بررسی فعالیت ضد باکتریایی ساپونین استخراج‌شده از خیار دریایی گونه (*Stichopus hermanni*) جمع آوری شده از خلیج فارس

زهرا سالاری[۱]، ایمان سوری نژاد[۱ و ۴*]، ملیکا ناظمی[۲]، مرتضی یوسف زادی[۳ و ۴]

*Sourinejad@hormozgan.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۲- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران
۳- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران
۴- گروه فناوری های نوین، مرکز پژوهشی جنگل های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

چکیده

خیارهای دریایی تولید کننده انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی زیست فعال به ویژه متابولیتهای ثانویه از جمله ساپونین می باشند. هدف از مطالعه حاضر بررسی فعالیت ضد باکتریایی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی گونه (*Stichopus hermanni*) جمع آوری شده از خلیج فارس در برابر برخی باکتریهای گرم مثبت و منفی بود. ابتدا عصاره‌گیری با اتانول ۷۰٪ انجام شد و به منظور جداسازی ساپونین، عصاره اتانولی تغلیظ شده بر روی ستون کروماتوگرافی با سیستم های حلالی مختلف شستشو داده شد. ساپونین با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC و HPTLC) شناسایی شد و با استفاده از روش رقت لوله ای حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) ساپونین تعیین گردید. دو دسته ساپونین استروئیدی و گلیکوزیدی در فرکشن‌های استخراج‌شده با کروماتوگرافی لایه‌نازک بترتیب با R_f برابر با ۰/۹ و ۰/۰۵ شناسایی شد. تشخیص نمونه‌ای از ترکیب ساپونین استخراج‌شده توسط دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا نیز بیانگر تایید حضور ساپونین در خیار دریایی با توجه به R_f بدست آمده بود. از نظر میزان MIC، باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeroginosa* دارای بیشترین مقاومت نسبت به ساپونین استروئیدی و ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی بترتیب با MIC برابر با ۵۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. ساپونین های استروئیدی و گلیکوزیدی-استروئیدی بر باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeroginosa* هیچ فعالیت باکتریوسیدی نشان ندادند و در بین باکتریهای گرم مثبت نیز بیشترین اثر کشندگی میزان مربوط به ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در *Staphylococcus aureus* با MBC برابر با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. بالاتر بودن MIC در باکتری های گرم منفی مورد آزمایش، تاییدکننده خاصیت ضد باکتریایی کمتر ساپونین استروئیدی و گلیکوزیدی استخراج شده خیار دریایی *Stichopus hermanni* در این باکتری ها نسبت به انواع گرم مثبت می باشد.

لغات کلیدی: خیار دریایی *Stichopus hermanni*، ساپونین استروئیدی، حداقل غلظت مهار کنندگی، باکتری های گرم منفی

*نویسنده مسئول

مقدمه

ترکیبات طبیعی زیست‌فعال موجود در جانداران دریازی را می‌توان به عنوان یک منبع غنی با کاربردهای غذایی، دارویی و پزشکی استفاده نمود. این ترکیباتِ دارای فعالیت‌های زیستی از گروه‌های مختلف جانوری از جمله مرجان‌ها، خرچنگ‌ها، خزه‌شکلان، خارپوستان، آبفشان‌ها، ماهی‌ها و اسفنج‌ها قابل جداسازی هستند (Yasoda *et al*., 2006; Datta *et al*., 2015). در مناطق حاره‌ای وجود تنوع و تراکم گونه‌ای زیاد و رقابت بر سر فضا، غذا و دفاع از خود منجر به تولید ترکیبات طبیعی زیست فعال توسط گروه‌های مختلف جانوریِ بیان شده، می شود. موجودات دریایی کم‌تحرک و یا فاقد تحرک مثل خیارهای دریایی که تحت تاثیر انواع مختلف میکروب‌ها قرار دارند از این نوع دفاع شیمیایی ضدباکتریایی به عنوان یک راهکار قابل اطمینان برای دفاع از خود استفاده می‌کنند. ترکیبات طبیعی زیست‌فعال را می‌توان به متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های ثانویه و پلیمرهای با وزن مولکولی بالا طبقه بندی کرد (Jha and Zi-Rong, 2004). متابولیت‌های ثانویه نقش کلیدی را در دفاع از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، انگل‌ها، شکارچیان و رقیبان ایفا می‌کنند (Zapata and Amemiya, 2000) و به منظور برقراری ارتباط با موجودات هم گونه و محیط نیز استفاده می‌گردند (Datta *et al*., 2015).

