

بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره هیبریدی سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر باکتری اشریشیاکلی، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس

مهناز محمدی^{۱*}، شیرین حافظی^۲

مقاله پژوهشی

مقدمه: خیار دریایی یکی از جانوران مهم آبی است که دارای خواص تغذیه‌ای و دارویی فراوان می‌باشد و به دلیل حضور ترکیباتی با اثر درمانی و ضد باکتریایی دارای اهمیت پزشکی می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره هیبریدی سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر باکتری اشریشیاکلی، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس می‌باشد.

روش بررسی: روش ارزیابی MIC برای اثر سیتوتوکسیسیته عصاره خیار دریایی بر روی سلول‌های میکروبی تعیین شد. پس از جمع‌آوری و عصاره‌گیری خیارهای دریایی، با استفاده از روش MIC اثر ضد باکتریایی عصاره خیار دریایی، نانوذره هیبریدی سلنیوم و اثر توام عصاره خیار دریایی و نانوذره هیبریدی سلنیوم بر روی باکتری‌های اشریشیاکلی، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 انجام شد.

نتایج: نتایج آزمایش‌های انجام شده نشان داد که عصاره خیار دریایی با رقت‌های مختلف بر روی باکتری اشریشیاکلی، باکتری میکروکوکوس لوتئوس و باکتری باسیلوس سرئوس دارای اثر ضد باکتریایی بود. همچنین این نتایج برای تست‌های انجام شده با نانوذره سلنیوم نیز صدق می‌کرد. جالب توجه است که پس از ترکیب مقدار مشخصی از عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم اثر ضد باکتریایی بیشتری بر روی ۳ باکتری فوق‌الذکر مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اثر سینرژیستیک عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم دارای میزان بالاتری از خاصیت آنتی‌باکتریال است.

واژه‌های کلیدی: خیار دریایی، نانوذره هیبریدی سلنیوم، آنتی‌بیوتیک

ارجاع: محمدی مهناز، حافظی شیرین. بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره هیبریدی سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر باکتری اشریشیاکلی، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۲؛ ۳۱ (۵): ۶۴-۶۶۵۵.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اسلامشهر، تهران، ایران.

۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۲۱۵۶۳۵۸۱۰۵، پست الکترونیکی: mh_mohamadi@yahoo.com، صندوق پستی: ۶۷۶۵۳-۳۳۱۴۷

مقدمه

باکتری‌ها همواره سبب ایجاد بیماری‌های گسترده در انسان و موجودات دیگر شده‌اند. باکتری‌ها عامل عفونت‌های بسیاری از جمله گاستروانتریت، مننژیت، عفونت صفاوی و کیسه صفاوی، عفونت زخم، پنومونی، پریتونیت و خصوصاً عفونت اداری و عامل نارسایی کلیه در کودکان است. باکتری اشرفی‌اکلی یکی از مهم‌ترین اعضای فلور طبیعی روده حیوانات خونگرم می‌باشد. اهمیت این باکتری به دلیل وجود سویه‌های بیماری‌زایی است که سبب ایجاد بیماری‌های روده‌ای و مسمومیت‌های غذایی در انسان می‌شود (۱،۲). برای درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط باکتری‌ها، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها از مدت‌ها قبل رواج داشته است. یکی از مشکلاتی که امروزه جامعه پزشکی با آن روبرو می‌باشد مسئله ایجاد گونه‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت دارویی است. عواملی مانند تشخیص نادرست بیماری‌ها و تجویز داروهای نامناسب سبب افزایش مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شده است (۳-۵). در سال‌های اخیر بسیاری از ترکیبات زیست‌فعال، از موجودات دریایی مختلف استخراج شده است. یکی از موجودات با ارزش دریایی، خیار دریایی است. خیار دریایی متعلق به شاخه خارپوستان، رده خارسانان و خانواده *Holothuroidea* است (۶). خیار دریایی در داروهای سنتی در شرق آسیا برای درمان آسم، فشار خون بالا، روماتیسم و آنمی استفاده می‌گردد (۷). در مطالعات صورت گرفته بر روی عصاره‌ها و ترکیبات خیار دریایی، خواص سیتوتوکسیسیتی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد سرطانی در آن مشاهده گردیده است (۸-۱۱). نانوفناوری به همراه گسترش دامنه آن در زمینه‌های مختلف علمی، پیشرفت قابل‌توجهی در کاربردهای زیست‌پزشکی از جمله روش‌های نوین تحویل دارو داشته است. این ساختارها به دلیل کنترل و آهسته نمودن رهش دارو، حفاظت از مولکول دارویی، اندازه ذره‌ای کوچکتر از سلول، قابلیت عبور از موانع زیستی جهت رسانش دارو به محل هدف، افزایش ماندگاری دارو در جریان خون، دارورسانی هدفمند و زیست‌سازگاری می‌توانند به عنوان یک سیستم

