شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
صفحات ۵۷۸-۵۶۷

بررسی اثر ضدباکتریایی صابون تهیه شده از خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*

ملیکا ناظمی[1*]، یزدان مرادی[2]، هادی غفاری[3]و رامین کریم زاده[4]،کیوان اجلالی خانقاه[5]

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. کارشناس ارشد، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

۵. استادیار، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس،ایران

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۲/۲۴ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۰۶/۳۱

چکیده

با توجه به وجود انواع مختلف و خواص زیستی خیارهای دریایی، در این مقاله پژوهشی؛ خواص ضدباکتری و توانایی تولید صابون از پودر، عصاره متانولی و ساپونینی خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota* استحصال شده از جزیره لاوان مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های خیار دریایی پس از آماده سازی خشک و سپس پودر شدند. عصاره گیری با استفاده از حلال‌های متانول به منظور دست یابی به عصاره تام، و اتانول ۷۰ درصد به منظور تهیه عصاره حاوی بیشترین مقدار ترکیبات ساپونینی با استفاده از روش خیساندن انجام شد. به منظور تعیین کیفیت ساپونین تعیین اندیس کف کنندگی ساپونین انجام شد. تولید صابون از خیار دریایی به روش‌های استفاده از گلیسیرین انجام شد. در نهایت با استفاده از پودر؛ عصاره خشک متانولی و ساپونینی با نسبت‌های ۱، ۵ و ۱۰ درصد صابون‌های خیار دریایی تهیه شدند. به منظور بررسی اثرات ضد باکتری با استفاده از روش رقت لوله ایی اثر عصاره‌ها و صابون‌های تهیه شده روی سویه باکتری استافیلوکوکوس آرئوس عامل جوش صورت انجام شد. نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد عصاره متانولی و صابون خیار دریایی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۱۰ و۵ میلی‌گرم در میلی لیتر و عصاره ساپونینی آن ۲ و۵ میلی‌گرم در میلی لیتر است. کف ایجاد شده ساپونین خیار دریایی تا بیش از ۱۲ ساعت باقیمانده که نشان دهنده شاخص کف کنندگی بسیار زیاد آن است. صرف نظر از مدت زمان آزمایش، آزمون آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میانگین ارتفاع کف بین حجم‌های ۱۰ میلی‌لیتر و حجم‌های یک، دو، سه، چهار و پنج میلی‌لیتر وجود دارد ($p<0.05$). و در سایر موارد تفاوت معنی‌داری در میانگین ارتفاع کف مشاهدا نشد. در این پروژه که به بررسی اثرات ضدجوش عصاره و صابون از خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا از جزیره لاوان پرداخته شده است اثر ضدباکتریایی آن روی عامل جوش صورت تأیید شده است، بنابراین در بین موارد مورد آزمایش؛ عصاره ساپونینی مورد مطالعه پس از انجام آزمایش‌های تکمیلی می‌تواند به عنوان انتخاب مناسب برای تولید صابون‌های ضدجوش مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: خیار دریایی، عصاره، ضدجوش، صابون آرایشی و بهداشتی، جزیره لاوان، خلیج فارس.

* نویسنده مسئول: ملیکا ناظمی
Email: melikanazemi@yahoo.com

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 4, Winter 2020
pp. 567-578

Investigating the antibacterial activity of soap *Holothuria leucospilota*

Melika Nazemi[1*], Yazdan Moradi[2], Hadi Ghaffari[3] and Ramin Karimzadeh[4]

1. Assistant Professor, Persian Gulf & Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran.
2. Associate Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran.
4. Persian Gulf & Oman Sea Ecological Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Bandar Abbas, Iran.
5. Assistant Professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Cener, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

