

فعالیت ضد قارچی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni*

زهرا سالاری^۱، ایمان سوری نژاد^{۲*}، ملیکا ناظمی^۳، مرتضی یوسف زادی^{۴،۵}

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳. استادیار پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
۴. دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۵. دانشیار گروه فناوری‌های نوین، مرکز پژوهشی جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۸

چکیده

خیارهای دریایی از موجودات شاخه خارپوستان هستند که متابولیت‌های زیست فعال از جمله ساپونین با طیفی از خواص ضد میکروبی از آن‌ها استخراج شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی خواص ضد قارچی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی خلیج فارس گونه *Stichopus hermanni* نسبت به سویه قارچ *Aspergillus fumigatus* و مخمر *Candida albicans* می‌باشد. پس از عصاره‌گیری از خیار دریایی با اتانول، ساپونین از عصاره تغلیظ شده و از طریق کروماتوگرافی ستونی با بکارگیری حلال‌های مختلف جداسازی شد. برای شناسایی ساپونین از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا استفاده گردید. برای بررسی خواص ضد قارچی ساپونین در سویه‌های قارچ و مخمر، از روش ریز رقیق‌سازی محیط کشت به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی استفاده شد. دو دسته ساپونین استروئیدی و ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در فرکشن‌های استخراج شده با کروماتوگرافی لایه نازک شناسایی شد. ساپونین استروئیدی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد قارچ و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد مخمر را مهار نمود و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در قارچ خاصیت کشندگی داشت. برای ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی، حداقل غلظت مهارکنندگی در قارچ برابر با ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مخمر برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود در حالی که حداقل غلظت کشندگی در قارچ برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در مخمر برابر با ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. خیار دریایی *S. hermanni* دارای متابولیت‌های زیست فعال قابل استخراج با خواص ضد قارچی می‌باشد و تحقیقات جامع برای بررسی امکان استفاده از آن به عنوان یک منبع غنی جهت سنتز ترکیبات دارویی پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: حداقل غلظت مهارکنندگی، خیار دریایی خلیج فارس، متابولیت زیست فعال.

۱. مقدمه

با وجود پیشرفت فوق‌العاده در پزشکی، بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها هنوز هم یک تهدید عمده برای سلامت عمومی می‌باشند. تکامل مداوم میکروبهای بیماری‌زا و مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باعث شده است که همیشه تقاضا برای توسعه ترکیبات جدید و موثر ضد میکروبی وجود داشته باشد. در طول دو دهه گذشته متابولیت‌های ثانویه زیست فعال بسیاری از گیاهان و جانوران دریایی شامل اسفنج‌ها، خارپوستان، مرجان‌ها، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ... شناسایی شده است که به حداقل بیش از ۱۵۰۰۰ ترکیب می‌رسد (Selsted and Ouellette, 2005). برخی از این ترکیبات طبیعی با منشا دریایی، دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچی و ضد ویروسی قوی می‌باشند، بنابراین تحقیقات به‌منظور تولید دارو از این منابع دریایی توجه بسیاری را به خود معطوف ساخته است (Villa and Gerwick, 2010).

در میان موجودات دریایی، خیارهای دریایی یک گروه بزرگ و متنوعی از موجودات بی‌مهره دریایی از شاخه خارپوستان Echinodermata و رده خیارسانان Holothuroidea هستند که بیشتر در بستر دریاها زندگی می‌کنند. این جانوران اجزاء مهم زنجیره‌های غذایی در اکوسیستم‌های معتدل و آبسنگ‌های مرجانی بوده و نقش مهمی را به‌عنوان پوده‌خوار و یا معلق‌خوار بازی می‌کنند و متابولیت‌های ثانویه زیادی نیز از آن‌ها استخراج شده است (Mokhlesi et al., 2012). متابولیت‌های ثانویه در شرایط مختلف اکولوژی، در فصول مختلف سال و مواجه با آلودگی میکروبی سنتز می‌گردند و در واقع سلاح‌های شیمیایی هستند که آبیانی مانند خیار دریایی برای ادامه حیات از آن‌ها استفاده می‌کنند.