دارورسانی بسیار موثر در نظر گرفته شوند، که باعث افزایش کارایی درمانی دارو می‌شوند (۱۲). سلنیوم یک عنصر معدنی، غیر فلزی و کمیاب موجود در خاک، آب و برخی از انواع غذاهاست (۱۳). این ماده آنتی‌اکسیدان قوی است و از واکنش‌های شیمیایی زبان آور که در سلول‌های بدن اتفاق می‌افتد، جلوگیری می‌نماید (۱۴،۱۵). کمبود سلنیوم بر سیستم ایمنی بدن، عفونت‌های ویروسی، باروری مردان، عملکرد تیروئید، آسم و التهاب که زمینه بیماری را ایجاد می‌کنند، اثر می‌گذارد. مطالعات اپیدمیولوژیکی یک همبستگی منفی و معنی‌دار بین میزان مرگ و میر ناشی از سرطان و محتوای سلنیوم را نشان می‌دهند (۱۶-۱۸). هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره سلنیوم و عصاره خیار دریایی بر روی باکتری‌های اشرفی‌اکلی، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس است.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌های خیار دریایی: نمونه‌های مورد نظر در سال ۱۳۹۷ از منطقه جزر و مدی روستای اولی، شهرستان دیر، در بوشهر جمع‌آوری شد و به ظروف پلاستیکی حاوی آب دریا منتقل گردید. پس از ورود نمونه‌ها به آزمایشگاه، تعدادی از خیارهای دریایی به منظور شناسایی مولکولی در الکل مطلق فیکس گردید و تعدادی هم برای شناسایی مورفولوژیک در نظر گرفته شد و مابقی بلافاصله تا زمان عصاره‌گیری در فریزر نگهداری شدند. در محیط آزمایشگاه پس از بیومتری، نمونه‌ها بر روی یخ تشریح شدند. خیارهای دریایی در ابتدا از قسمت پشتی برش داده شدند و پس از خروج مایع سلومی، اندام‌های داخلی از دیواره بدن جدا گردیدند. دیواره بدن، دستگاه گوارش (از دهان تا مخرج) و دستگاه تنفسی برای انجام عصاره‌گیری جدا شدند که پس از تشریح و اندازه‌گیری، به منظور فریز کردن سریع و جلوگیری از آسیب‌های بافتی و پروتئینی، به مدت ۴ الی ۵ دقیقه در ازت مایع قرار گرفتند، سپس جهت نگهداری تا زمان عصاره‌گیری، به فریزر با دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند (۱۹).

تهیه نانوذره سلنیوم: برای تهیه نانو ذرات سلنیوم از روش احیای اکسید سلنیوم با استفاده از اسید آسکوربیک استفاده شد. بدین منظور، ابتدا محلول‌های اسید آسکوربیک و دی اکسید سلنیوم آماده شد. برای تهیه حدود ۳ گرم نانوذرات سلنیوم، ۴/۲۱۶ گرم دی اکسید سلنیوم در ۱۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر و حدود یک گرم اسید آسکوربیک در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شدند. سپس برای شروع واکنش، محلول اسید آسکوربیک به صورت قطره قطره به محلول دی اکسید سلنیوم اضافه گردید. به این ترتیب غلظت نهایی دی اکسید سلنیوم در ۲۰۰۰ میلی لیتر حجم نهایی، برابر ۰/۱۳۵ مولار و غلظت نهایی اسید آسکوربیک در آن، ۴ برابر یعنی ۰/۰۵۴ مولار بود. بعد از اضافه کردن اسید آسکوربیک، ذرات قرمز رنگ نانو سلنیوم آغاز به شکل‌گیری کردند که موجب تغییر رنگ محلول از حالت بیرنگ به قرمز شد. سپس برای جداسازی نانو ذرات، محلول در یک محل آرام به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت بدون حرکت قرار داده شد. برر سی نانو ذرات سلنیوم به دست آمده توسط میکرو سکوپ الکترونی اندازه ۱۰۰ نانومتر را نشان داد (۲۱).

آماده سازی محیط کشت باکتری: برای انجام این تحقیق از ۳ باکتری که بیشترین عفونت‌ها بیمارستانی را ایجاد می‌کنند و بسیار به آنتی بیوتیک‌ها مقاوم شدند، (1107)- *Escherichia.coli* (1106)، *Bacillus cereus* و (1043) *Micrococcus luteus* استفاده شد. این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه و برای کشت به آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه علوم دارویی تهران انتقال داده شد. محیط کشت مناسب برای کشت این باکتری‌ها، از محیط کشت مولار هینتون آگار و نوترینت آگار ساخته شد. بدین صورت که مقدار ۳۸ گرم از محیط کشت ذکر شده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید و سپس در دستگاه اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شد. سپس در پلیت‌های استریل ریخته شد. برای اطمینان از عدم وجود هرگونه آلودگی، به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به

