



سنجش اثر ضدباکتریایی ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از گناد خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام، خلیج فارس

ملیکا ناظمی^{۱*}، یزدان مرادی^۲، هادی غفاری^۳، کیوان جلالی خانقاه^۱، فرحناز لکزایی^۴

۱. استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

۲. دانشیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳. استادیار، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۴. دانشجوی دکتری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۰۸

تاریخ ارسال: ۱۳۹۷/۱۰/۲۶

چکیده

با توجه به اثرات ضد میکروبی خیارهای دریایی و فراوانی گونه *Holothuria leucospilota* در آب‌های خلیج فارس، در این تحقیق علمی به بررسی خواص ضد باکتریایی ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی پرداخته شده است. عصاره استونی از پودر خشک خیار دریایی تهیه شد، سپس جدا سازی ترکیب بتا آمبرین با استفاده از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل و شناسایی آن با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی انجام شد. اثرات ضدباکتریایی با آزمون رقت لوله ای، روی سویه‌های باکتریایی؛ اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا نمونیا، پروتئوس ولگاریس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، نوکاردیا برازیلینسیس مورد سنجش قرار گرفت. ترکیب بتا آمبرین با فرمول شیمیایی C₃₀H₄₈O به مقدار ۹۸ درصد در فرکشن شماره ۱۱ شناسایی شد. این ترکیب در غلظت برابر ۱۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس و در غلظت ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس و سالمونلا تیفی شده است. بنابراین ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی *H. leucospilota* می‌تواند به عنوان انتخاب مناسب برای تولید داروهای ضدباکتریایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: خیار دریایی، ترکیبات طبیعی، ترپنوئید، ضدباکتریایی، خلیج فارس.



The Antibacterial activity of β amberine extracted from the gonad of sea cucumber *Holothuria leucospilota* inhabiting Hengam island, Persian Gulf

M. Nazemi^{1*}, Y. Moradi², H. Ghaffari³, K. Ejlali Khangah¹, F. Lakzaei⁴

1- Assistant Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

4- Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: 16-Janu-2019

Accepted: 29-Nove-2019

Abstract

Owing to the antibacterial activities of sea cucumber and the abundance of *Holothuria locuspila* in the Persian Gulf, the antibacterial activity of β amberine extracted from the gonad of this sea cucumber species was studied. In this investigation, acetone extract was prepared from the dried powder of sea cucumber. Isolation of β amberine was carried out by column chromatography on silica gel and identification was carried out by TLC and GC/MS. In vitro antibacterial screening was determined by broth dilution against bacteria; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Nocardia brasiliensis*. The β amberine formula $C_{30}H_{48}O$ was detected by GC/MS from no. 11 fraction with 98% purity. This component showed considerable activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* (MBC = 1000 μ g/mL) and *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* (MBC = 2000 μ g/mL). According to our results, β amberine extracted from sea cucumber can be considered as a source of novel antibacterial drug.

Keywords: sea cucumber, natural products, terpenoid, antibacterial activity, Persian Gulf.

۱. مقدمه

سالیان طولانی است که از ترکیبات طبیعی به عنوان غذا، رنگدانه، حشره کش، لوازم آرایشی بهداشتی، دارو و... استفاده می‌گردد (Joseph and Sujatha, 2011). در این میان نقش ترکیبات طبیعی با منشاء دریایی در سال‌های اخیر بسیار حائز اهمیت است (Mancini et al., 2007). تقریباً ۸۰ درصد موجودات جهان در دریاها زندگی می‌کنند (McCarthy and Pomponi, 2004). تنوع گونه‌های عظیمی در این اکوسیستم وجود دارد؛ در مناطق حاره ای نزدیک به ۱۰۰۰ گونه مختلف در هر متر مربع یافت می‌شود. رقابت بر سر فضا، غذا و دفاع از خود منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود. این جانداران از متابولیت‌های ثانویه به منظور برقراری ارتباط با هم و محیط استفاده می‌کنند، این مولکول‌ها رابطه همزیستی را نیز فراهم می‌نمایند (Datta et al., 2015).