ساپونین‌ها مهم‌ترین و فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه موجود در خیار دریایی هستند (Caulier *et al*., 2011). این محصولات طبیعی دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی مانند فعالیت‌های سیتوتوکسیک، ضد آسم و اگزما، ضدالتهاب، ضدآرتریت، آنتی‌اکسیدان، ضددیابت، ضدباکتری، ضد ویروس، ضدسرطان، ضدقارچ و غیره می‌باشند (بحرودی و همکاران، ۱۳۹۳؛ دیبا و همکاران، ۱۳۹۵؛ Sarhadizadeh *et al*., 2014). در حال حاضر عوامل میکروبی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زای انسانها هستند. به منظور مهار و از بین بردن عوامل میکروبی باید از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود که هر کدام با مکانیسم‌های متفاوتی وارد عمل می‌شوند (Andersson, 2003). از سویی، استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب افزایش مقاومت عوامل بیماری‌زا به آنها می‌شود لذا جستجو برای مواد ضد میکروبی جدید از منابع دیگر از جمله منابع طبیعی دریایی گسترش پیدا نموده است. کشور ما در مناطق خلیج فارس و دریای عمان به عنوان یک منبع غنی از گونه‌های مختلف خیار دریایی می‌باشد لذا مطالعه و بررسی کاربردهای دارویی عصارهٔ خیار دریایی امری مهم به نظر می‌رسد. خیار دریایی *Stichopus hermanni* که از نظر رده بندی جزء راسته Aspidochirotida و رده Holothuroidea می باشد، گونه غالب در جزایر مرجانی در خلیج فارس از جمله لارک است (Afkhami *et al*., 2012). با توجه به حضور این گونه در سواحل جنوبی کشور و اهمیت شناسایی ترکیبات زیست فعال موجود در آنها، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر ضدباکتریایی ساپونین استخراج‌شده از خیار دریایی *Stichopus hermanni* جمع آوری شده از خلیج فارس می باشد.

مواد و روش‌کار

نمونه‌برداری، استخراج و جداسازی ساپونین از خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی گونه *S. hermanni* از عمق ۱۲-۵ متری آب‌های جزیره لارک در خلیج‌فارس جمع‌آوری شدند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها و انجام عمل عصاره‌گیری، ابتدا تخلیه حفره شکمی صورت گرفت و عضلات دیواره بدن در اندازه‌های یک سانتی‌متری بریده شدند (Farjami *et al*., 2014). نمونه‌های خیار دریایی به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفتند تا کاملا خشک شوند و سپس پودر شدند. به منظور استخراج ترکیبات، به پودرهای تهیه شده اتانول ۷۰٪ اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. محلول به‌دست آمده از صافی عبور داده شد تا ذرات معلق خیار دریایی از آن جدا شده و حلال اتانولی حاوی ترکیبات باقی بماند. عصاره به‌دست آمده به منظور حذف کامل حلال، تحت فشار کم به دستگاه روتاریِ مجهز به پمپ قوی در دمای ۴۰ درجه و دور ۱۴۵ وارد شد (Duan *et al*., 2006). فرایند تبخیر ۸ روز کاری زمان

برد که علت آن وجود ۳۰ درصد آب در حلال بود. پس از کم شدن حجم حلال، به منظور دست یابی به عصاره خشک از فریز درایر در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد استفاده گردید.

ده گرم از عصاره اتانولی تهیه شده روی ستون کروماتوگرافی با ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر حاوی سیلیکاژل ۶۰ شرکت Merck قرار داده شد. شست و شوی ستون برای جداسازی ترکیبات عصاره با استفاده از حلال‌های آلی ان-هگزان: اتیل‌استات با نسبت (۵۰:۰، ۴۵:۵، ۴۰:۱۰، ۳۵:۱۵، ۳۰:۲۰، ۲۵:۲۵، ۲۰:۳۰، ۱۵:۳۵، ۱۰:۴۰، ۵:۴۵) و اتیل استات: ان‌بوتانول با نسبت (۵۰:۰، ۴۵:۵، ۴۰:۱۰، ۳۵:۱۵، ۳۰:۲۰، ۲۵:۲۵، ۲۰:۳۰، ۱۵:۳۵، ۱۰:۴۰، ۵:۴۵، ۰:۵۰) به ترتیب افزایش قطبیت انجام شد (Çitoğlu and Acıkara, 2012). در نهایت ۱۱۰ فرکشن ۱۰ میلی‌لیتری به‌دست آمد.

شناسایی ساپونین با کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) و کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC)

از کروماتوگرافی لایه‌نازک برای شناسایی اولیه و انتخاب فرکشن های حاوی ساپونین استفاده شد. از آنجا که ساپونین متعلق به ترپنوئیدها می باشد که با معرف وانیلین به رنگ بنفش تبدیل می گردد برای حذف سایر فرکشن ها که حاوی ترکیب ساپونین نمی باشند از این معرف استفاده گردید (Bahrami and Franco, 2015).

برای جداسازی فرکشن‌های حاوی ساپونین، نمونه‌ها روی صفحات آلومینیومی پوشیده شده از یک لایه سیلیکاژل $60F_{254}$ قرار گرفتند. سپس صفحات با حلال‌های کلروفرم: متانول: آب (۷:۱۳:۸) (به عنوان فاز متحرک) قرار داده شدند. برای شناسایی لکه‌های ساپونین از معرف وانیلین و سولفوریک‌اسید به شکل محلول پنج درصد سولفوریک-اسید در اتانول و محلول یک درصد وانیلین در اتانول استفاده شد. در نهایت صفحات به مدت ۱۵ دقیقه در آون ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رنگ آن‌ها در نور مرئی آشکار گردد. رنگ بنفش نشانه وجود ترکیب ساپونین است (Sharma *et al*., 2012). میزان R_f لکه-های تغییر رنگ داده شده نیز با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد:

R_f= فاصله طی‌شده لکه از مبدأ/ فاصله طی‌شده حلال از مبدأ

همچنین نمونه‌ای از ترکیب جدا شده‌ای که به رنگ بنفش درآمده بود (فرکشن شماره ۴۵ (ان‌هگزان ۱۰: اتیل‌استات ۴۰)) و فرکشن شماره ۳۰ (ان‌هگزان ۲۰: اتیل‌استات ۳۰)) به آزمایشگاه جامع دانشگاه شهید بهشتی ارسال شد تا با دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC) که از نمونه استاندارد ساپونین استفاده می کند با دقت بیشتر آنالیز و شناسایی شود.