عصاره گیری خیار دریایی: برای به دست آوردن عصاره الکلی خیار دریایی، بخش بیرونی و احشاء داخلی بدن خیار دریایی به صورت جداگانه خشک گردید، سپس به ازای هر گرم وزن خشک بدن، ۱۰ میلی لیتر اتانول اضافه گردید و به مدت سه شبانه روز بر روی شیکر چرخشی قرار داده شد. پس از طی زمان مذکور، عصاره با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۱۰ صاف گردید و توسط دستگاه وکیوم در دمای زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد عصاره گیری و تغلیظ انجام گرفت. سپس به وسیله فریز درایر عصاره‌ها خشک و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای به دست آوردن عصاره آبی در حدود ۲۰۰ میلی گرم از بافت دیواره بدن خیار دریایی با نسبت ۱:۲ با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه همگن ساز قرار داده شد تا بافت همگن شود. سپس این ترکیب به مدت ۳ روز در دمای آزمایشگاه روی شیکر با سرعت ۲۸۰۰ قرار داده شد و بعد از این مدت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و سپس محلول رویی از رسوب جدا گردید. این عصاره آبی به دست آمده، مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد تا عصاره آبی به دست آمد. برای به دست آوردن عصاره متانولی خیار دریایی، قسمتی از بافت‌های پودر شده جهت تهیه عصاره متانولی مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام این کار از متانول ۹۰٪ استفاده شد و با نسبت ۱:۵ به بافت‌های پودر شده اضافه شد. پس از انجام سونیکیشن با همان شرایط قبلی، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و با دور ۹۰ rpm در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور شیکردار، شیکر شدند. جدا سازی عصاره از رسوبات بافتی توسط دستگاه میکرو سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۴۰۰۰ rpm صورت گرفت. محلول رویی در پلیت‌های شیشه‌ای استریل و از قبل وزن شده ریخته شدند و جهت لیوفیلیزه کردن در دستگاه freeze-dryer تحت شرایط ذکر شده در بخش قبل، آماده شدند. پس از لیوفیلیز کردن و خروج اتانول، پلیت‌های حاوی عصاره‌های خشک وزن شدند و تا زمان انجام تست‌های باکتریایی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۰).

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی واحد تهران تایید شده است.

نتایج

بررسی خواص آنتی‌باکتریایی عصاره خیار دریایی: در این پژوهش به بررسی اثر آنتی‌باکتریایی عصاره متانولی خیار دریایی بر سه باکتری بیماری‌زای انسانی پرداختیم. در هر پلیت مورد بررسی از نمونه‌های باکتریایی غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره خیار دریایی به همراه دیسک کنترل منفی (آب مقطر) قرار داده شد. میانگین هاله‌های عدم رشد در روش دیسک‌گذاری و هم در روش ارزیابی MIC محاسبه گردید. نتایج حاصله در این مرحله نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌باکتریال عصاره متانولی خیار دریایی بر فعالیت هر ۳ نمونه باکتریایی مورد بررسی ما می‌باشد. بهترین فعالیت آنتی‌باکتریال در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر عصاره خیار دریایی در مقابله با باکتری میکروکوکوس لوتئوس مشاهده شد.

بررسی خواص آنتی‌باکتریایی نانوذره سلنیوم: سه باکتری مورد بررسی را در مجاورت نانوذره سلنیوم قرار دادیم تا فعالیت آنتی‌باکتریال این ماده را نیز مورد بررسی قرار دهیم. رقت‌های مورد استفاده از این ماده ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. طبق نتایج به دست آمده، فعالیت آنتی‌باکتریال (عدم هاله رشد بیشتری در روش دیسک‌گذاری و هم در روش ارزیابی MIC) این ماده نیز ثابت شده و بهترین نتیجه حاصله مربوط به مجاورت نانوذره سلنیوم در غلظت ۱ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر با باکتری میکروکوکوس لوتئوس مشاهده شد.

بررسی اثر مهار کننده سینترژیک عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم: اثر توأم عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم بر سه نوع باکتری مورد پژوهش نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که انتظار می‌رفت نتایج مثبت شده نشان داد، افزایش خاصیت آنتی‌باکتریال (عدم هاله رشد بیشتری در روش دیسک‌گذاری و هم در روش ارزیابی MIC) این دو ماده در کنار یکدیگر نسبت به حالت خالص هر ماده است.

دلیل جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی میکروبی به داخل محیط کشت، تمامی این مراحل در کنار شعله و تحت شرایط استریل انجام گرفت (۲۲).