ترکیبات طبیعی در سه دسته؛ متابولیت‌های اولیه، متابولیت‌های ثانویه و پلیمرها با وزن مولکولی بالا تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه شامل؛ اسیدهای نوکلئیک، اسیدهای آمینه و قندها هستند که در تمام سلول‌ها وجود داشته و در تولید مثل و متابولیسم نقش دارند، پلیمرها با وزن مولکولی بالا مانند؛ سلولز، لیگنین و پروتئین‌ها در ساختار سلول نقش دارند. متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی متشکل از مولکول‌های کوچک اند که در رشد و تکامل جاندار از عوامل اساسی و ضروری محسوب نمی‌شوند، اما فعالیت‌های زیستی روی سایر موجودات دارند، در واقع منظور از ترکیبات طبیعی همان متابولیت‌های ثانویه است (Hanson, 2003). با وجود آنکه کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی جانداران دریایی می‌گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است (Munro, 1998).

خيارهای دریایی متعلق به شاخه خارپوستانند (Campbell and Dawes, 2005)، و طبق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، خيار دریایی به واسطه افزایش تولید و تجارت جهانی، ارزش تجاری بالایی دارد.

خيارهای دریایی تازه یا خشک شده قرن‌هاست که یک غذای آسیایی لذیذ محسوب می‌شود و همچنین در فرمولاسیون داروهای سنتی در شرق آسیا استفاده می‌شود (Torral-Granda, 2008). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد خيارهای دریایی منبع غنی از ترکیبات طبیعی با خواص بیولوژیک مانند؛ ضد رگزایی، ضد سرطان، ضد انعقاد، ضد فشار خون بالا، ضد التهاب، ضد میکروبی، آنتی اکسیدان، ضد لخته شدن، ضد تومور و بهبود دهنده زخم می‌باشد، بیشتر این خواص به ترکیبات ترپنوئیدی، سولفات کندرویتین، گلیکوز آمینوگلیکان، پلی ساکارید سولفات، استرول، فنول، پپتیدولکتین نسبت داده شده است (Bordbar et al., 2011).

عصاره ترکیبات زیستی استخراج شده از خيار دریایی در مطالعات مختلف به عنوان عوامل ضد میکروبی بالقوه ثابت شده است (Rahman, 2014)، با توجه به خواص ضد میکروبی ترکیبات ترپنوئید استخراج شده از خيارهای دریایی، در این پژوهش علمی به بررسی اثر ضدباکتریایی ترکیب بتا آمبرین جداسازی شده از خيار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* از جزیره هنگام، خلیج فارس پرداخته شد.

ترکیب بتا آمبرین یک تری ترپنوئید پنج حلقه ای با اسکلت اولانی است و جزء ترکیبات طبیعی محسوب می‌شود (Kushiro et al., 1998). تری ترین گلوکوزید با دارا بودن بیشترین فعالیت زیستی؛ ضدقارچ، سیتوتوکسیک، همولیتیک و تقویت کننده سیستم ایمنی است و مهمترین متابولیت ثانویه شناخته شده در خيارهای دریایی محسوب می‌شود (Chludil et al., 2002).

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. نمونه برداری خيار دریایی

نمونه های خيار دریایی گونه *H. leucospilota*، به تعداد ۱۵ عدد در مرداد ماه سال ۱۳۹۴ توسط غواصی و از عمق ۱۵ تا ۲۰ متر از شمال جزیره هنگام، واقع در

خلیج فارس تهیه شدند.