Received: 14-May-2020 **Accepted: 22-Sep-2020**

Abstract

Due to exist of the different kinds of sea cucumbers and their biological activities, In this study, the antibacterial activities and the soap forming ability of powder, methanolic and saponins extracts of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*). obtained from Lavan Island, were evaluated. Initially Sea cucumbers were dried and subsequently ground. Extraction was performed by methanol solvents to obtain total extract and 70% ethanol. The method of soaking was used in order to prepare the extract containing the ultimate amount of saponin compounds. With the aim of determine the quality of saponin, its index of foam forming ability was evaluated. The production of soap from marine cucumbers was carried out using the method of soaping fats and glycerin. Finally, sea cucumber soaps was produced using powder, methanolic and saponins extracts with ratios of 1, 5 and 10%. In order to fulfill of bacterial analysis, the effect of extracts and prepared soaps on *Staphylococcus aureus* was evaluated using tubular dilution method. The results of the experiment show that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the methanolic extract and marine cucumber soap for *Staphylococcus aureus* is 10 and 5 mg / ml respectively. This index for saponin and its soap is 2 and 5 mg / ml. Regardless of the duration of the experiment, one-way analysis of variance test showed that there was a significant difference in the mean height between volumes of 10 ml and volumes of one, two, three, four and five ml ($p < 0.05$). In other cases, no significant difference was observed in the mean floor height. The produced foam of the sea cucumber saponin remained for more than 12 hours, indicating a very high foam formin ability. In this project, the antibacterial and consequently anti- pimple of extracts and soaps produced from the *Holothuria leucospilota* obtained from Lavan Island were studied and confirmed. Therefore, this compounds can be used as an appropriate choice for the production of anti-pimple soaps.

Key Words: Extract, Antibacterial activity, Cosmetic soap, Lavan Island, Persian Gulf.

Corresponding author: Melika Nazemi Email: melikanazemi@yahoo.com

۱. مقدمه

با وجود آنکه کمتر از چهار دهه از تلاش دانشمندان در رابطه با خواص زیستی ترکیبات شیمیایی جاندارن دریایی می‌گذرد اما تعداد این ترکیبات نسبت به سایر منابع بسیار بیشتر است، تنوع زیستی موجود در محیط‌های دریایی نیز دلیل دیگری برای گوناگونی ترکیبات طبیعی استخراج شده از این اکوسیستم می‌باشد (Munro *et al.*, 1999). اکوسیستم دریایی غنی از؛ اسیدهای چرب غیر اشباع، استروئیدها، ساپونین‌ها، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی ضروری، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدهای فعال می‌باشند (McCarthy and Pomponi, 2004) که بسیاری از آن‌ها خواص زیستی در شرایط in vitro و in vivo را از خود نشان داده‌اند (Newman and Cragg, 2004) همین اثرات زیستی آن‌ها را به منبع حاوی مواد اولیه در راستای تولید محصولات آرایشی و بهداشتی تبدیل نموده است (Kim *et al.*, 2016).

در سال‌های اخیر علاقه مصرف کنندگان محصولات آرایش و بهداشتی به محصولات جدید حاوی ترکیبات طبیعی معطوف شده است، شاید مهمترین دلیل آن فواید قابل توجه محصولات طبیعی در مقابل محصولات سنتز شده باشد. در میان محصولات طبیعی، منابع دریایی در جایگاه نخست قرار دارند (Kim, 2016).

بازار جهانی صنعت محصولات آرایشی و بهداشتی بیش از ده‌ها بیلیون دلار برآورد شده است، ضمن آنکه در این صنعت تولید محصولات نوین از منابع طبیعی بسیار حائز اهمیت است، در این راستا از عصاره‌ها و بخش‌های جدا شده از عصاره (فرکشن) حاوی ترکیبات طبیعی از منابع دریایی به ویژه جلبک‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی، نرم تنان، خارپوستان، سخت پوستان، کوسه‌ها، وال‌ها و ماهیان استفاده می‌گردد (Kim, 2016). امروزه تلاش به منظور استخراج ترکیبات فعال زیستی از منابع دریایی با کاربرد لوازم آرایشی و بهداشتی به ویژه تولید کرم‌ها، لوسیون‌ها و پمادها گسترده‌تر شده است، این محصولات حاوی مواد طبیعی از منابع دریایی هستند که سلامت پوست، مو و ناخن را حفظ و یا تقویت می‌کنند (Kim and Wijesakara 2012).