روش ارزیابی MIC عصاره خیار دریایی: بدین منظور ابتدا ۰/۲ گرم از عصاره خیار دریایی خشک را در ۱ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل حل کردیم و استوک اصلی را تهیه نمودیم. در مرحله بعد پس از تهیه چهار رقت ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، با استفاده از سمپلر استریل، از استوک‌های اصلی ماده مورد نظر، مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و به ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون برآث اضافه کردیم. برای انجام تست، ۶ رقت مد نظر قرار گرفت و برای رقت‌سازی از روش سریال دایلوژن استفاده شد. پس از اتمام این مرحله به تمام لوله‌ها به جز لوله کنترل، که شامل محیط کشت مایع و ماده اصلی آزمایش بود، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری تهیه شده، اضافه گردید. یک لوله اضافه هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که تنها حاوی محیط کشت مایع و باکتری مورد نظر بود. سپس تمامی لوله‌ها به انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۵۰ rpm منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. پس از طی این مدت لوله‌ها از انکوباتور خارج گردید و MIC آن‌ها توسط مشاهده مستقیم با چشم و سنجش غلظت با دستگاه نانودراپ سنجیده شد. تمام مراحل فوق در شرایط استریل، زیر هود لامینار و کنار شعله انجام گرفت (۲۳).

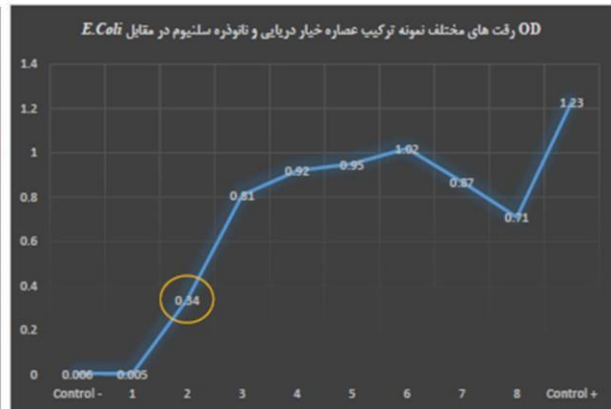
روش ارزیابی MIC نانوذره سلنیوم: تمام مراحل انجام این تست مشابه روش ارزیابی MIC عصاره خیار دریایی می‌باشد با این تفاوت که برای تهیه استوک اصلی از نانوذره، مقدار ۰/۰۷ گرم از نانوذره سلنیوم را وزن کرده و پس از ترکیب با ۱۰۰۰ میکرولیتر (۱ میلی‌لیتر) آب دیونیزه استریل آماده استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16، انجام شد. ابتدا متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف از نظر شرایط نرمال مورد بررسی قرار گرفت. در مواردی که متغیرها دارای توزیع نرمال بودند، از آزمون مستقل T استفاده شد.

شماره نمونه	غلظت (OD ₆₀₀)
کنترل منفی	۰/۰۰۶
۱	۰/۰۰۵
MIC ۲	۰/۳۴
۳	۰/۸۱
۴	۰/۹۲
۵	۰/۹۵
۶	۱/۰۲
۷	۰/۸۷
۸	۰/۷۱
شاهد	۱/۲۳

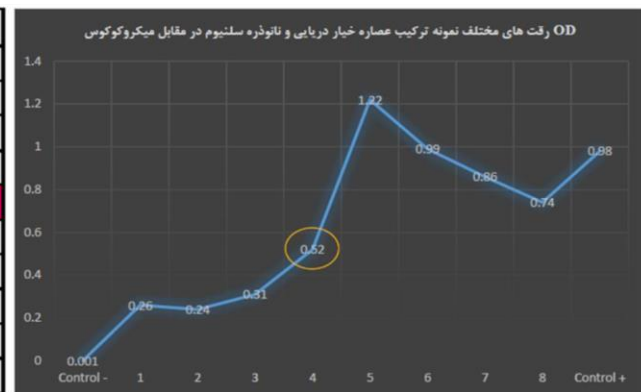
جدول 1: سنجش غلظت نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل E.Coli با نانودرپ



نمودار 1: OD رقت های مختلف نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل E.Coli

شماره نمونه	غلظت (OD ₆₀₀)
کنترل منفی	۰/۰۰۱
۱	۰/۲۶
۲	۰/۲۴
۳	۰/۳۱
MIC ۴	۰/۵۲
۵	۱/۲۲
۶	۰/۹۹
۷	۰/۸۶
۸	۰/۷۴
شاهد	۰/۹۸

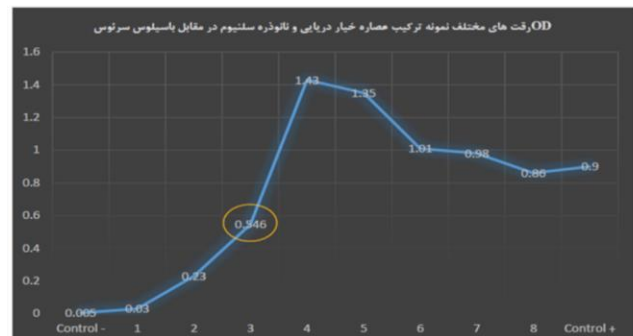
جدول 2: سنجش غلظت نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل میکروکوکوس با نانودرپ