۲.۴. شناسایی ترکیب بتا آمبرین

فراکسیون‌های به دست آمده از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای توسط کروماتوگرافی لایه نازک مرکب با کد ۱۰۵۵۵۳ با فاز متحرک شامل حلال‌های متانول-کلروفرم-ان بوتانول با نسبت‌های ۱۰:۲۰:۷۰ انجام شد. به منظور شناسایی ترکیب بتا آمبرین (متعلق به تری ترپنوئیدها) از معرف وانیلین-اسید سولفوریک، به صورت محلول ۱ درصد وانیلین در اتانول و محلول ۵ درصد اسید سولفوریک در اتانول به صورت اسپری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. پس از اسپری صفحات کروماتوگرافی لایه نازک در آون و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند، تغییرات در نور مرئی بررسی شد؛ نمونه‌های ترپنوئید به رنگ بنفش کم‌رنگ - پرنرنگ تغییر رنگ دادند (Attaway et al., 1965). پس از ظهور لکه‌ها R_f هر یک از آنها از رابطه زیر محاسبه شد:

$$R_f = \text{فاصله حلال از مبدأ} / \text{فاصله لکه از مبدأ}$$

لکه‌هایی که به رنگ بنفش در آمدند و R_f آن‌ها در حدود ۰/۶ بود. برای شناسایی ترکیب بتا آمبرین به دستگاه جی سی مس (ساخت کشور آمریکا مدل Agilent 7000 Series Triple Quad GC/MS MainFrame) تزریق شدند.

۲.۵. بررسی خواص ضدباکتریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش رقت لوله‌ای^۲ انجام گرفت (Rosenblatt, 1991). سویه‌های باکتری اشرشیاکلی^۳، سودوموناس آئروژینوزا^۴، کلبسیلا نمونیا^۵، پروتئوس ولگاریس^۶، سالمونلا تیپھی^۷،

۲.۲. عصاره‌گیری از خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی در ابتدا به صورت طولی برش داده شدند و اندام‌های داخلی و گندها از داخل بدن خیار دریایی خارج شد، سپس گند، در دستگاه فریز درایر (شرکت درسا تک، مدل alpha1-4 LSCplus) در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد خشک، سپس توسط آسیاب پودر شد. به پودر تهیه شده که به مقدار ۵۰ گرم بود، ۲۵۰ سی سی استون افزوده شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در تاریکی به منظور جداسازی ترکیبات طبیعی قرار گرفتند (Çitoğlu and Acıkara, 2012). پس از مدت زمان طی شده محلول به دست آمده از صافی عبور داده شد و متابولیت‌های ثانویه محلول در استون به دستگاه روتاری (هیدولف آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۴۵ در دقیقه تا تبخیر کامل حلال قرار داده شد.

۲.۳. جداسازی ترکیب بتا آمبرین^۱

عصاره استونی به وزن ۶/۲۰ گرم از گند خیار دریایی برای جداسازی با استفاده از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ای با ارتفاع ۷۰ سانتی‌متر و با قطر داخلی ۲ سانتی‌متر حاوی سیلیکاژل مرکب به اندازه ۰/۲ تا ۰/۶ میلی‌متر، منتقل شد. شست و شوی عصاره استونی توسط حلال‌های ان‌هگزان-اتیل استات به عنوان فاز متحرک با نسبت‌های؛ ۱۰۰:۰ - ۹۰:۱۰ - ۸۰:۲۰ - ۷۰:۳۰ - ۶۰:۴۰ - ۵۰:۵۰ - ۴۰:۶۰ - ۳۰:۷۰ - ۲۰:۸۰ - ۱۰:۹۰ - ۰:۱۰۰، انجام شد و فرکشن‌ها در هر ۱۰ سی سی جداسازی شدند (۱۱۲ فرشکن) (Çitoğlu and Acıkara, 2012).

¹ β amberine

² Bacterial Broth Dilution Methods

³ *Escherichia coli* ATCC 2785

⁴ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2785

⁵ *Klebsiella pneumonia* ATCC 1053

⁶ *Proteus vulgaris* PTCC 1079

⁷ *Salmonella typhi* PTCC 1609

حداقل غلظت کشندگی تشخیص داده شد (Rosenblatt, 1991).