خیارهای دریایی دارای انواع مختلفی از ترکیبات طبیعی هستند که ساپونین‌ها مهمترین و فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه در این موجودات می‌باشند (Paul and Ritson-Williams, 2008; Caulier et al., 2011). ساپونین‌ها را معمولاً از گیاهان عالی استخراج می‌کنند ولی امروزه استفاده از جانوران پست دریایی برای تهیه ساپونین‌ها نیز مورد توجه قرار گرفته است و تاکنون در شاخه Echinodermata و به‌خصوص در گونه‌هایی از خیارهای دریایی نمونه‌هایی از این

ترکیبات یافت شده‌اند (Hostettmann and Marston, 1995). ساپونین خیار دریایی دارای طیف گسترده‌ای از خواص دارویی از جمله ضد التهاب، ضد تورم مفاصل، آنتی‌اکسیدان، ضد دیابت، ضد باکتری، ضد ویروس، ضد سرطان، ضد قارچ، همولیتیک و کاهش‌دهنده کلسترول می‌باشد (Dong et al., 2008; Sarhadizadeh et al., 2014).

قارچ‌ها یکی از عوامل شایع بیماری‌زا در سرتاسر جهان هستند که با وجود پیشرفت علم و دانش همچنان عامل بیماری و مرگ و میر می‌باشند. طی دهه‌های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیزم‌های فرصت‌طلب به‌خصوص در بیماران با نقص سیستم ایمنی، به‌طور قابل توجهی در بسیاری از کشورها افزایش یافته و نشان داده شده است که مخمرهای پاتوژن مقاومت ذاتی یا اکتسابی نسبت به داروهای شیمیایی ضد قارچ دارند (Ramani and Chaturvedi, 2000).

حدود هفده گونه خیار دریایی در سواحل جنوبی کشور شناسایی شده است. با وجود مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان در مورد اثرات ضد میکروبی متابولیت‌های ثانویه استخراج شده از گونه‌های مختلف خیار دریایی انجام شده است، اطلاعات کمی در مورد ترکیبات زیست فعال جدا شده از گونه‌های خیار دریایی خلیج فارس و خواص ضد میکروبی آن‌ها وجود دارد. گونه خیار دریایی *Stichopus hermanni* یک گونه کمتر شناخته شده محسوب می‌شود و زیستگاه عمده آن مناطق مرجانی خلیج فارس به‌ویژه جزیره لارک می‌باشد. از دیواره بدن این گونه خیار دریایی، متابولیت ثانویه ساپونین از نوع استروساپونین به‌وسیله فرایند حرارت دادن جدا شده است و کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا نیز حضور ساپونین را در عصاره اتانولی و ان-بوتانولی دیواره بدن این گونه خیار دریایی تایید نموده است (Salari et al., 2017). بررسی فعالیت ضد باکتریایی ساپونین استخراج شده از خیار دریایی *S. hermanni* بر برخی باکتری‌های گرم مثبت و منفی نیز حاکی از آن بود که باکتری گرم منفی *Pseudomonas aeruginosa* دارای بیشترین مقاومت نسبت به ساپونین استروئیدی و ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی بود و این ساپونین-ها بر این باکتری گرم منفی هیچ فعالیت باکتریوسیدی

حلال اتانول-آب و ترکیبات آلی موجود در نمونه بود. عصاره به دست آمده به دستگاه روتاری (Heidolph, Laborota 4000) منتقل گردید تا تحت فشار کم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۴۵ دور در دقیقه، حلال آن تبخیر و جدا گردد و تنها عصاره خالص باقی بماند (Duan et al., 2006).

میزان ده گرم از عصاره اتانولی تهیه شده روی ستون کروماتوگرافی قرار داده شد. شست و شوی ستون برای جداسازی ترکیبات عصاره با استفاده از حلال‌های آلی ان‌هگزان: اتیل‌استات با نسبت (۴۵:۵)، (۴۰:۱۰)، (۳۵:۱۵)، (۳۰:۲۰)، (۲۵:۲۵)، (۲۰:۳۰)، (۱۵:۳۵)، (۱۰:۴۰) و اتیل‌استات: ان بوتانول با نسبت (۴۵:۵)، (۴۰:۱۰)، (۳۵:۱۵)، (۳۰:۲۰)، (۲۵:۲۵)، (۲۰:۳۰)، (۱۵:۳۵)، (۱۰:۴۰) و (۵:۴۵) و (۰:۵۰) به ترتیب افزایش قطبیت انجام شد. در نهایت ۱۱۰ فرکشن ده میلی‌لیتری به دست آمد. فرکشن‌های جدا شده برای تایید حضور ساپونین با کروماتوگرافی لایه‌نازک مورد بررسی قرار گرفتند (Çitoğlu and Acikara, 2012; Salari et al., 2017).