نمودار 2: OD رقت های مختلف نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل میکروکوکوس

شماره نمونه	غلظت (OD ₆₀₀)
کنترل منفی	۰/۰۰۵
۱	۰/۰۳۰
۲	۰/۲۳
MIC ۳	۰/۵۴۶
۴	۱/۴۳
۵	۱/۳۵
۶	۱/۰۱
۷	۰/۹۸
۸	۰/۸۷
شاهد	۰/۹۰

جدول 3: سنجش غلظت نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل باسیلوس سرتوس با نانودرپ



نمودار 3: OD رقت های مختلف نمونه ترکیب عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم در مقابل باسیلوس سرتوس

سلنیوم به اثبات رسید. در این آزمایش پس از ترکیب کردن عصاره خیار دریایی با نانوذره سلنیوم تکرار شد و پس از تکرار، این باکتری‌ها نسبت به این ترکیب حساسیت نشان دادند. این حساسیت باکتری‌ها نشان می‌دهد که عصاره خیار دریایی و نانوذره سلنیوم خاصیت سینرژسمی داشته و با اثر بر روی هم باعث ایجاد حساسیت بر روی این باکتری‌ها شده‌اند. عوامل

بحث

در مطالعه حاضر، عصاره های متانولی جدا شده از بخش‌های مختلف خیار دریایی در غلظت های مختلف در برابر باکتری‌های اشریشیاکولای، میکروکوکوس لوتوس و باسیلوس سرتوس اثر ضد باکتریایی داشتند. هم‌چنین نانوذره سلنیوم در غلظت‌های مختلف بر روی این باکتری‌ها آزمایش شد و، اثر ضد باکتریایی

گونه *Parastichopus parvimensis* از جزیره سانتا کاتالینای کالیفرنیا روی باکتری‌های اش‌ریشیاکلی و باسیلوس سوبتیلیس به روش انتشار دیسک انجام شده، مشخص گردید که این عصاره دارای اثر ضد باکتری می‌باشد (۳۱). در این تحقیق ما نیز اثر ضد باکتریایی خیار دریایی را مشاهده نمودیم. این امر ممکن است به این خاطر باشد که ترکیبات موجود در خیار دریایی می‌توانند با عبور یا تخریب این لایه غشای اضافی به اندام‌های حساس باکتری آسیب برسانند و بدین ترتیب موجب عدم رشد و در نهایت مرگ باکتری شوند. استفاده از نانوذرات در مبارزه با باکتری‌ها نیز امروزه گسترش یافته است. محققان دانشگاه ملبورن، راهکاری برای مقابله با مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها با استفاده از نانو ذرات ایجاد کردند، جهش‌های ژنتیکی موجب بروز مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک می‌شود؛ از این رو آندره اوکونر و همکارانش به استفاده از نانو مواد برای مقابله با این مشکل اقدام کردند (۳۲). اوکونر دریافت که نانوذرات می‌توانند به دیواره سلولی باکتری‌ها آسیب بزنند. سلنیوم یکی از این مواد است که در بدن انسان موجب افزایش متابولیسم و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌شود. سلنیوم نسبت به دیگر نانو ذرات مزیت دارد؛ چرا که نانوذراتی نظیر نقره که خواص آنتی باکتریال دارند، برای بدن سمی هستند اما سلنیوم بی‌خطر است (۳۳). مطالعات اوکونر نشان داد که نانوذرات سلنیوم روی ۹ باکتری مختلف تأثیر می‌گذارند. البته هنوز مشخص نیست که این روش به صورت دائمی بتواند برای مقابله با مقاومت باکتریایی استفاده شود، اما سبب بهبود عملکرد آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۳۴). هم‌چنین استفاده از نانو ذرات فلزی به عنوان ترکیبات ضد باکتری روند رو به رشدی داشته است. اختلاف بین بار منفی میکروارگانیزم و بار مثبت نانوذره باعث اتصال نانوذره به سطح سلول، در هدف قرار گرفتن ساختارهای مختلف سلول باکتری و در نتیجه مرگ سلول می‌شود (۳۵). در این مطالعه نیز نانو ذرات سلنیوم بر روی باکتری‌های اش‌ریشیاکولای، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس اثر ضد باکتریایی داشت. هم‌چنین در این مطالعه با بررسی اثر ضد باکتریایی نانوذره هیبریدی سلنیوم و عصاره