۳. نتایج

۳.۱. جداسازی ترکیب لانوسترول توسط

کروماتوگرافی لایه نازک

در جدول شماره ۱، میزان R_f فرکشن‌های مختلف توسط کروماتوگرافی لایه نازک که با معرف وانیلین واکنش نشان داده اند، مشاهده می‌گردد. همان طور که از این جدول برداشت می‌شود فرکشن شماره ۱۱ (۳) که حاصل شست و شوی ستون سیلیکاژل اتیل استات - ان هگزان ۳۰:۷۰ خالص است دارای R_f برابر ۰/۶۹ است که نزدیک‌ترین میزان به ترکیب بتا آمبرین است.

۳.۲. شناسایی ترکیب بتا آمبرین توسط

کروماتوگرافی گازی

همان طور که در شکل‌های شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد، ترکیب بتا آمبرین (-octamethyl- 4, 4, 6a, 6b, 8a, 11, 12, 14b) فرکشن‌های 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 14, (IUPAC = 14a, 14 b-icosahydricen-3-one) با فرمول شیمیایی C₃₀H₄₈O، وزن مولکولی ۴۲۴/۷۰ g.mol⁻¹ که به گروه تری ترپنوئیدها تعلق دارد، به مقدار ۹۸ درصد در فرکشن شماره ۱۱ (۳) (اتیل استات - ان هگزان ۳۰:۷۰) در دقیقه ۴۱ تا ۴۲ شناسایی شد.

۳.۳. بررسی خواص ضدباکتری فرکشن حاوی

ترکیب بتا آمبرین

مطابق جدول ۲؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (باکتریواستاتیک) ترکیب بتا آمبرین برای

استافیلوکوکوس آرتوس^۱، باسیلوس سوبتیلیس^۲، باسیلوس سرئوس^۳، نوکاردیا برازیلینسیس^۴ از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس هر کدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی‌های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود.

پس از رشد باکتری‌ها کلونی‌های تک ایجاد شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت برات به مقدار ۱ میلی لیتر وارد شد، اشاره به این نکته لازم است که تعداد باکتری‌های مورد آزمایش برابر ۱۰*۵/۵ بود. سپس از ترکیب بتا آمبرین با غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر که در محیط برات حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد و آزمایش با سه بار تکرار انجام شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی سیلین، با غلظت‌های فوق استفاده شد. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شد و کدورت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لوله‌هایی را که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود به منظور ادامه کار جدا شدند. لازم به ذکر است غلظت مواد مصرفی در لوله‌های بدون کدورت میزان باکتریواستاتیک را نشان داد. در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی ترکیب‌های مورد نظر در از بین بردن باکتری‌ها از لوله‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده نشده بود به مقدار ۰/۱ میلی لیتر به پلیت‌های استریل تزریق شد و محیط نوترینت آگار به آن اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت تعداد کلونی‌های تشکیل شده مورد بررسی قرار گرفت. در پلیت‌هایی که هیچ گونه کلونی مشاهده نشد

¹ *Staphylococcus aureus aureus* ATCC 1764

² *PTCC subtilis spizizenii Bacillus* 1715

³ *ATCC cereus Bacillus* 11778

⁴ *Nocardia brasiliensis* PTCC 1422

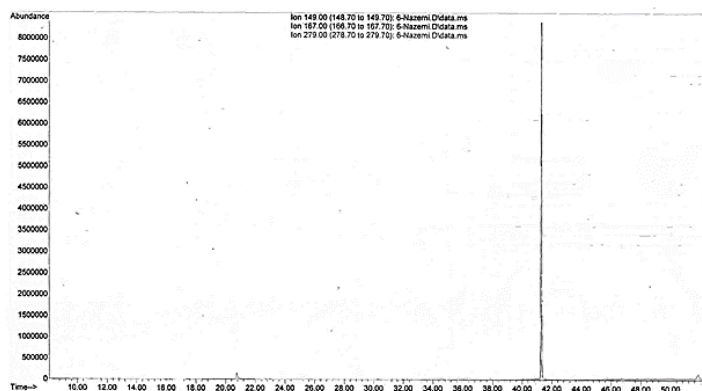
اشرشیاکلی برابر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و باکتری سالمونلا تیفی برابر ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است.

باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس برابر ۵۰۰ ماکرو گرم در میلی لیتر، استتافیلوکوکوس آرئوس و

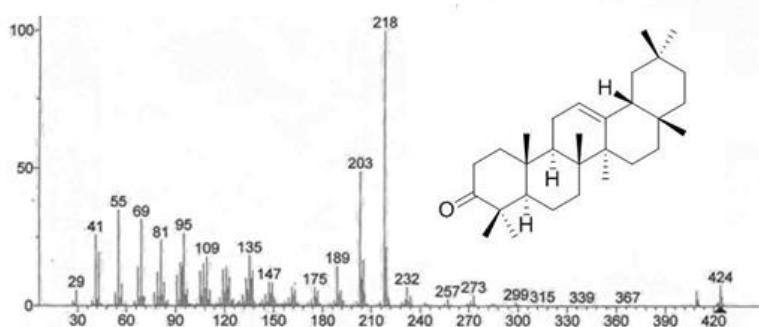
جدول ۱- مشخصات لکه‌های ترپنوئید فرکشن‌های عصاره متانولی گناد خیار دریایی.

شماره فرکشن	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R _f	شماره فرکشن	فاز متحرک ستون (درصد حلال)	رنگ لکه (با معرف وانیلین)	R _f
۱۰(۱)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش کم‌رنگ	۰/۰۵	۱۹	N* ۵۰ : E* ۵۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۸
۱۰(۲)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۵	۲۰	N* ۴۰ : E* ۶۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۸
۱۰(۳)	N* ۸۰ : E* ۲۰	صورتی کم رنگ	۰/۷	۲۱	N* ۴۰ : E* ۶۰	صورتی کم رنگ	۰/۷۷
۱۰(۴)	N* ۸۰ : E* ۲۰	بنفش	۰/۸۹	۲۲	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۱)	N* ۷۰ : E* ۳۰	صورتی کم‌رنگ	۰/۰۳	۲۳	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۲)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۲	۲۴	N* ۴۰ : E* ۶۰	بنفش پررنگ	۰/۸۵
۱۱(۳)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش پررنگ	۰/۶۹	۲۵	N* ۳۰ : E* ۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۴
۱۱(۴)	N* ۷۰ : E* ۳۰	بنفش پررنگ	۰/۹۳	۲۶	N* ۳۰ : E* ۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۴
۱۲	N* ۶۰ : E* ۴۰	بنفش کم رنگ	۰/۲۲	۲۷	N* ۳۰ : E* ۷۰	بنفش پررنگ	۰/۸۲

* (N: حلال ان هگزان، E: حلال اتیل استات، M: متانول)



شکل ۱ - کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی گازی فرکشن شماره ۱۱ (اتیل استات- ان هگزان: ۳۰-۷۰)، حاوی ترکیب بتا آمیرین از گناد خیار دریایی.



شکل ۲- طیف جی سی فرکشن شماره ۱۱ حاوی ترکیب بتا آمیرین.

جدول ۲- حداقل غلظت ممانعت کنندگی فرکشن حاوی ترکیب بتا آمبرین

آمپی سیلین $\mu\text{g/ml}$	غلظت بتا آمبرین $\mu\text{g/ml}$	باکتری
۳۰۰	۵۰۰	<i>Bacillus subtilis</i>
۳۰۰	۱۰۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
۳۰۰	۵۰۰	<i>Bacillus cereus</i>
۵۰۰	۱۰۰۰	<i>Salmonella typhi</i>
۵۰۰	۱۰۰۰	<i>Escherichia coli</i>

برای باکتری‌های اشرشیاکلی برابر ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر است. ترکیب بتا آمبرین اثر کشندگی روی باکتری سالمونلا تیفی از خود نشان نداده است.