خارپوستان یکی از شاخه‌های مهم جانوران بی‌مهره محسوب شده و در بردارنده ۷۰۰۰ گونه زنده می‌باشند. خیارهای دریایی متعلق به شاخه خارپوستان بوده و در تمام دریاها و اقیانوس‌ها و در تمام عرض‌های جغرافیایی؛ از مناطق ساحلی تا دشت‌های مغاکی یافت می‌شوند (Mary Bai, 1994). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد خیارهای دریایی منبع غنی از ترکیبات طبیعی مانند ترپنوئیدها، پلی ساکاریدها، فلاونوئیدها و ... با خواص زیستی می‌باشد (Kijjoa and Sawangwong, 2004 ; Bordbar *et al*., 2011).

ساپونین‌های تری ترپنوئیدی یکی از بزرگترین گروه ترکیبات طبیعی هستند که در برخی از گونه‌های آبزیان دریایی؛ شاخه خارپوستان (خیار دریایی و ستاره دریایی) و پوریفرا (اسنفج‌های دریایی) سنتز می‌شود. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد تا کنون نزدیک به ۲۵۰ نوع ساپونین از خیارهای دریایی شناسایی شده است. یکی از مهمترین مشخصه‌های ساپونین‌های دریایی قرار گرفتن گلیکون‌های سولفاته و یا واحدهای قندی می‌باشد، که معمولا به صورت واحدهای مونوسولفات، دی و تری سولفات گلیکوزیدی یافت می‌شوند (Bahrami *et al.*, 2014). ساپونین‌های استخراج شده از خیار دریایی دارای خواص زیستی بسیاری مانند؛ سیتوتوکسیک، ضد اگزما، ضد التهابی، آنتی اکسیدان، ضد باکتری و ... می‌باشد (Bordbar *et al*., 2011).

یکی دیگر از خواص زیستی متابولیت‌های ثانویه خیارهای دریایی اثرات ضدباکتریایی می‌باشد، آلودگی میکروبی در محصولات آرایشی و بهداشتی ممکن است موجب فساد آن‌ها شود و سلامت مصرف کنندگان را به ویژه در مناطق گرمسیری تهدید می‌کند، بنابراین استفاده از مواد نگهدارنده در محصولات آرایشی و بهداشتی به منظور کنترل میکروبی بسیار حائز اهمیت است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که متابولیت‌های ثانویه خیارهای

دریایی در کنترل میکروبی محصولات آرایشی و بهداشتی موثر است؛ گونه‌های *Stichopus hermanni*، *Holothuria fuscogilva, Actinopyga mauritiana, A. crassa, Bohadschia vitiensis, Bohadschia tenuissima, Pearonothuria graeffei, Bohadschia cousteaui, Holothuria atra, Holothuria leucospilota* و *Holothuria nobilis* دارای فعالیت ضد باکتری قوی هستند (Siahaan *et al*., 2017).

با توجه به خواص زیستی متابولیت‌های ثانویه خیارهای دریایی، به ویژه اثرات ضدباکتریایی آن‌ها و وجود ترکیبات ساپونینی موجود در آن‌ها، در این مقاله پژوهشی به بررسی امکان تولید صابون از پودر، عصاره متانولی و ساپونینی خیار دریایی *Holothuria leucospilota* پرداخته شده است.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. نمونه‌برداری و آماده سازی خیار دریایی

نمونه‌های خیار دریایی گونه *Holothuria leucospilota*، که در شکل ۱مشاهده می‌گردد، به تعداد ۴۰ عدد (با میانگین وزنی ۳۲۰ گرم) به وزن تقریبی ۱۴ کیلوگرم (کل نمونه‌های مورد آزمایش) در دی ماه سال ۱۳۹۶توسط غواصی و از عمق ۱۰ تا ۱۲ متر از جزیره لاوان، واقع در خلیج فارس با موقعیت جغرافیایی ۵۳,۲۷۱۹° شرقی و ۲۶,۸۹۹۰° شمالی تهیه شدند، سپس به صورت زنده و در آب دریا به ساحل منتقل شدند.

