد طبیعی آنتی بیوتیک امروزه بیش از پیش احساس می شود. نتایج مثبت آزمایشات انجام شده نشان دهنده پتانسیل این مواد برای استفاده های آنتی باکتریال می باشد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق، در دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفته است و تمام منشور اخلاقی در آن رعایت شده است .بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده اند، اعلام می نماییم.

References

1. Kim M K, Drescher K, Pak O S, Bassler B L, Stone H A. Filaments in curved 60.New journal of streamlines: rapid formation of Staphylococcus aureus biofilm streamers physics. 2014; 16(6): 065024.
2. Murray P R, Baron E J, Jorgensen JH, Landry M L, Pfaller M A. Manual of clinical microbiology. 6th edn Washington. DC: ASM PRESS. 1995; 19: 305-8.
3. Mousavi T. Study of behavior of staphylococcus aureus during the manufacture and ripening of Iranian White cheese (Doctoral dissertation, Thesis of food hygiene (Ph. D) Azad University of Tehran). 2005. (In Persian).
4. Kong M, Chen X G, Xing K, Park H J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. International journal of food microbiology. 2010; 144(1)51 :-63.
5. Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2010; 79(1): 5-18.
6. Bagley S T. Habitat association of Klebsiella species. Infection Control & Hospital Epidemiology.1985; 6(2)52 :-58.
7. Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum β-lactamases: a clinical update. Clinical microbiology reviews . 2005; 18(4): 657-686.
8. Messaoudi K, Clavel T, Schmitt P, Duport C. Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in Bacillus cereus F4430/73. Research in microbiology . 2010; 161(1): 30-39.
9. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. Journal of Nanoparticle Research . 2012; 14(9): 1109.
10. Lewbart G A. (Ed.). Invertebrate medicine. John Wiley & Sons. 2011.
11. Nazemi M, Moradi Y, Gozari M, Legzaee F, Karimpour M. Investigations of Antibacterial Activity of Methanol and Aqueous Ex-tracts of the Body Wall of Sea Cucumber Holothuria leucospilota on some Human Pathogenic Bacteria. Avicenna Journal of Clinical Medicine. 2016; 23(1): 75-82.(In Persian).
12. Faulkner D J, Harper M K, Haygood M G, Salomon C E, Schmidt E W. Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. Drugs from the Sea .2000; 107-119.
13. Zaro BA. Marine sponges: a source of novel antibiotics. In Proceedings of the Western Pharmacology Society .1982; (25):11.
14. Wang Q, Webster T J. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2012; 100(12): 3205-3210.

15. Estrada A, Katselis G, Laarveld B, Barl B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from Polygala senega L. Com Immun, Microb & Infect Dis. 2000; 23: 27-43.
16. McDermott. PF, Barry AL, Jones RN, Stein GE, Thornsberry C, Wu CC et al. Standardization of broth micro dilution and disk diffusion susceptibility tests for Actinobacillus pleuropneumoniae and Haemophilus somnus: quality control standards for ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol, gentamicin, penicillin, for tetracycline, tilmicosin, trimethoprimsulfamethoxazole. J Clin Microbiol. 2001; 39(12): 4283–7.
17. Messaoudi K, Clavel T, Schmitt P, Duport C. Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in Bacillus cereus F4430/73. Research in microbiology. 2010; 161(1): 30-39.
18. Häggblom M M, Apetroaie C, Andersson M A, Salkinoja-Salonen M S. Quantitative analysis of cereulide, the emetic toxin of Bacillus cereus, produced under various conditions. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68(5): 2479-2483.
19. Andersson D I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. Current opinion in microbiology. 2003; 6(5): 452-456.
20. Cohen M L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. Science. 1992; 257(5073): 1050-1055.
21. Mancini I, Defant A, Guella G. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents. 2007; 6(1): 17-48.
22. Farjami B, Nematollahi M A, Noradi Y, Irajian G, Nazemi M. Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (Holothuria leucospilota) of Persian Gulf on the Escherichia coli. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2014; 8(1): 27-33.(In Persain).
23. Munro MH, Blunt J W, Dumdei EJ, Hickford S J, Lill R E, Li S. Duckworth, A. R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. In Progress in Industrial Microbiology. 1999; (35):15-25.
24. Newman D J, Cragg G M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. Journal of natural products.2004; 67(8): 1216-1238.
25. Mariana NS, Norfarrah MA, Nik KANI, Yusoff FM, Arshad A.Evaluating the Antibacterial Activity and in vivo Assay of Methanolic Extract of Stichopus badionotus. 2009; 5(3):,228-231.
26. Wang Q, Webster T J. Nanostructured selenium for preventing biofilm formation on polycarbonate medical devices. Journal of Biomedical Materials Research Part A. 2012; 100(12): 3205-3210.
27. Yu B, Zhang Y, Zheng W, Fan C, Chen T Positive surface charge enhances selective cellular uptake and anticancer efficacy of

selenium nanoparticles. Inorganic chemistry. 2012; 51(16): 8956-8963.

28. Luo J, Chan WB, Wang L, Zhong C J. Probing interfacial interactions of bacteria on metal nanoparticles and substrates with different surface properties. International journal of antimicrobial agents . 2010; 36(6): 549-556.

29. De Jong WH, Borm P J. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. International journal of nanomedicine. 2008; 3(2): 133.

Investigation of the Antibacterial Effect of Selenium Nanoparticles and Sea Cucumber Extract on *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae*, and *Bacillus cereus* bacteria

***Mohammadi M*[1*]**
1.Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamshahr Branch, Azad University, Islamshahr, Tehran, Iran, mh_mohamadi@yahoo.com

Received: *2022/11/12* Accepted: *2023/3/10*

Abstract

Background: Many studies have been conducted in the field on the effects of industrial and chemical antibacterial substance abuse on human health and also the resistance of a wide range of bacterial species to antibiotics. Sea cucumber is one of the important aquatic animals which has therapeutic and nutritional properties. The purpose of this study is to investigate the antibacterial effect of selenium nanoparticles and sea cucumber extract on *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Bacillus cereus* bacteria.

Materials and Methods: The antibacterial activity of sea cucumber extract and selenium nanoparticles was investigated on three types of bacteria using the standard methods of disc diffusion, welling, determining the minimum inhibitory concentration, and determining the minimum lethal concentration. For comparing the antibacterial effects of these bacteria, the one-way ANOVA test and Scheffé test of multiple comparisons were deployed.

Results: The results of this study showed that the methanolic extract of sea cucumber with a concentration of 10 mg/ml, as well as nano-selenium with a concentration of 1 mg/ml, and the combination of a concentration of 10 mg/ml of sea cucumber extract with 1 mg/ml of selenium nanoparticles has the best antibacterial effect on the three bacteria in question**.**

Conclusion: The combination of sea cucumber extract and selenium nanoparticles has a higher level of antibacterial properties.

Keywords: Antibiotics, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, Sea cucumber, Selenium nanoparticles, *Staphylococcus aureus*.

Citation: Mohammadi M . Investigation of the Antibacterial Effect of Selenium Nanoparticles and Sea Cucumber Extract on *Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae,* and *Bacillus cereus* bacteria. Yafte. 2023; 24(4):81-93.