مطابق جدول ۳ حداقل غلظت کشندگی باکتریایی ترکیب بتا آمبرین برای باکتری باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس برابر ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و

جدول ۳- حداقل غلظت کشندگی باکتریایی فرکشن حاوی ترکیب بتا آمبرین

آمپی سیلین $\mu\text{g/ml}$	غلظت بتا آمبرین $\mu\text{g/ml}$	باکتری
۵۰۰	۱۰۰۰	<i>Bacillus subtilis</i>
۵۰۰	۲۰۰۰	<i>Staphylococcus aureus</i>
۵۰۰	۱۰۰۰	<i>Bacillus cereus</i>
۱۰۰۰	۲۰۰۰	<i>Escherichia coli</i>
۲۰۰۰	-	<i>Salmonella typhi</i>

عمل می‌کند، همچنین این ترکیب به عنوان ترکیب ترمیم کنند پوست، ضدالتهاب و در کرم‌های ضدآفتاب نیز استفاده می‌شود (Kweifio-Okai et al., 1995).

از ۴۱۹۶ ترکیب طبیعی شناسایی شده از منابع دریایی، ۵۲۱ ترکیب (۱۳ درصد از کل ترکیبات شناسایی شده) دارای خواص ضدباکتری هستند (Hu et al., 2015). ترکیبات بسیاری مانند گلیکوزیدهای استروئیدی، ترپنوئیدها، پپتیدها و ... از خیار دریایی با خواص ضد میکروبی شناسایی شده است. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله بربوزوا، نرم‌تنان، مرجان‌ها و کرم‌های حلقوی آنلیدا و غیره دارای بیشترین آثار ضدباکتریایی هستند (Shakouri et al., 2009).

ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی

۴. بحث

بیش از ۱۸۰۰۰ ترکیب شیمیایی از جانداران دریایی استخراج شده است (MarinLit, 2003)، تا کنون بیش از ۲۰۰۰۰ تری ترپنوئید از منابع طبیعی استخراج و شناسایی شده است. تغییرات در ساختار تری ترپنوئیدها مانند قرار گرفتن؛ استرول‌ها، ساپونین‌های استروئیدی، گلیکوزیدها، کورتیکواستروئیدها و ... سبب شده تا این دسته از ترکیبات جزء مهمترین ترکیبات طبیعی با خواص زیستی قرار گیرند (Zhang, 2011).

در این تحقیق بر اساس شکل ۱ کروماتوگرافی گازی، ترکیب بتا آمبرین از خیار دریایی *H. leucospilota* در فرکشن شماره ۱۱، عصاره استونی استخراج شد. میزان R_f آن ۰/۶۹ سنجیده شد. ترکیب آمبرین بسیار قوی تر از آسپرین در جلوگیری از عملکرد کلاژن در انعقاد خون

ماکروگرم در میلی لیتر از رشد باکتری استافیلوکوکوس آرنوس ممانعت نمود (Fernandes et al., 2012). ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از کارپوبوتوز ادولیز^۲ در غلظت کمتر از ۲۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس آرنوس و اشرشیاکلی ممانعت نموده است (Martins et al., 2011).