بررسی خواص ضدباکتریایی ساپونین

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش رقت لوله-ای (Bacterial Broth Dilution Methods) انجام گرفت. سویه‌های باکتری *Bacillus subtiliss* PY 79، *Bacillus cereus* ATCC 11778، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus* ATCC 1764 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. پس از کشت باکتری‌ها از کلونی‌های تک ایجاد شده با استفاده از لوله مک‌فارلند ۰/۵ که برابر با $۱/۵\times۱۰^{۸}$CFU/ml می‌باشد باکتری تهیه شد. سپس به منظور کاهش تعداد باکتری‌ها برای آزمایش رقت لوله‌ای به نسبت $۱/۵\times۱۰^{۶}$ رقیق‌سازی انجام شد.

جهت تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد باکتریایی MIC (Minimum Inhibitory Concentration) توسط ساپونین خیار دریایی، از لوله فوق که حاوی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ باکتری بود به مقدار یک میلی‌لیتر به هر کدام از لوله‌های استریل اضافه گردید. سپس از ساپونین با غلظت-های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که در محیط براث حل شده بود، مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین با غلظت‌های فوق استفاده گردید و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نشد. در داخل

یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده مؤثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس تمام لوله‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. شایان ذکر است، آزمایش ۳ بار تکرار شد. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایشی که در آن کدورت ایجاد نشده بود و نشان‌دهنده حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری بود به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی از سایر لوله‌های مورد آزمایش جدا شد (Sökmen *et al*., 2003).

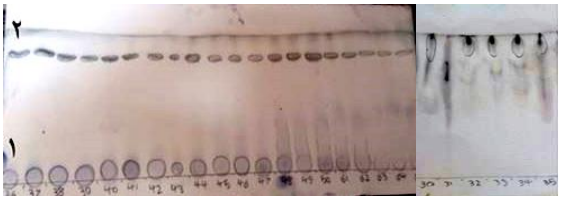
به منظور تعیین توانایی ساپونین‌های استخراج شده در از بین بردن باکتری‌ها، از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر بر روی پلیت-های محیط کشت جامد (نوترینت آگار) کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از سپری شدن این مدت تعداد کلونی‌های تشکیل-شده (CFU) شمرده شد. در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده بود حاکی از آن است که ساپونین توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد، اما در پلیت‌هایی که هیچ‌گونه کلونی مشاهده نشد نشان‌دهنده آن است که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است؛ که این مقدار برابر با حداقل غلظت کشندگی MBC (Minimum Bactericidal Concentration) می باشد (Sökmen *et al*., 2003).

نتایج

آنالیز ساپونین با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

ساپونین استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس *S. hermanni* با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه - نازک (TLC و HPTLC) آنالیز شد (Bahrami and Franco, 2015). همانطوریکه شکل ۱ نشان می دهد، روی کروماتوگرافی لایه‌نازک طیفی از ساپونین در فرکشن‌های مختلف با توجه به رنگ بنفش و R_f تقریبا یکسان قابل مشاهده است. مشخصات مربوط به کروماتوگرافی لایه‌نازک در جدول ۱ ارائه شده است.

طبق نتایج بدست آمده از کروماتوگرافی لایه‌نازک فرکشن شماره ۳۰ تا ۳۵ یک لکه به رنگ بنفش-آبی با R_f =۰/۹ را نشان می‌دهد. از آنجایی که R_f لکه آشکارشده در محدوده R_f ساپونین‌های استروئیدی می‌باشد، ترکیب موجود در این فرکشن‌ها ساپونین استروئیدی شناسایی شد. علاوه بر این در فرکشن‌های ۳۶ تا ۵۰ و ۶۱ تا ۶۵ دو لکه ظاهر شد که لکه شماره (۱) با رنگ بنفش و R_f =۰/۰۵ می‌باشد و R_f لکه ظاهرشده در محدوده R_f ساپونین گلیکوزیدی می‌باشد و لکه دوم به رنگ بنفش تیره با R_f ۰/۸۲ و ۰/۸۴ در محدوده R_f ساپونین استروئیدی می‌باشد. پس در این صورت در این فرکشن‌ها دو نوع ساپونین گلیکوزیدی و استروئیدی شناسایی شد (Wagner and Bladt, 1996). فرکشن‌هایی که لکه با رنگ و R_f یکسان داشتند با یکدیگر ترکیب شدند و میزان ۲ گرم ساپونین استروئیدی و ۳/۵ گرم ساپونین گلیکوزیدی -استروئیدی تهیه شد و سپس خواص ضدباکتریایی آن‌ها بررسی شد.



شکل ۱: کروماتوگرافی لایه نازک ساپونین استخراج‌شده از *S. hermanni*

Figure 1: TLC for Saponin extracted from *S. hermanni*

شناسایی ساپونین با کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC)

شناسایی ساپونین موجود در فرکشن شماره ۳۰ با کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC)

در مورد فرکشن شماره ۳۰ پس از انتقال به دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا، صفحات در معرض نور مرئی و نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفتند و یک لکه با R_f =۰/۸۴ ظاهر شد (شکل ۲).