شکل ۱- نمونه خیار دریایی گونه*H.leucospilota* .

نمونه‌های خیار دریایی به آزمایشگاه زیست فناوری پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شده، در ابتدا به صورت طولی برش داده شد و اندام‌های داخلی و گنادها خارج و عضله بدن به اندازه‌های ۱سانتی‌متر قطعه قطعه شد، سپس نمونه‌ها (عضلات بدن و گناد) به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار گرفتند. نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب پودر (شکل ۲) و تا زمان ادامه مراحل آزمایشگاهی در فریز ۲۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

۲.۲. عصاره گیری از خیار دریایی

عصاره گیری با استفاده از روش خیساندن به شرح زیر انجام شد؛ به پودرهای تهیه شده به وزن ۳۰۰ گرم مقدار ۶۰۰ سی سی متانول (مرک- آلمان) افزده شده و این عمل هر ۲۴ ساعت یکبار به مدت سه بار تکرار 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 ۷۲ ساعت حلال حاوی متابولیت‌های ثانویه خیار دریایی از صافی عبور داده شد و عصاره‌های به دست آمده را به دستگاه روتاری (Heidolph, laborota 4000) وارد نموده، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۴۵ بار در دقیقه، تا حلال تبخیر شده و تنها عصاره متانولی خالص باقی ماند (شکل ۳).

پودر عضله خشک خیار دریایی به وزن ۵۰۰ گرم تهیه، سپس به منظور تهیه عصاره حاوی بیشترین مقدار ساپونین با استفاده از روش خیساندن و با ۱۰۰۰ سی سی

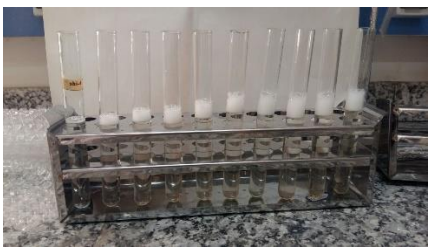
اتانول مـرک ۷۰ درصـد ماننـد روش فـوق انجـام گردیـد (Van Dyck *et al*., 2009; Hostettmann and Marston, Majinda, 2012:1995).

شکل ۲- خیار دریایی خشک شده با استفاده از دستگاه فریز درایر.

شکل۳- مراحل عصاره گیری خیار دریایی؛ خیساندن(الف)، صاف نمودن عصاره (ب)، عصاره متانولی (ج).

۳.۲. تعیین اندیس کف‌کنندگی ساپونین

به منظور بررسی حضور ساپونین در عصاره سـاپونینی خیاردریـایی یـک گـرم از نمونـه در ۱۰۰ میلـی‌لیتـر آب جوش حل شد و به مدت ۳۰ دقیقـه در حمـام آب‌جـوش حرارت داده‌شد. پس از سرد شدن، مخلوط حاصـل صـاف شد و درون لوله آزمایش (ارتفاع ۱۶ سانتی‌متـر، قطـر ۱۶ میلی‌متر) محلول‌هایی با رقت‌های یک تا ده میلی‌گـرم در میلی‌لیتر در سه تکرار تهیه شد. سپس نمونه‌ها بـه مـدت ۱۵ ثانیه در جهت طولی هم‌زده شد و سپس به مـدت ۱۵ دقیقه در حالت سکون قرار داده شـد و در نهایـت ارتفـاع کف حاصل اندازه‌گیری شد (شکل ۴). اگر کف مذکور نیم ساعت باقی بماند دارای ساپونین متوسط (++) و به همین صورت یک ساعت باقی بماند سـاپونین گونـه مـورد نظـر قوی (+++) خواهد بود (Tiwari *et al*., 2011).