مطالعات انجام شده روی فرکشن‌های خیار دریایی *Athyridium chilensis* نشان می‌دهد که ترکیبات خالص سازی شده اثر ضدباکتری نسبت به باکتری‌های گرم مثبت؛ استافیلوکوکوس آرنوس و باسیلوس سوبتیلیس دارد، اما روی باکتری‌های گرم منفی اثر کشندگی از خود نشان نمی‌دهد (Sottorff et al., 2013). ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی *H. leucospilota* در این پروژه تحقیقاتی مانند سایر مطالعات آزمایشگاهی از رشد باکتری‌های باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی ممانعت کرد. همان طور که نتایج نشان می‌دهد ترکیب بتا آمبرین مورد بررسی در این پژوهش منجر به مرگ باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس آرنوس و باکتری گرم منفی اشرشیاکلی می‌گردد، که نشان دهنده اثر ضدباکتریایی قوی تری نسبت به سایر منابع استخراج شده بتا آمبرین در خیار دریایی است. آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی نسبت به ترکیبات طبیعی دریایی حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهند (Mancini et al., 2007) اما همان طور که نتایج آزمایش‌ها نشان می‌دهد ترکیب بتا آمبرین استخراج شده از خیار دریایی *H. leucospilota* دارای اثر ضدباکتریایی نسبتاً قوی روی باکتری‌های گرم منفی است، بنابراین با مطالعات بیشتر می‌توان از آن به عنوان منبع مناسب برای تولید داروهای ضدباکتریایی استفاده نمود.

H. leucospilota در این پروژه تحقیقاتی نشان داد که این ترکیب در غلظت برابر ۱۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ باکتری‌های گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس خواهد شد. ترکیب بتا آمبرین روی باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی و سالمونلا تیفی منجر به ممانعت از رشد شده است. اما این ترکیب تنها روی باکتری اشرشیاکلی در غلظت ۲۰۰۰ ماکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ شده است. آزمایش‌های انجام شده نشان می‌دهد که باکتری‌های گرم مثبت از باکتری‌های گرم منفی نسبت به ترکیبات طبیعی دریایی حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهند، که این تفاوت به علت اختلاف دیواره باکتری‌ها است (Bordbar et al., 2011). در باکتری‌های گرم منفی دیواره باکتری از یک واحد اضافی شامل فسفولیپید، پروتئین و پلی ساخارین تشکیل یافته است. در حالیکه دیواره باکتری گرم مثبت فاقد چربی است و میزان پروتئین کمتری دارد و عموماً از پلی ساخارین‌ها و پپتیدوگلیکان تشکیل یافته است. به همین علت باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی ضعیف ترند (Bordbar et al., 2011).

خیارهای دریایی دارای مقادیر قابل توجهی از ویتامین‌ها، عناصر معدنی، سربروزیدها، پپتیدها و لکترین‌ها و همچنین دارای مولکول‌های منحصر به فرد مانند پلی ساکاریدها، ۱۲ متیل تترادکانوئیداسید (12-MTA) (Sottorff et al., 2013)، در مطالعه ای که در رابطه با خواص ضدباکتری به روش دیسک ترکیب بتا آمبرین که از گیاه لائورنیکا میکروکلادیا^۱ انجام شد، این ترکیب در غلظت‌های ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر از رشد هاله باکتری استافیلوکوکوس آرنوس تا قطر ۲۰، ۲۶ و ۱۴ میلی متر و ۲۰، ۱۶ و ۱۱ میلی متر از رشد هاله باکتری سالمونلا تیفی ممانعت نموده است (Abdel-Raouf et al., 2015). در مطالعه دیگری که روی میوه آمیکارا انجام شد، ترکیب بتا آمبرین در غلظت ۹۰

¹ *Laurencia microcladia*

² *Carpobrotus edulis*

سپاسگزاری

این مقاله منتج از پروژه تحقیقاتی م صوب پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان با عنوان " جدا سازی و بررسی خواص زیستی ترپنوئید از خیار دریایی گونه

Holothuria leucospilota موجود در خلیج فارس با شماره مصوب ۹۲۱۲۸-۱۲-۷۵-۲ است. بدینوسیله از همکاری عزیزانی که در انجام آن با ما همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد. ضمناً نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان در تعارض ندارد.