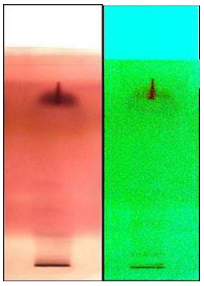
جدول ۱: مشخصات مربوط به کروماتوگرافی لایه نازک ساپونین استخراج شده از *S. hermanni*

Table 1: Characteristics of TLC for Saponin extracted from *S. hermanni*

شماره فرکشن	فاز متحرک	R_f	رنگ	شماره فرکشن	فاز متحرک	R_f	رنگ
۳۰	N*20:E*30	۰/۹۰	بنفش-آبی	(۱)۴۵	N10:E40	۰/۰۵	بنفش
۳۲	N20:E30	۰/۹۰	بنفش-آبی	(۲)۴۵	N10:E40	۰/۸۴	بنفش تیره
۳۳	N20:E30	۰/۹۰	بنفش-آبی	(۱)۴۶	N5:E45	۰/۰۵	بنفش
۳۴	N20:E30	۰/۹۰	بنفش-آبی	(۲)۴۶	N5:E45	۰/۸۴	بنفش تیره
۳۵	N20:E30	۰/۹۰	بنفش-آبی	(۱)۴۷	N5:E45	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۳۶	N15:E35	۰/۰۵	بنفش	(۲)۴۷	N5:E45	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۳۶	N15:E35	۰/۸۴	بنفش تیره	(۱)۴۸	N5:E45	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۳۷	N15:E35	۰/۰۵	بنفش	(۲)۴۸	N5:E45	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۳۷	N15:E35	۰/۸۴	بنفش تیره	(۱)۴۹	N5:E45	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۳۸	N15:E35	۰/۰۵	بنفش	(۲)۴۹	N5:E45	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۳۸	N15:E35	۰/۸۲	بنفش تیره	(۱)۵۰	N5:E45	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۳۹	N15:E35	۰/۰۵	بنفش	(۲)۵۰	N5:E45	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۳۹	N15:E35	۰/۸۲	بنفش تیره	(۱)۶۱	E45:NB*5	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۴۰	N15:E35	۰/۰۵	بنفش	(۲)۶۱	E45:NB5	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۴۰	N15:E35	۰/۸۲	بنفش تیره	(۱)۶۲	E45:NB5	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۴۱	N10:E40	۰/۰۵	بنفش	(۲)۶۲	E45:NB5	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۴۱	N10:E40	۰/۸۲	بنفش تیره	(۱)۶۳	E45:NB5	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۴۲	N10:E40	۰/۰۵	بنفش	(۲)۶۳	E45:NB5	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۴۲	N10:E40	۰/۸۴	بنفش تیره	(۱)۶۴	E45:NB5	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۴۳	N10:E40	۰/۰۵	بنفش	(۲)۶۴	E45:NB5	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۴۳	N10:E40	۰/۸۴	بنفش تیره	(۱)۶۵	E45:NB5	۰/۰۵	بنفش
(۱) ۴۴	N10:E40	۰/۰۵	بنفش	(۲)۶۵	E45:NB5	۰/۸۴	بنفش تیره
(۲) ۴۴	N10:E40	۰/۸۴	بنفش تیره				

* E: اتیل استات؛ N: ان هگزان؛ NB: ان بوتانول

از آنجایی که کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا با دقت بهتری از کروماتوگرافی لایه‌نازک عمل می‌کند، تشخیص نمونه‌ای از ترکیب ساپونین استخراج شده (فرکشن ۳۰) توسط دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا که از اطلاعات ذخیره شده نمونه استاندارد ساپونین در دستگاه جهت تأیید حضور ترکیب استفاده می‌نماید، بیانگر تایید حضور ساپونین در خیار دریایی مورد مطالعه در این تحقیق با توجه به R_f بدست آمده بود.



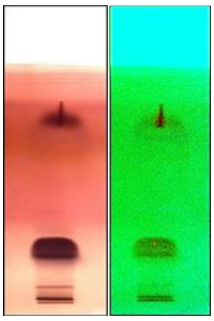
الف ب

شکل ۲: HPTLC فرکشن شماره ۳۰: (الف) در معرض نور مرئی؛ (ب) در معرض نور UV

Figure 2: HPTLC for fraction no. 30: (A) visible light; (B) UV exposed.

شناسایی ساپونین موجود در فرکشن شماره ۴۵ با کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC)

در مورد فرکشن شماره ۴۵ پس از انتقال به دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا، صفحات در معرض نور مرئی و نور UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر قرار گرفتند و دو لکه با R_f = ۰/۲۱-۰/۸۲ ظاهر شد (شکل ۳) که طبق اطلاعات ذخیره شده در دستگاه از نمونه ساپونین استاندارد، ساپونین شناسایی شد.



الف ب

شکل ۳: HPTLC فرکشن شماره ۴۵: (الف) در معرض نور مرئی؛ (ب) در معرض نور UV

Figure 3: HPTLC for fraction no. 45: (A) visible light; (B) UV exposed

خواص ضدباکتریایی ساپونین استروئیدی

همان طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، میزان MIC برای فرکشن حاوی ترکیبات ساپونین استخراج‌شده از خیار دریایی *S. hermanni* در باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* برابر با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در باکتری گرم‌مثبت *B. cereus* برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در باکتری گرم‌مثبت *B. subtiliss* برابر با ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. علاوه بر این فرکشن حاوی ترکیبات ساپونین در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع از رشد باکتری گرم‌منفی *P. aeruginosa* گردید.

همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، فرکشن حاوی ترکیبات ساپونین بر باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* و گرم‌منفی *P. aeruginosa* هیچ اثر کشندگی نشان نداد ولی بر باکتری‌های گرم‌مثبت *B. cereus* و *B. subtiliss* بترتیب در غلظت ۴۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی نشان داد.

جدول ۲: میزان MIC برای فرکشن حاوی ترکیبات ساپونین *S. hermanni* در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 2: MIC for Saponin compounds fraction of *S. hermanni* in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	۲۰۰
Bacillus cereus	۱۰۰
Bacillus subtiliss	۴۰
Pseudomonas aeruginosa	۵۰۰

جدول ۳: میزان MBC برای فرکشن حاوی ترکیبات ساپونین *S. hermanni* در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 3: MBC for Saponin compounds fraction of *S. hermanni* in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	-
Bacillus cereus	۴۰۰
Bacillus subtilis	۱۰۰
Pseudomonas aeruginosa	-

خواص ضد باکتریایی ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی

بر اساس جدول ۴ میزان MIC برای ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی استخراج‌شده از خیار دریایی *S. hermanni* در باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* برابر با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در باکتری گرم‌مثبت *Bacillus cereus* برابر با ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در باکتری گرم‌مثبت *B. subtiliss* برابر با ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است. علاوه بر این ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مانع از رشد باکتری گرم‌منفی *P. aeruginosa* گردید.

جدول ۴: میزان MIC برای ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی *S. hermanni* در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر).

Table 4: MIC for glycosides- steroidal Saponin of *S. hermanni* in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	۵۰
Bacillus cereus	۴۰
Bacillus subtilis	۱۰
Pseudomonas aeruginosa	۴۰۰

بر اساس جدول ۵ میزان MBC ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در باکتری‌های گرم‌مثبت *S. aureus*، *B. cereus* و *B. subtilis* بترتیب برابر با ۵۰۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. همانطوریکه نتایج نشان می‌دهد ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی بر باکتری گرم - منفی *P. aeruginosa* هیچ اثر کشندگی نشان نداد.

جدول ۵: میزان MBC ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی *S. hermanni* در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 5: MBC for glycosides- steroidal Saponin of *S. hermanni* in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	۵۰۰
Bacillus cereus	۱۰۰
Bacillus subtilis	۳۰۰
Pseudomonas aeruginosa	-

خواص ضدباکتریایی آنتی بیوتیک آموکسی سیلین

آنتی‌بیوتیک تجاری آموکسی سیلین در غلظت یکسان با ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی مانع از رشد باکتری‌های گرم مثبت *S. aureus* و *B. subtiliss* (به ترتیب غلظت ۵۰ و ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) شد (جدول ۶). میزان MIC این آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های *B. cereus* و *P. aeruginosa* در جدول ۶ ارائه شده است.

علاوه بر این حداقل غلظت کشندگی آنتی‌بیوتیک تجاری آموکسی سیلین در باکتری *S. aureus* برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در باکتری *B. cereus* ۵۰ و در باکتری *B. subtilis* ۴۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این آنتی بیوتیک در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به از بین رفتن باکتری گرم‌منفی *P. aeruginosa* شد (جدول ۷).

جدول ۶: میزان MIC آموکسی سیلین در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 6: MIC for Amoxicillin in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	۵۰
Bacillus cereus	۳۰
Bacillus subtilis	۱۰
Pseudomonas aeruginosa	۵۰۰

جدول ۷: میزان MBC آموکسی سیلین در باکتری‌های مورد آزمایش (میکروگرم بر میلی‌لیتر)

Table 7: MBC for Amoxicillin in test bacteria (mcg/ml).

سویه‌های باکتری	MIC ساپونین استروئیدی
Staphylococcus aureus	۱۰۰
Bacillus cereus	۵۰
Bacillus subtilis	۴۰
Pseudomonas aeruginosa	۲۰۰۰

بحث

ساپونین یکی از ترکیبات زیست‌فعال موجود در خیار دریایی است که دارای خواص بیولوژیک ضدباکتریایی می-باشد. به همین منظور در تحقیق حاضر به مطالعه فعالیت ضدباکتریایی ساپونین استخراج‌شده از خیار دریایی خلیج فارس *S. hermanni* پرداخته شد. برای شناسایی اولیه و انتخاب فرکشن های حاوی ساپونین‌ها،کروماتوگرافی لایه نازک مورد استفاده قرار گرفت. جهت شناسایی دقیقتر ساپونین و نوع آن از دستگاه HPTLC و اطلاعات ذخیره شده نمونه استاندارد ساپونین در این دستگاه استفاده شد. ضمن آنکه در کروماتوگرافی کاغذی که به روش دستی انجام شد نیز R_f به دست آمده موید حضور ساپونین بود که با آنالیز دستگاهی انجام شده تطابق داشت.