میکروبی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی محسوب می‌شوند که معمولاً به منظور مهار آن‌ها باید از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود، از طرفی باکتری‌های پاتوژن، پس از مدتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم می‌گردند. بنابراین شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها از منابع طبیعی ضرورت می‌یابد. در تحقیقاتی که اخیراً روی عصاره‌ها و ترکیبات به دست آمده از خیار دریایی صورت گرفته است، خواص سیتوتوکسیک، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتری، ضد التهابی، ضد ویروسی، ضد توموری و ضد سرطانی آن به اثبات رسیده است (۲۹-۲۴). خیارهای دریایی از دیرباز به دلیل کاربردهای درمانی در طب سنتی چین مورد توجه بوده‌اند. لذا بررسی خواص بیولوژیک گونه‌های خیار دریایی جهت دستیابی به پیش ماده‌های داروهای بیولوژیک، می‌تواند مسیر مناسبی برای توسعه صنعت داروسازی باشد. در مطالعات مختلف، نشان داده شده است که عصاره خیار دریایی دارای اثرات ضد میکروبی بالقوه هستند (۳۰). به طور کلی گونه‌های خارپوستان یک منبع بالقوه از مواد آنتی‌بیوتیک جهت استفاده‌های فارماسیتوکی می‌باشد. با وجود مطالعاتی که در سراسر جهان در مورد اثر بخشی برخی از گونه‌های خیار دریایی به عنوان منابع ضد میکروبی، ضد قارچی و سیتوتوکسیک انجام شده است، اطلاعات کمی در ارتباط با فعالیت زیستی گونه‌های خیار دریایی خلیج فارس موجود می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که یکی از عوامل مهم که باعث ایجاد خاصیت ضدباکتری در عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی شده است، وجود متابولیت‌های ثانویه مانند گلیکوزیدهای تری تریپنی می‌باشد. این ترکیبات باعث افزایش تولید آنتی‌بادی‌ها، افزایش اثر حفاظتی واکسن‌ها و تحریک مقاومت ضد باکتری موش‌ها در برابر میکروارگانیزم‌های گرم منفی متعلق به جنس اش‌ریشیا، پروتئوس و سالمونلا شده‌اند. مکانیسم اثر عصاره‌ها به احتمال زیاد بر اساس تأثیر عصاره‌ها بر روی دیواره و غشا می‌باشد که با تضعیف عمل ممانعت‌کنندگی غشا و دیواره باکتری‌های مذکور، موجب نفوذ عصاره به داخل سلول و متلاشی شدن سلول می‌شود (۶). در پژوهش دیگری که اثر عصاره متانولی - استونی استخراج شده از دیواره بدن خیار دریایی

دیسک‌گذاری هاله عدم رشد بزرگتری را نسبت به هر کدام از مواد به تنهایی روی محیط کشت باکتری نشان داد. که این ترکیبات می‌توانند کاندیدای مناسبی برای ساخت ترکیبات دارویی - پزشکی و آنتی‌بیوتیک‌های زیستی باشند.

سپاس‌گزاری

این تحقیق، برگرفته از پایان‌نامه می‌باشد، که تمام منشور اخلاقی در آن رعایت و در دانشگاه آزاد واحد علوم پزشکی تهران انجام گرفته است. بدین وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از کلیه کسانی که در این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، اعلام می‌نماییم.

حامی مالی: ندارد.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

خيار دريایی بر روی باکتری اشريشياکولای، میکروکوکوس لوتئوس و باسیلوس سرئوس اثر ضد باکتریایی مشاهده شد. که این امر نشان دهنده، اثر هم افزایی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر، در رابطه با فعالیت آنتی باکتریال خيار دریایی صورت گرفته است که نتایج، نشان دهنده فعالیت آنتی باکتریال اغلب عصاره‌های تهیه شده از اجزای مختلف گونه مورد آزمایش بر باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج این مطالعه نشان داد که خيار دریایی را می‌توان به عنوان یک منبع از ترکیبات ضد باکتریایی معرفی نمود. هم‌چنین در تحقیق حاضر نشان داده شد که ترکیب عصاره خيار دریایی و نانوذره سلنیوم اثر هم‌افزایی داشته و پس از ترکیب، در روش

References:

- 1-Pienaar JA, Singh A, Barnard TG. *The Viable but Non-Culturable State in Pathogenic Escherichia Coli: A General Review*. African Journal of Laboratory Medicine 2016; 5(1): 1-9.
- 2-Papaneophytou CP, Kontopidis G. *Statistical Approaches to Maximize Recombinant Protein Expression in Escherichia Coli: A General Review*. Protein Expression and Purification 2014; 94: 22-32.
- 3-Marialouis XA, Santhanam A. *Antibiotic Resistance, RAPD- PCR Typing of Multiple Drug Resistant Strains of Escherichia Coli from Urinary Tract Infection (UTI)*. J Clin Diagn Res 2016; 10(3): DC05-9.
- 4- Thwaites M, Hall D, Stoneburner A, Shinabarger D, Serio AW, Krause KM, et al. *Activity of Plazomicin in Combination with Other Antibiotics Against Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2018; 92(4): 338-45.
- 5- Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, Koumaki V, Pittaras T, Pournaras S, et al. *Modified CLSI Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of Esbls Among Enterobacteriaceae Producing Various Beta-Lactamases*. Journal of Clinical Microbiology 2014; 52(5): 1483-9.
- 6- Li X, Roginsky AB, Ding XZ, Woodward C, Collin P, Newman RA, et al. *Review of the Apoptosis Pathways in Pancreatic Cancer and the Antiapoptotic Effects of the Novel Sea Cucumber Compound, Frondoside A*. Annals of the New York Academy of Sciences 2008; 1138(1): 181-98.
- 7- Li M, Qi Y, Mu L, Li Z, Zhao Q, Sun J, et al. *Effects of Processing Method on Chemical Compositions and Nutritional Quality of Ready-To-Eat Sea Cucumber (Apostichopus Japonicus)*. Food Sci Nutr. 2019; 7(2):755-63.