۳.۲. شناسایی ساپونین‌ها با کروماتوگرافی لایه-نازک (TLC) و کروماتوگرافی لایه‌نازک با

کارایی بالا (HPTLC)

به منظور تشخیص حضور ساپونین در فرکشن‌های استخراج شده حاصل از ستون‌گذاری، نمونه‌ها روی صفحات آلومینیومی پوشیده شده از یک لایه سیلیکا-ژل 60F₂₅₄ به عنوان فاز ثابت قرار داده شدند. صفحات درون تانک کروماتوگرافی که قبلاً درون آن مخلوط متانول و کلروفرم (۹۰:۱۰) به عنوان فاز متحرک جهت اشباع شدن ریخته شده بود، گرفتند (Wagner and Bladt, 1996). برای شناسایی لکه‌های ساپونین، صفحات TLC بعد از خشک شدن، با محلول سولفوریک اسید و وانیلین به شکل محلول ۵ درصد سولفوریک اسید در اتانول و محلول یک درصد وانیلین اسپری شدند. در نهایت صفحات به مدت ۱۵ دقیقه در آون ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا رنگ لکه‌ها در نور مرئی آشکار گردد. رنگ بنفش نشانه وجود ترکیب ساپونین است (Wagner and Bladt, 1996).

نشان ندادند. همچنین در بین باکتری‌های گرم مثبت نیز بیشترین اثر کشندگی میزان مربوط به ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در *Staphylococcus aureus* بود (Salari et al., 2018). مرور منابع نشان داد که سایر خواص از جمله فعالیت ضد قارچی ترکیبات زیست فعال خیارهای دریایی خلیج فارس تاکنون مورد مطالعه قرار نگرفته است. با توجه به اهمیت دارویی گونه *Stichopus hermanni*، در پژوهش حاضر به بررسی اثر ضد قارچی ساپونین موجود در این گونه خیار دریایی جمع آوری شده از جزیره لارک در خلیج فارس پرداخته شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه برداری از خیار دریایی

از عمق ۵ تا ۱۲ متری آب‌های جزیره لارک در خلیج فارس، نمونه‌های خیار دریایی گونه *Stichopus hermanni* جمع‌آوری شدند. ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا آب دریا و نمک اضافی آن جدا شود. سپس تخلیه حفره شکمی صورت گرفت و عضلات دیواره بدن در اندازه‌های یک سانتی‌متری بریده شدند و در فریزر قرار گرفتند تا برای انجام عمل عصاره‌گیری مورد استفاده قرار گیرند.

۲.۲. عصاره‌گیری و جداسازی ساپونین از خیار دریایی

شرح کامل روش عصاره‌گیری و جداسازی ساپونین از خیار دریایی قبلاً توسط نویسندگان منتشر شده است (Salari et al., 2017). به طور خلاصه، قطعات عضلانی خیار دریایی پس از خروج از فریزر و انجماد-زدایی به منظور خشک کردن کامل و گرفتن رطوبت اضافی آن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر (مدل Edwards) در دمای ۴۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از آن که نمونه‌ها خشک شدند، با استفاده از آسیاب به صورت پودر در آورده شدند. عصاره‌گیری با استفاده از حلال الکل اتانول ۷۰٪ به مدت ۷۲ ساعت انجام گرفت. پس از این مدت زمان، محلول به دست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد تا ذرات معلق خیار دریایی از آن جدا شود و آن چه باقی ماند،

گردد. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد.

پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لوله شاهد منفی که فاقد ترکیبات فعال بیولوژیک بوده بسیار کدر شده بودند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند که میانگینی از سه مرتبه آزمایش برای هر گونه قارچی بود. لوله‌هایی که کدورت داشتند، از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود، در ادامه کار مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت، میزان (Minimum Inhibitory Concentration) MIC که به معنای حداقل غلظت لازم برای ممانعت از رشد و افزایش تعداد قارچ‌ها می‌باشد را نشان می‌دهد.