شکل ۴- تعیین اندیس کف‌کنندگی ساپونین.

۴.۲. تولید صابون از خیار دریایی

گلیسیرین شفاف در تکه‌های ۱,۵ سانتی‌متری خرد شده، سپس در حمام آب داغ حرارت داده شدند تا گلیسرین‌ها در حرارت کم به صورت مایع در آید. در دمای ۴۰ تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد با نسبت‌های ۱، ۵ و ۱۰ درصد از عصاره ساپونین و متانولی و پودر خیار دریایی به صابون اضافه شد، سپس به قالب‌های تهیه شده منتقل شدند و به مدت ۷۲ ساعت تا سفت شدن صابون در آن باقی ماند. به منظور خوشبو شدن از عصاره گل سرخ و رنگ صابون از رنگ‌های خوراکی استفاده شد (شکل ۵).

شکل ۵- صابون خیار دریایی؛ الف) صابون حاوی عصاره ساپونین، (ب) صابون حاوی عصاره متانولی، (ج) صابون حاوی پودر خیار دریایی.

۵.۲. بررسی خواص ضدباکتریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش براث (Bacterial Broth Dilution Methods) به شرح زیر انجام گرفت:

سویه باکتری ۱۷۶۴ *Staphylococcus aureus* ATCC *aureus* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سپس کشت اولیه داده شد و به مدّت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی‌های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد باکتری‌ها کلونی‌های تک ایجاد شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت براث به مقدار ۱ سی سی وارد نموده، اشاره به این نکته لازم می‌باشد که تعداد باکتری‌های مورد آزمایش برابر $۱/۵*۱۰^{۶}$می‌باشد. سپس از عصاره‌ها ی ساپونینی، متانولی تهیه شده در غلظت‌های ۰/۰۱ تا ۴۰ میلی‌گرم در میلی لیتر که در محیط براث حل شده بود به مقدار ۱ میلی لیتر به لوله‌های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی سیلین، با غلظت‌های فوق استفاده شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال زیستی اضافه نگردید. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها را مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعّال زیستی بوده بسیار کدر شده بودند، زیرا باکتری‌ها در آن فرصت رشد را داشته‌اند. برای ادامه کار سایر لوله‌ها با لوله مذکور به صورت چشمی مقایسه شدند که میانگینی از ۳ مرتبه آزمایش برای هرگونه باکتری بود مقایسه کرده، و 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 MIC (Minimum Inhibitory Concentration) که به معنای ممانعت از رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها می‌باشد را نشان داده است. در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی عصاره‌ها و صابون‌ها 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 سپس پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت تعداد کلونی‌های تشکیل شده (CFU) مورد بررسی قرار گرفت. در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده بود حاکی از آن است که عصاره مورد نظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر

باکتری را دارد، امّا در پلیت‌هایی که هیچ گونه کلونی مشاهده نشد نشان دهنده آن است که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است؛ که این مقدار برابر با MBC (Minimum Bactericidal Concentration) می‌باشد (ROSENBLATT, 1991).

از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه به منظور تفاوت در میانگین ارتفاع صابون در زمان‌ها و حجم‌های متفاوت استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. استحصال عصاره‌ها و پودر خیار دریایی

از هر ۱۰ کیلوگرم وزن تر عضله خیار دریایی گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا ۹۸۰ گرم پودر خشک خیار دریایی به دست آمد. عصاره خشک متانولی تهیه شده از ۶۰۰ گرم پودر خشک خیار دریایی به وزن ۱۲۰/۵۱ گرم (۲۰/۰۸ درصد) و عصاره خشک ساپونینی به وزن ۵۳/۲ گرم (۸/۷۵ درصد) استحصال شد.