- 8- Janakiram NB, Mohammed A, Bryant T, Lightfoot S, Collin PD, Steele VE, et al. *Improved Innate Immune Responses by Frondanol A5, A Sea Cucumber Extract, Prevent Intestinal Tumorigenesis*. Cancer Prev Res (Phila) 2015; 8(4): 327-37.
- 9- Li LX, Liu XH, Wang H, Wang L, Han B, Chang YQ, et al. *Molecular Characterization and Expression of NLRP10 in the Antibacterial Host Defense of the Sea Cucumber (Apostichopus Japonicus)*. Gene 2018; 675: 110-8.
- 10-Kiani N, Heidari B, Rassa M, Kadkhodazadeh M, Heidari B. *Antibacterial Activity of the Body Wall Extracts of Sea Cucumber (Invertebrata; Echinodermata) on Infectious Oral Streptococci*. J Basic Clin Physiol Pharmacol 2014; 25(4): 367-73.
- 11-Tsujino I, Ako J, Honda Y, Fitzgerald PJ. *Drug Delivery via Nano-, Micro and Macroporous Coronary Stent Surfaces*. Expert Opin Drug Deliv 2007; 4(3): 287-95.
- 12-Ng EY, Ng WK. *Analysis of Nano Drug Carriers towards Optimum Release Rate*. J Med Eng Technol. 2007; 31(4): 243-52.
- 13-Sotak S. [Selenium Treatment in Thyreopathies]. Vnitr Lek 2018; 63(12): 949- 51.
- 14-Jones CO. *The Physiological Effects of Selenium Compounds with Relation to Their Action on Glycogen and Sugar Derivatives in the Tissues*. Biochem J 1909; 4(9): 405-19.
- 15-Nelson EM, Hurd-Karrer AM, Robinson WO. *Selenium as an Insecticide*. Science 1933; 78(2015): 124.
- 16-Ogawa-Wong AN, Berry MJ, Seale LA. *Selenium and Metabolic Disorders: An Emphasis on Type 2 Diabetes Risk*. Nutrients 2016; 8(2):80.
- 17-Gross L. *Selenium and Other Antioxidants in Viral Diseases. Introduction*. Biological Trace Element Research 1997; 56(1): 3-4.
- 18-Stratton MS, Reid ME, Schwartzberg G, Minter FE, Monroe BK, Alberts DS, et al. *Selenium and Prevention of Prostate Cancer in High-Risk Men: The Negative Biopsy Study*. Anti-cancer Drugs 2003; 14(8): 589-94.
- 19-Clark AM. *Monograph of Shallow-Water Indo-West Pacific Echinoderms*. British Museum (Natural History) Publications 1971; 690: 238.
- 20-Salarzadeh AR, Afkhami M, Bastami KD, Ehsanpour M, Khazaali A, Mokhlesi A. *Proximate Composition of Two Sea Cucumber Species Holothuria Pavra and Holothuria Arenicola in Persian Gulf*. Annals of Biological Research 2012; 3(3): 1305-11.
- 21-Estrada A, Katselis GS, Laarveld B, Barl B. *Isolation and Evaluation of Immunological Adjuvant Activities of Saponins from Polygala Senega L*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2000; 23(1): 27-43.
- 22-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, Trimethoprim-sulfamethoxazole*. Journal of clinical microbiology 2001; 39(12): 4283-7.
- 23- Wang Q, Webster TJ. *Nanostructured Selenium for Preventing Biofilm Formation on Polycarbonate*