جهت تعیین توانایی ساپونین‌های استخراج شده در از بین بردن قارچ‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر بر روی پلیت-های محیط کشت سابور دکستروز آگار کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شدند و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. کم‌ترین غلظت که سبب مرگ قارچ شده بود و در واقع در پلیت‌ها کلونی تشکیل نشده بود به عنوان حداقل غلظت کشندگی (Minimum Fungicidal Concentration) MFC منظور گردید (Green et al., 1994).

۳. نتایج

در مطالعه حاضر ساپونین از عصاره خیار دریایی خلیج فارس گونه *S. hermanni* جداسازی شد و با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا مورد شناسایی قرار گرفت. شرح کامل نتایج جداسازی و شناسایی ساپونین قبلاً منتشر شده است (Salari et al., 2017). به‌طور خلاصه، در برخی فرکشن‌های استخراج شده از ستون کروماتوگرافی، یک لکه به رنگ بنفش-آبی با $R_f = 0/9$ به دست آمد. از آن‌جا که R_f لکه آشکار شده در محدوده R_f ساپونین‌های استروئیدی بود، ترکیب

میزان R_f لکه‌های تغییر رنگ داده شده نیز با استفاده از رابطه ذیل محاسبه شد:

فاصله طی شده لکه از مبدأ / فاصله طی شده حلال از مبدأ $R_f =$
همچنین نمونه‌ای از ترکیب جدا شده با دستگاه کروماتوگرافی لایه‌نازک با کارایی بالا (HPTLC) مورد شناسایی قرار گرفت.

۴.۲. بررسی خواص ضد قارچی ساپونین

بررسی خواص ضد قارچی ساپونین با استفاده از روش ریز رقیق‌سازی محیط کشت (Broth Microdilution Method) انجام گرفت. سویه‌های قارچ *Aspergillus fumigatus* PTCC5009 و مخمر *Candida albicans* ATCC10231 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند. پس از رشد قارچ و مخمر، آن‌ها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی-های تک ایجاد شده، به محیط برات در لوله‌های آزمایش وارد شدند. سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبور نوری ۹۰ درصد استاندارد اندازه‌گیری شد که تقریباً معادل ۱۰۶ سلول قارچ در هر میلی‌لیتر می‌باشد. مایع تلقیحی تهیه شده بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت تا در فاصله زمانی پس از استاندارد کردن، تکثیر صورت نگیرد.

از لوله فوق که حاوی ۱۰۶ سلول قارچ و یا مخمر بود به مقدار یک میلی‌لیتر به هر کدام از لوله‌های استریل اضافه شد. سپس از ساپونین با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که در محیط Broth Microdilution حل شده بود به مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از ترکیب ضد قارچ نیستاتین که از داروخانه تهیه شده بود، بر اساس میزان ماده مؤثره در هر گرم از قرص، غلظت‌های فوق تهیه شد و به مقدار یک میلی‌لیتر به لوله‌های حاوی قارچ و یا مخمر افزوده شد. به‌عنوان شاهد منفی نیز به یکی از لوله‌ها، ماده فعال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده مؤثره و قارچ قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص

جدول ۱- تاثیر غلظت ساپونین استروئیدی خیار دریایی *Stichopus hermanni* بر مهار رشد گونه‌های قارچ و مخمر مورد مطالعه (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) ((-)) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده شد.

<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت ساپونین استروئیدی	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت ساپونین استروئیدی
+	+	۱۰۰	+	+	۲
+	-	۲۰۰	+	+	۴
+	-	۳۰۰	+	+	۱۰
-	-	۴۰۰	+	+	۲۰
-	-	۵۰۰	+	+	۳۰
-	-	۱۰۰۰	+	+	۴۰
-	-	۲۰۰۰	+	+	۵۰

جدول ۲- تاثیر غلظت ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی خیار دریایی *Stichopus hermanni* بر مهار رشد گونه‌های قارچ و مخمر مورد مطالعه (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) ((-)) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده شد.