۲.۳. بررسی اثرات ضدباکتری عصاره‌های خیار دریایی

براساس مشاهده کدورت در خانه‌های پلیت مورد آزمایش، همان طور که از جدول ۱برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) عصاره متانولی خیار دریایی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر و عصاره ساپونینی آن برابر ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر است.

جدول ۱- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا.

عصاره	غلظت موثره (mg/ml)
متانولی	۱۰
ساپونینی	۲
آمپی سیلین	۰/۵
تتراسایکلین	۰/۵

همان طور که از جدول ۲ برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC) عصاره متانولی برای باکتری استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۴۰ میلی‌گرم در میلی لیتر، و عصاره ساپونینی آن برابر ۴ میلی‌گرم در میلی لیتر است.

جدول ۲- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا.

عصاره	غلظت موثره (mg/ml)
متانولی	۴۰
ساپونینی	۴
آمپی سیلین	۰/۵
تتراسایکلین	۰/۵

۳.۳. بررسی اثرات ضدباکتری صابون خیار دریایی

همان طور که از جدول ۳ برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد صابون حاوی عصاره متانولی خیار دریایی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر، صابون حاوی عصاره ساپونینی آن برابر ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر و صابون حاوی پودر خیار دریایی اثر ضدباکتری از خود نشان داده است.

جدول ۳- تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد صابون حاوی عصاره‌ها و پودر خیار دریایی. هولوتوریا لوکوسپیلاتا.

صابون	غلظت موثره ٪
متانولی	۵
ساپونینی	۵
پودر	-

همان طور که از جدول ۴برداشت می‌شود؛ حداقل غلظت کشندگی صابون حاوی عصاره متانولی خیار دریایی نسبت به باکتری استافیلوکوکوس آرئوس برابر ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر، صابون حاوی عصاره ساپونینی آن برابر ۵ میلی‌گرم در میلی لیتر است.

جدول ۴- تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره‌های استخراج شده از خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا.

صابون	غلظت موثره ٪
متانولی	۱۰
ساپونینی	۵
پودر	-

۴.۳. تعیین اندیس کف‌کنندگی ساپونین‌ها

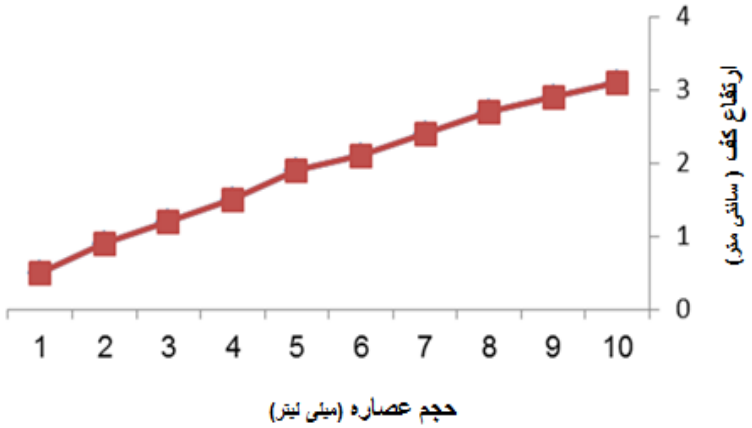
با مشاهده کف پایدار در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی ساپونین در عصاره ساپونینی گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا ثابت شد. با افزایش حجم عصاره، ارتفاع کف پایدار ایجاد شده در لوله‌ها نیز افزایش یافت به گونه‌ای که در بالاترین غلظت (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ارتفاع کف ایجاد شده به ۱/ ۳ سانتی‌متر رسید (نمودار ۱) که نشان دهنده شاخص کف کنندگی بسیار زیاد آن است.