در مطالعه حاضر اثر ضدباکتریایی ساپونین‌های استخراج-شده از خیار دریایی *S. hermanni* بر باکتری‌های پاتوژن انسانی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه بیشتر تحقیقات انجام‌شده در این زمینه بررسی خواص ضد-باکتریایی عصاره خیار دریایی می‌باشد، مزیت این تحقیق بررسی خواص ضدباکتریایی ماده مؤثره (ساپونین) موجود در خیار دریایی مورد مطالعه بود. با مقایسه اثر ضد-باکتریایی ساپونین‌های استخراجی بر باکتری گرم‌منفی *P. aeroginosa*، ساپونین گلیکوزیدی با MIC ۴۰۰ اثر بهتری نسبت به ساپونین استروئیدی نشان داد. آنتی-بیوتیک آموکسی‌سیلین نسبت به ساپونین گلیکوزیدی اثر کمتری نشان داد اما تأثیر آن بر باکتری گرم‌منفی *P. aeroginosa* برابر با ساپونین استروئیدی با MIC ۵۰۰ می‌باشد. ساپونین گلیکوزیدی و استروئیدی بر باکتری *P. aeroginosa* هیچ فعالیت باکتریوسیدی نشان ندادند اما حداقل غلظت‌کشندگی آنتی‌بیوتیک مورد استفاده به عنوان شاهد مثبت در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر می‌باشد. با بررسی خواص ضدباکتریایی در باکتری گرم‌مثبت *B. cereus* می‌توان دریافت که ساپونین‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین اثر بهتری نشان دادند به‌گونه‌ای که بیشترین اثر مهارکنندگی رشد به ترتیب برای ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی و سپس استروئیدی با MIC به ترتیب ۴۰ و ۱۰۰ بود. همینطور حداقل غلظت‌کشندگی برای ساپونین استروئیدی، گلیکوزیدی-استروئیدی و آنتی‌بیوتیک در باکتری گرم-مثبت *B. cereus* به ترتیب برابر ۴۰۰، ۱۰۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

با مقایسه اثر ضدباکتریایی ساپونین‌ها بر باکتری گرم‌مثبت *B. subtilis* می‌توان دریافت که ساپونین گلیکوزیدی و آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین با MIC ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به ساپونین استروئیدی با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضدباکتریایی بهتری نشان دادند. ساپونین‌ها بر این باکتری اثر باکتریوسیدی نشان دادند به‌گونه‌ای که بعد از آموکسی‌سیلین، بیشترین اثر کشندگی به ترتیب متعلق به ساپونین استروئیدی و سپس گلیکوزیدی-استروئیدی به ترتیب با MBC ۱۰۰ و ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

با مقایسه اثر ضدباکتریایی ساپونین‌های استخراج‌شده از خیار دریایی *S. hermanni* و آنتی بیوتیک آموکسی سیلین بر باکتری گرم‌مثبت *S. aureus*، آموکسی سیلین اثر مهارکنندگی بهتری نشان داد. بعد از آن، ساپونین گلیکوزیدی با MIC ۵۰ نسبت به ساپونین استروئیدی با MIC۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مهارکنندگی بهتری بر رشد باکتری نشان دادند. اکثر عفونت‌های موجود در بیمارستان‌ها به علت شیوع باکتری‌های بیماری‌زا از قبیل *S. aureus* می‌باشد که قادرند برای مدت زمان طولانی زنده بمانند. نیمی از باکتری های *S.aureus* که در بیمارستان‌ها یافت شده‌اند به آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل متیسیلین مقاوم‌اند (Selsted and Ouellette, 2005). بنظر می‌رسد به دلیل وجود سویه‌های باکتریایی مقاوم، نیاز به آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی جایگزین وجود دارد. کشف ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی، می‌تواند به عنوان سلاح جدیدی برای مبارزه با این میکروارگانیسم‌های بیماری زا باشد.

در میان باکتری‌های گرم‌مثبت مورد مطالعه، *B. subtilis* حساسیت بیشتر و باکتری *S. aureus* حساسیت کمتری نسبت به اثر ضدباکتریایی ساپونین‌های استخراج‌شده از خیار دریایی *S. hermanni* از نظر MIC و MBC نشان دادند. Adibpour و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت ضد-باکتریایی خیار دریایی *Holothuria leucospilota* را بر باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* و *B. cereus* بررسی کردند. نتایج نشان داد عصاره خیار دریایی رشد باکتری *S.aureus* را مهار نموده اما هیچ اثر مهارکنندگی بر باکتری *B. cereus* ندارد (Adibpour *et al*., 2014). در مطالعه دیگری فعالیت‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی عصاره‌های الکلی برخی گونه‌های خیار دریایی مانند *Actinopyga echinites*، *Actinopyga miliaris* و *Holothuria scabra*توسط Abraham و همکاران (۲۰۰۲) مورد بررسی قرار گرفت. این محققان دریافتند که به استثنای گونه باکتری Bacillus sp. سایر گونه‌ها مانند *E.coli*، *Aeromonas hydrophila*، Enterococccus

S. aureus، *S. typhi*، *Vibrio harveyi* و گونه قارچ آسپرژیلوس جداسازی شده از ماهی نسبت به عصاره‌های آزمایش شده خیار دریایی حساس بودند. در جمع بندی عنوان شد که پتانسیل ضد میکروبی این عصاره‌ها، احتمالا به دلیل حضور عوامل ضدمیکروبی نظیر ساپونین‌های استروئیدی در عصاره خیار دریایی است.