<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی
-	-	۱۰۰	+	+	۲
-	-	۲۰۰	+	+	۴
-	-	۳۰۰	+	+	۱۰
-	-	۴۰۰	+	+	۲۰
-	-	۵۰۰	+	-	۳۰
-	-	۱۰۰۰	+	-	۴۰
-	-	۲۰۰۰	+	-	۵۰

جدول ۳- تاثیر غلظت ترکیب نیستاتین بر مهار رشد گونه‌های قارچ و مخمر مورد مطالعه (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) ((-)) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده شد.

<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت نیستاتین	<i>C. albicans</i>	<i>A. fumigatus</i>	غلظت نیستاتین
-	-	۱۰۰	+	+	۲
-	-	۲۰۰	+	+	۴
-	-	۳۰۰	+	+	۱۰
-	-	۴۰۰	+	+	۲۰
-	-	۵۰۰	+	+	۳۰
-	-	۱۰۰۰	+	+	۴۰
-	-	۲۰۰۰	-	-	۵۰

ساپونین استروئیدی استخراج شده از عصاره اتانولی خیار دریایی *S. hermanni* در حداقل غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد قارچ *A. fumigatus* و در حداقل غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد مخمر *C. albicans* را مهار نمود (جدول ۱). این ساپونین تنها بر قارچ *A. fumigatus* خاصیت کشندگی نشان داد و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب از بین رفتن آن شد (جدول ۴).

۲.۱.۳. خواص ضد قارچی ساپونین گلیکوزیدی-

استروئیدی خیار دریایی *Stichopus hermanni* حداقل غلظت مهارکنندگی برای ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی استخراج شده از خیار دریایی *Stichopus hermanni* بر قارچ *A. fumigatus* برابر با ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بر مخمر *C. albicans* برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (جدول

موجود در این فرکشن‌ها ساپونین استروئیدی شناسایی شد. علاوه بر این در سایر فرکشن‌ها دو لکه ظاهر شد که یک لکه با رنگ بنفش و $R_f = 0/05$ بود که این R_f در محدوده R_f ساپونین گلیکوزیدی تعیین شد و لکه دیگر به رنگ بنفش تیره با $R_f = 0/82$ و $0/84$ در محدوده R_f ساپونین استروئیدی شناسایی گردید. 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 ضد قارچی آن‌ها بررسی شد.

۱.۳. بررسی خواص ضد قارچی ساپونین

۱.۱.۳. خواص ضد قارچی ساپونین استروئیدی

خیار دریایی *Stichopus hermanni*

جدول ۴ - حداقل غلظت کشندگی (MFC) انواع ساپونین در گونه های قارچ و مخمر مورد مطالعه (بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر).

ترکیب گونه	ساپونین استروئیدی		ترکیب گونه
	ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی	ترکیب نیستاتین	
قارچ <i>A. fumigatus</i>	۴۰۰	۱۰۰	۱۰۰
مخمر <i>C. albicans</i>	-	۴۰۰	۱۰۰

ساپونین را تأیید نمود.

در مطالعه حاضر همچنین اثر ضد قارچی ساپونین های استخراج شده از عصاره خیار دریایی گونه *S. hermanni* بر قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans* بررسی گردید. بر اساس نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی برابر با ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود که دارای بهترین اثر ضدقارچی از این نظر در مقایسه با ساپونین استروئیدی با MIC ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر قارچ *A. fumigatus* بود. همین طور ترکیب ضد قارچ نیستاتین به عنوان شاهد مثبت اثر ضد قارچ بیشتری در مهار رشد نسبت به ساپونین استروئیدی نشان داد اما نسبت به ساپونین گلیکوزیدی اثر ضد قارچ کمتری نشان داد. علاوه بر این ساپونین استروئیدی در غلظت ۴۰۰ و ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اثر کشندگی بر قارچ *A. fumigatus* نشان دادند.

طبق نتایج بررسی اثر مهارکنندگی رشد ترکیبات استفاده شده بر مخمر *C. albicans*، حداقل غلظت مهارکنندگی ساپونین استروئیدی و ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی به ترتیب برابر با ۴۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود. ترکیب نیستاتین اثر ضد قارچ بهتری نسبت به ساپونین ها نشان داد. علاوه بر این، تنها ساپونین گلیکوزیدی-استروئیدی در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و در غلظتی بالاتر از نیستاتین منجر به کشندگی مخمر *C. albicans* شد در حالی که ساپونین استروئیدی در هیچ کدام از غلظت-های به کار گرفته اثر کشندگی بر مخمر نشان نداد. اثر مهارکنندگی ساپونین ها می تواند بسته به ساختار این ترکیبات و مکانیسم مهار سلول باشد. ساپونین ها با اتصال به غشای استرول مخمر *C. albicans* و با تخریب یکپارچگی دیواره سلولی باعث مرگ سلول می شوند و این گونه فعالیت ضد قارچی از خود نشان می دهند (Abraham et al., 2002; Althunibat et al., 2009; Bordbar et al., 2011).