- Medical Devices*. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2012; 100(12):3205-10.
- 24-Ahlstedt S. *The Antibacterial Effects of Low Concentrations of Antibiotics and Host Defence Factors: A Review*. J Antimicrob Chemother 1981; 8(Supp-C): 59-70.
- 25-Yu S, Ye X, Chen L, Xie X, Zhou Q, Lian XY, et al. *Cytotoxic and Anti-Colorectal Tumor Effects of Sulfated Saponins from Sea Cucumber *Holothuria Moebii**. Phytomedicine 2015; 22(12): 1112-9.
- 26-Lei D, Zhao-Jie L, Jie X, Jing-Feng W, Yong X, Chang-Hu X, et al. *The Anti-Tumor Activities of Cerebrosides Derived from Sea Cucumber *Acaudina Molpadioides* and Starfish *Asterias Amurensis* in Vitro and in Vivo*. J Oleo Sci 2012; 61(6): 321-30.
- 27-Farshadpour F, Gharibi S, Taherzadeh M, Amirinejad R, Taherkhani R, Habibian A, et al. *Antiviral Activity of *Holothuria Sp.* A Sea Cucumber against Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1)*. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2014; 18(3): 333-7.
- 28-Ghanbari R, Zarei M, Ebrahimpour A, Abdul-Hamid A, Ismail A, Saari N. *Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) Inhibitory and Anti-Oxidant Activities of Sea Cucumber (*Actinopyga Lecanora*) Hydrolysates*. Int J Mol Sci 2015; 16(12): 28870-85.
- 29-Lee DI, Kang SA, Md A, Jeong UC, Jin F, Kang SJ, et al. *Sea Cucumber Lipid-Soluble Extra Fraction Prevents Ovalbumin-Induced Allergic Airway Inflammation*. Journal of medicinal food 2018; 21(1): 21-9.
- 30-Jiang J, Zhou Z, Dong Y, Cong C, Guan X, Wang B, et al. *In Vitro Antibacterial Analysis of Phenoloxidase Reaction Products from the Sea Cucumber *Apostichopus Japonicus**. Fish Shellfish Immunol 2014; 39(2): 458-63.
- 31-Munro MH, Blunt JW, Dumdei EJ, Hickford SJ, Lill RE, Li S, et al. *The Discovery and Development of Marine Compounds with Pharmaceutical Potential*. Progress in Industrial Microbiology 1999; 35: 15-25.
- 32-Khalid A, Tran PA, Norello R, Simpson DA, O'Connor AJ, Tomljenovic-Hanic S. *Intrinsic Fluorescence of Selenium Nanoparticles for Cellular Imaging Applications*. Nanoscale 2016; 8(6): 3376-85.
- 33-Tran PA, O'Brien-Simpson N, Reynolds EC, Pantarat N, Biswas DP, O'Connor AJ. *Low Cytotoxic Trace Element Selenium Nanoparticles and Their Differential Antimicrobial Properties against *S. Aureus* and *E. coli**. Nanotechnology 2015; 27(4): 045101.
- 34-Biswas DP, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, O'Connor AJ, Tran PA. *Comparative Study of Novel in Situ Decorated Porous Chitosan-Selenium Scaffolds and Porous Chitosan-Silver Scaffolds Towards Antimicrobial Wound Dressing Application*. Journal of Colloid and Interface Science 2018; 515: 78-91.
- 35-Luo J, Chan W- B, 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.

Antibacterial Effect of Selenium Hybrid Nanoparticles and Sea Cucumber Extract on *E.coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus Cereus*

Mahnaz Mohammadi¹, Shirin Hafezi²

Original Article

Introduction: Sea cucumber is one of the important aquatic animals that has many nutritional and medicinal properties and is of medical importance due to the presence of compounds with therapeutic and antibacterial effects. The purpose of this study was to investigate the antibacterial effect of selenium hybrid nanoparticles and sea cucumber extract on *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus* bacteria.

Methods: MIC evaluation method was determined for the cytotoxic effect of sea cucumber extract on microbial cells. To carry out this research, after collecting and extracting sea cucumbers, the cytotoxicity of this extract on microbial cells was determined using the MIC method. Then, the antibacterial effect of sea cucumber extract, selenium hybrid nanoparticle and the combined effect of sea cucumber extract and selenium hybrid nanoparticle on *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus* bacteria were evaluated. Statistical analysis was done using SPSS version 16 software.

Results: The results of the experiments showed that sea cucumber extract with different dilutions had an antibacterial effect on *Escherichia coli* bacteria, *Micrococcus luteus* and *Bacillus cereus*. These results also applied to the tests performed with selenium nanomedicine. Interestingly, after combining a certain amount of sea cucumber extract and selenium nanomedicine, a greater antibacterial effect was observed on the above-mentioned 3 bacteria.

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

Keywords: Sea cucumber, Selenium hybrid nanoparticles, Antibiotics.

Citation: Mohammadi M, Hafezi Sh. **Antibacterial Effect of Selenium Hybrid Nanoparticles and Sea Cucumber Extract on *E.coli*, *Micrococcus Luteus* and *Bacillus Cereus***. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2023; 31(5): 6655-64.

¹Department of Biology, Islamic Azad University, Islamshahr Branch, Tehran, Iran.

²Department of Biotechnology, Islamic Azad University, Medicine Branch Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Tel: 02156358105, email: mh_mohamadi@yahoo.com