References

- Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M., Al-Othman, M. R., Hatamleh. A. A., 2015. Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. *Arabian Journal of Chemistry* 8 (1), 32-37.
- Attaway, J., Barabas, L., Wolford, R., 1965. Analysis of Terpene Hydrocarbons by Thin Layer Chromatography. *Analytical Chemistry* 37 (10), 1289-1290.
- Bordbar, S., F, Anwar., N. Saari., 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Marine Drugs* 9 (10),1761-1805.
- Campbell, A. C., and J. Dawes., 2005. The Encyclopedia of underwater life: Oxford University Press.
- Chludil, H. D., C. C. Muniain, A. M. Seldes., M. S. Maier., 2002. Cytotoxic and Antifungal Triterpene Glycosides from the Patagonian Sea Cucumber *Hemioderma s pectabilis*. *Journal of natural products* 65 (6), 860-865.
- Çitoğlu, G. S., Ö. B. Acikara., 2012. Column Chromatography for Terpenoids and Flavonoids. In *Chromatography and its applications: INTECH Rijeka*, 13-49.
- Fernandes, C. P., A. L. Corrêa, J. F. Lobo, O. P. Caramel, F. B. De Almeida, E. S. Castro, K. F. Souza, P. Burth, L. M. Amorim, and M. G. Santos., 2012. Triterpene esters and biological activities from edible fruits of *Manilkara subsericea* (Mart.) Dubard, Sapotaceae. *BioMed research international* 2013.
- Hu, Y., J. Chen, G. Hu, J. Yu, X. Zhu, Y. Lin, S. Chen., J. Yuan., 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs* 13 (1),202-221.
- Joseph, B., and S. Sujatha., 2011. Pharmacologically important natural products from marine sponges. *Journa Natural Products* 4(1),5-12.
- Kushiro, T., M. Shibuya, and Y. Ebizuka., 1998. β -Amyrin synthase. *European Journal of Biochemistry* 256 (1),238-244.
- Kweifio-Okai, G., F. De Munk, T. A. Macrides, P. Smith., B. A. Rumble., 1995. Antiarthritic mechanisms of lupeol triterpenes. *Drug development research* 36 (1),20-24.
- Mancini, I., A. Defant., G. Guella., 2007. Recent synthesis of marine natural products with antibacterial activities. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)* 6 (1),17-48.
- MarinLit, V. S., 2003. A marine literature database produced and maintained by the Department of Chemistry. University of Canterbury, New Zealand.
- Martins, A., A. Vasas, M. Viveiros, J. Molnár, J. Hohmann., L. Amaral., 2011. Antibacterial properties of compounds isolated from *Carpobrotus edulis*. *International journal of antimicrobial agents* 37 (5),438-444.
- Munro, M. H., 1998. Marine bioprocess engineering: from ocean to industry Meeting.
- Rahman, M. A., 2014. Global Sea Cucumber Fisheries: Their Culture Potentials, Bioactive Compounds and Sustainable Utilizations. *International Journal of Advances in Chemical Engineering and Biological Sciences* 1 (2),193-197.
- Rosenlatt, J. E., 1991. Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Paper read at Mayo Clinic Proceedings.
- Shakouri, A., M. Nabavi, P. Kochanian, A. Savari, A. Safahieh., T. Aminrad., 2009. New observation of two species of sea cucumbers from Chabahar Bay (Southeast Coasts of Iran). *Asian Journal of Animal Sciences* 3 (4),130-134.
- Sottorff, I., A. Aballay, V. Hernández, L. Roa, L. X. Muñoz, M. Silva, J. Becerra., A. Astuya., 2013. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Rev. biol. mar. oceanogr* 48,23-35.

Toral-Granda, V., 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Latin America and the Caribbean. Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper* 516,213-229.

Zhang, J., 2011. Extraction, isolation, and structure elucidation of two new triterpene glycosides from sea cucumber *Holothuria nobilis*. *Chin Tradit Herb Drugs* 42 (8),1467-1472.