در پژوهشی دیگر Farjami و همکاران (۲۰۱۴) اثر ضد-باکتریایی عصاره‌های متانولی، کلروفرمی و هگزانی استخراج‌شده از بخش‌های دیواره، روده و گناد خیار دریایی جمع آوری شده از خلیج فارس (*Holothuria leucospilota*) را بر باکتری *Escherichia coli* مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که عصاره‌های متانولی هیچ‌گونه اثر ضدباکتریایی نداشتند ولی عصاره‌های کلروفرمی در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثر ضدباکتری نشان دادند. عصاره هگزانی استخراج‌شده از بخش دیواره در غلظت‌های ۵ و ۱۰ و عصاره هگزانی روده در غلظت‌های ۲/۵ ، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری جلوگیری نمودند. عصاره هگزانی گناد در هیچ‌کدام از غلظت‌های مورد بررسی اثر ضدباکتری نشان نداد. همه عصاره‌های کلروفرمی و عصاره هگزانی دیواره در غلظت ۵ و عصاره هگزانی گناد در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر کمترین غلظت بازدارندگی از رشد را داشتند. در بین عصاره‌ها فقط عصاره هگزانی روده در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث مرگ باکتری شد. ناظمی و همکاران (۱۳۹۵) به بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و آبی دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria Leucospilota* روی برخی از باکتری‌های بیماری‌زای انسانی پرداختند. نتایج نشان داد عصاره آبی روی هیچ-کدام از باکتری‌های مورد آزمایش اثر ضدباکتری از خود نشان نداد. تنها عصاره متانولی نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش اثر باکتریواستاتیک از خود نشان داد. در این پروژه عصاره متانولی نسبت به باکتری‌های گرم‌منفی *Escherichia coli*، *Salmonella typhi* و *Serratia marcescens* به ترتیب اثر باکتریواستاتیک در غلظت های ۳۰، ۱۰ و ۱۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از خود نشان داد، اما باکتری *P. aeroginosa* نسبت به این عصاره مقاوم بود. همچنین عصاره متانولی نسبت به باکتری‌های *S. typhi* و *S. marcescens* در غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی از خود نشان داد. به عبارتی دیگر این عصاره منجر به مرگ باکتری *Escherichia coli* نمی شود. Mariana و همکاران (۲۰۰۹) فعالیت ضد باکتریایی عصاره متانولی خیار دریایی *Stichopus badionotus* را با دو روش انتشار دیسک و broth macro dilution 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 سویه‌هایی با مقاومت کم برابر با ۳/۷۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر و برای سویه های مقاوم برابر با ۷/۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

نتایج بدست آمده در این تحقیق (بالاتر بودن MIC ساپونین علیه باکتریهای گرم منفی نسبت به گرم مثبت) نیز حاکی از حساس‌تر بودن باکتریهای گرم مثبت نسبت به باکتریهای گرم منفی بود. به دلیل وجود غشاهای خارجی احاطه کننده دیواره سلولی در باکتریهای گرم منفی منطقی به نظر می رسد که این باکتریها در برابر اثرات ضد باکتریایی ترکیب حساسیت کمتری از خود نشان می‌دهند. بنظر می‌رسد تفاوت های گزارش شده در خواص بیولوژیک گونه های مختلف خیارهای دریایی مانند اثرات ضد باکتریایی به علت وجود و نوع متابولیت‌های ثانویه‌ای می‌باشد که در شرایط مختلف اکولوژی، در فصول مختلف سال و مواجه با آلودگی میکروبی سنتز می‌گردند. در واقع متابولیت‌های ثانویه سلاح‌های شیمیایی هستند که آبزیان مانند خیار دریایی برای ادامه حیات از آنها استفاده می‌کنند. بنابراین، این سیستم ایمنی ذاتی می-تواند به عنوان یک منبع بالقوه برای کشف ترکیبات ضد میکروبی در نظر گرفته شود.

منابع

بحرودی، س.، نعمت الهی، م.ع.، آقا صادقی، م.ر.، ناظمی، م. و بهروز، ب.، ۱۳۹۳. بررسی اثر سیتوتوکسیک و ضد سرطانی دیواره بدن خیار دریایی

گونه *Holothuria leucospilota* در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی شیلات ایران، ۲۳(۳): ۲۰-۱۱.

دیبا، گ.، جمیلی، ش. و رمضانی، ا.، ۱۳۹۵. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی خیار دریایی گونه *Holothuria parva* در دو حالت خشک (آبدهی شده) و تازه. مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۴): ۸۷-۷۷.

ناظمی، م.، مرادی، ی.، گذری، م.، لکزایی، ف. و کریم‌پور، م.، ۱۳۹۵. بررسی فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌های متانولی و آبی دیواره بدن خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* روی برخی باکتری‌های بیماریزای انسانی. مجله علمی دانشگاه علوم‌پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی همدان، ۲۳(۱): ۸۲-۷۵.

Abraham, T.J., Nagarajan, J. and Shanmugam, S.A., 2002. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. Indian Journal of Marine Sciences, 31(2): 161-164. DOI: 123456789/4309.

Adibpour, N., Nasr, F., Nematpour, F., Shakouri, A. and Ameri, A., 2014. Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea. Jundishapur Journal of Microbiology, 7(1): e8708. DOI: 10.5812/jjm.8708.

Afkhami, M., Ehsanpour, M., Khazaali, A., Kamrani, E., Mokhlesi, A. and Bastami, K.D., 2012. Sea cucumber fisheries of Qeshm Island, Persian Gulf. SPC Beche-de-mer Information Bulletin, 32: 60-61.