۲. حداقل غلظت کشندگی این ساپونین بر قارچ *A. fumigatus* برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و بر مخمر *C. albicans* برابر با ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (جدول ۴).

۳.۱.۳. بررسی خواص ضد قارچی نیستاتین به

عنوان شاهد مثبت

ترکیب نیستاتین مانع از رشد قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans* در حداقل غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر شد (جدول ۳). حداقل غلظت کشندگی نیستاتین بر قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans* برابر با ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بود (جدول ۴).

۴. بحث و نتیجه گیری

ساپونین یکی از مهم ترین ترکیبات زیست فعال موجود در خیار دریایی است که دارای خواص ضد میکروبی می باشد. در مطالعه حاضر خواص ضد قارچی ساپونین استخراج شده از عصاره اتانولی خیار دریایی گونه *S. hermanni* که از آب های خلیج فارس در اطراف جزیره لارک جمع آوری شده بود مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس شناسایی انجام شده با کروماتوگرافی لایه نازک (Salari et al., 2017)، در تعدادی از فرکشن ها یک لکه به رنگ بنفش آبی با $R_f=0/9$ ظاهر شد که رنگ بنفش آبی آن به دلیل حضور ساپونین هایی است که با استروئید باند شده است و R_f آن طبق مطالعات منبع در محدوده R_f ساپونین های استروئیدی (۰/۴ تا ۰/۹) می باشد (Wagner and Bladt, 1996). در سایر فرکشن ها دو لکه ظاهر شد، یک لکه با میزان R_f برابر با ۰/۸۴ و ۰/۸۲ که در محدوده R_f ساپونین های استروئیدی می باشد و به علت قطبیت کمتر به سمت بالا حرکت کرده و لکه دیگر به علت قطبی بودن در پایین قرار دارد و R_f آن در محدوده ساپونین گلیکوزیدی (۰/۲۵-۰/۰۵) می باشد (Wagner and Bladt, 1996). کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا نیز شناسایی

در مطالعاتی که توسط Batrakov و همکاران (۱۹۸۰) انجام شد، ترکیبی از گلیکوزیدهای تری‌ترین یا Cucumariosides با فعالیت ضد قارچی از دیواره بدن خیار دریایی *Cucumaria japonica* استخراج شد. نتایج نشان داد که این ترکیب باعث مهار رشد مخمر *C. albicans* می‌شود (Batrakov et al., 1980). Hua و همکاران (۲۰۱۹) فعالیت مهارکنندگی گلیکوزید تری‌ترین خیار دریایی گونه *Holothuria scabra* را بر قارچ *A. fumigatus* و مخمر *C. albicans* بررسی نمودند. نتایج نشان داد که گلیکوزیدها بر سویه‌های مورد مطالعه اثر مهارکنندگی با MIC ۱ تا ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. در جمع‌بندی تحقیق بیان شد که گلیکوزیدهای استخراج شده از خیار دریایی یک منبع بسیار خوب از ترکیبات ضد قارچی هستند و نسبت به عوامل قارچی حساس می‌باشند (Hua et al., 2009). در مقایسه با نتایج تحقیق حاضر، در مطالعات Hua و همکاران اثر ضد قارچی قوی‌تری در غلظت‌های پایین به دست آمد که احتمالاً به این دلیل است که گونه مورد مطالعه خیار دریایی و ترکیبات استخراج شده از نظر ساختاری متفاوت هستند و نیاز به تحقیقات گسترده‌تری برای بررسی ارتباط بین ساختار ترکیبات با فعالیت‌های ضد قارچی وجود دارد.