Andersson, D. L., 2003. Persistence of antibiotic resistent bacteria. Current Opinion Microbial, 6(5): 452- 456. DOI: 10.1016/j.mib.2003.09.001.

Bahrami, Y. and Franco, C.M.M., 2015. Structure Elucidation of New Acetylated Saponins, Lessoniosides A, B, C, D, and E, and Non-Acetylated Saponins, Lessoniosides F and G, from the Viscera of the Sea Cucumber *Holothuria lesson*. Marine Drugs, 13: 597-617. DOI: 10.3390/md13010597.

Caulier, G., Van Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I. and Flammang, P., 2011. Review of Saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. SPC Beche-de-Mer Information Bulletin, 31: 48-54.

Çitoğlu, G.S. and Acıkara, Ö.B., 2012. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. Edited by Sasikumar Dhanarasu, 13 p.

Datta, D., Talapatra, S. and Swarnakar, S., 2015. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. International Letters of Natural Sciences, 7: 42-61. DOI: 10.18052/www.scipress.com/ILNS.34.42.

Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M. and Wang, B.G., 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food chemistry, 95(1):37-43. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.015.

Farjami, B., Nematollahi, M., Moradi, Y. and Nazemi, M., 2014. Derivation of

extracts from Persian Gulf sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) and assessment of its antifungal effect. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 13(4): 785-795.

Jha, R.K. and Zi-Rong, X., 2004. Biomedical compounds from marine organisms. Marine Drugs, 2(3): 123-146. DOI: 10.3390/md203123.

Mariana, N.S., Norfarrah, M.A., Nik, K.A.N.I., Yusoff, F.M. and Arshad, A., 2009. Evaluating the antibacterial activity and in vivo assay of methanolic extract of *Stichopus badionotus*. International Journal of Pharmacology, 5(3): 228-231. DOI: 10.3923/ijp.2009.228.231.

Sarhadizadeh, N., Afkhami, M. and Ehsanpour, M., 2014. Evaluation bioactivity of a sea cucumber, *Stichopus hermanni* from Persian Gulf. European Journal of Experimental Biology, 4(1): 254-258.

Selsted, M.E. and Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. Nature immunology, 6(6): 551. DOI: 10.1038/ni1206.

Sharma, O.P., Kumar, N., Singh, B. and Bhat, T.K., 2012. An improved method for thin layer chromatographic analysis of Saponins. Food chemistry, 132: 671-674. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.069.

Sökmen, A., Vardar-Ünlü, G., Polissiou, M., Daferera, D., Sökmen, M. and Dönmez, E., 2003. Antimicrobial activity of essential oil and methanol extracts of *Achillea sintenisii* Hub. Mor.(Asteraceae). Phytotherapy Research, 17(9): 1005-1010. DOI: 10.1002/ptr.1274.

Wagner, H. and Bladt, S., 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science and Business Media, 384 p.

Yasoda, H.N., Chi, Z. and Zhu, K., 2006. Probiotics and sea cucumber farming. SPC Bechedemer Information Bulletin, 24: 45-48.

Zapata, A. and Amemiya, C.T., 2000. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. Current Topics in Microbiology and Immunology, chapter: Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System, 248: 67-107. DOI: 10.1007/978-3-642-59674-2-5.

Antibacterial activity of Saponin extracted from the sea cucumber (*Stichopus hermanni*) collected from the Persian Gulf

Salari Z.[1]; Sourinejad I.[1,4]; Nazemi M.[2]; Yousefzadi M.[3,4]

[*]sourinejad@hormozgan.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
2- Persian Gulf and Oman Sea Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institution, Agriculture Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran
3- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan Bandar Abbas, Iran
4- Department of Modern Technologies, Mangrove Forests Research Center, University of Hormozgan Bandar Abbas, Iran

Abstract

Sea cucumbers produce various bioactive compounds especially secondary metabolites including Saponin. The aim of this study was to investigate antibacterial activity of the Saponin extracted from the Persian Gulf sea cucumber (*Stichopus hermanni*) in some gram positive and negative bacteria. Extraction was first done by ethanol 70% and then Saponins were separated through column chromatography with silica gel. Extracted Saponins were identified through thin layer chromatography (TLC) and high performance thin layer chromatography (HPTLC). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were investigated via tubular dilution. Two groups of steroidal and glycosides Saponins with R_f 0.9 and 0.05 were respectively identified in fractions extracted by TLC. HPTLC results for a sample of extracted Saponin confirmed the existence of Saponin in sea cucumber regarding the R_f. The gram negative bacterium *Pseudomonas aeroginosa* was the most resistant one to steroidal and glycosides- steroidal Saponins with MIC of 500 and 400 micg/ml, respectively. Steroidal and glycosides- steroidal Saponins showed no bactericidal effect in gram negative bacterium *Pseudomonas aeroginosa*. Among the gram positive bacteria, the highest MBC of 500 micg/ml belonged to glycosides- steroidal Saponin for *Staphylococcus aureus*. The higher MIC in gram negative bacteria approves the lower antibacterial property of the steroidal and glycosides Saponin extracted from sea cucumber *Stichopus hermanni* in these bacteria compared to the gram positive ones.

Keywords: Sea cucumber *Stichopus hermanni*, Steroidal Saponin, Minimum inhibitory concentration, Gram- negative bacteria

[*]Corresponding author