نتایج تحقیق حاضر همچنین نتایج Parisihni و Revianti (۲۰۱۳) که به بررسی خواص ضد قارچی عصاره متانولی خیارهای دریایی *S. hermanni* و *H. atra* با استفاده از روش انتشار دیسک بر مخمر *C. albicans* پرداختند (Parisihni and Revianti, 2013)، تطابق دارد. Husni و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت ضد قارچی مایع سلومیک و ساپونین‌های خام خیار دریایی گونه *S. japonicas* را بر سویه‌های قارچی مورد بررسی قرار دادند. بیشترین اثر ممانعتی مربوط به مخمر *C. albicans* و کم‌ترین اثر ممانعتی مربوط به قارچ *A. niger* بود و *C. albicans* حساسیت بیشتری نسبت به *A. niger* نشان داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کلیه همکاران محترم در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان و اداره کل محیط زیست هرمزگان به دلیل مساعدت‌های فراوان و فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایند.

References

Abraham, T.J., Nagarajan, J., Shanmugam, S.A., 2002. Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 31(2), 161-164.

Althunibat, O.Y., Hashim, R.B., Taher, M., Daud, J.M., Ikeda, M.A., Zali, B.I., 2009. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of three Malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research* 37(3), 376-387.

- Batrakov, S.G., Girshovich, E.S., Drozhzhina, N.S., 1980. Triterpene glycosides with antifungal activity isolated from the sea cucumber, *Cucumaria japonica*. *Antibiotiki* 25(6), 408-411.
- Bordbar, S., Anwar, F., Saari, N., 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review. *Marine Drugs* 9(10), 1761-1805.
- Caulier, G., Van Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I., 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., Acikara, O.B., 2012. Column chromatography for terpenoids and flavonoids, chromatography and its applications, S. Dhanarasu (Ed.), InTech. 224 p.
- Dong, P., Xue, C., Du, Q., 2008. Separation of two main triterpene glycosides from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei* by high-speed countercurrent chromatography. *Acta Chromatographica* 20(2), 269-276.
- Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M., 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.
- Green, L., Petersen, B., Steimel, L., Haeber, P., Current, W., 1994. Rapid determination of antifungal activity by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology* 32(4), 1088-1091.
- Hostettmann, K., Marston, A., 1995. Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Saponins. Cambridge University Press, New York, NY. 548 p.
- Hua, H., Yi, Y., Li, L., Liu, B., La, M.P., Zhang, H.W., 2009. Antifungal active triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria scabra*. *Acta Pharmacologica Sinica* 44, 620-624.
- Husni, A., Shin, I., Chung, D., 2012. Antifungal activity of sea cucumber (*Stichopus japonicus*) extracts. *Pharmaceutical Biology Research Gate* 50(3), 338.
- Mokhlesi, A., Saeidnia, S., Gohari, A.R., Shahverdi, A.R., Nasrolahi, A., Farahani, F., Khoshnood, R., Es'haghi, N., 2012. Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7(3), 243-249. (In Farsi)
- Parisihni, K., Revianti, S., 2013. Antifungal effect of *Sticophus hermanii* and *Holothuria atra* extract and its cytotoxicity on gingiva-derived mesenchymal stem cell. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)* 46(4), 218-223.
- Paul, V.J., Ritson-Williams, R., 2008. Marine chemical ecology. *Natural Product Reports* 25(4), 662-695.
- Ramani, R., Chaturvedi, V., 2000. Flow cytometry antifungal susceptibility testing of pathogenic yeasts other than *Candida albicans* and comparison with the NCCLS broth microdilution test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(10), 2752-2758.
- Salari, Z., Sourinejad, I., Nazemi, M., Yousefzadi, M., 2017. Qualitative survey of the extracted saponin from the Persian Gulf sea cucumber *Stichopus hermanni*. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 5(1), 21-36. (In Farsi)
- Salari, Z., Sourinejad, I., Nazemi, M., Yousefzadi, M., 2018. Antibacterial activity of Saponin extracted from the sea cucumber (*Stichopus hermanni*) collected from the Persian Gulf. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 27(1), 59-70. (In Farsi)
- Sarhadizadeh, N., Afkhami, M., 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., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* 6(6), 551-557.
- Villa, F.A., Gerwick, L., 2010. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32(2), 228-237.
- Wagner, H., Bladt, S., 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Springer Science and Business Media. 384 p.