تست آنالیز واریانس یکطرفه در زمان ۱۵ دقیقه نشان داد که در تمامی موارد به جزحجم‌های ۸ میلی‌لیتر و ۹ میلی‌لیتر و همچنین بین حجم‌های ۹ میلی‌لیتر و ۱۰ میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری در میانگین ارتفاع کف وجود دارد ($p<0.05$).

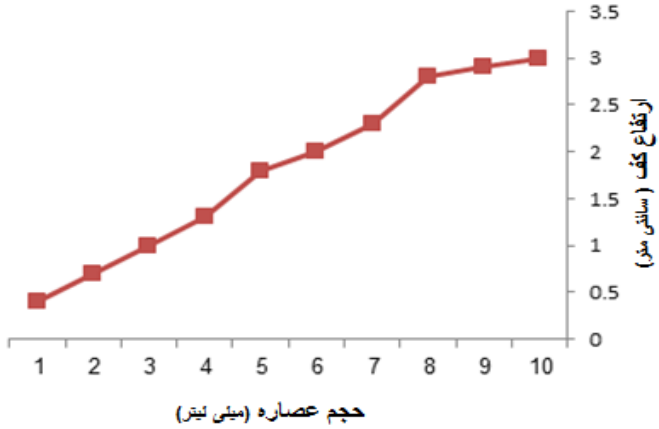
ارتفاع کف تشکیل‌شده بعد از گذشت این مدت زمان در بالاترین غلظت به ۳ سانتی‌متر رسید که نشان‌دهنده این است که ساپونین موجود در بافت عضله خیاردریایی گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا قوی (+++) و پایدار می‌باشد (نمودار ۲).

در مدت زمان ۶۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری در هیچ کدام از حجم‌های مورد استفاده مشاهده نشد ($p<0.05$). به علت پایداری کف پس از ۱۲ ساعت مجدد کف تشکیل شده در لوله‌ها بررسی شد. ارتفاع کف تشکیل‌شده بعد از گذشت این مدت زمان در بالاترین غلظت به ۲/۲ سانتی‌متر رسید که نشان‌دهنده این است که ساپونین موجود در بافت عضله خیاردریایی گونه هولوتوریا

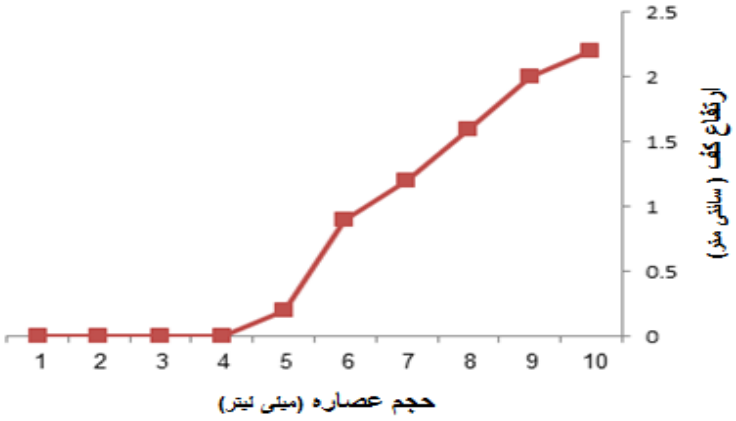
لوکوسپیلاتا بسیار پایدارتر از زمان در نظر گرفته شده می‌باشد (نمودار ۳).



نمودار ۱- ارتفاع کف ایجاد شده در مدت زمان ۱۵ دقیقه در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی.



نمودار ۲- ارتفاع کف ایجاد شده در مدت زمان ۶۰ دقیقه در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی.



نمودار ۳- ارتفاع کف ایجاد شده در مدت زمان ۱۲ ساعت در آزمون تعیین شاخص کف‌کنندگی.

همچنین آزمون آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف معنی‌داری بین میانگین ارتفاع کف بین حجم‌های ۵ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها، ۶ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها، ۷ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها، ۸ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها ۹ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها و همچنین ۱۰ میلی‌لیتر با تمام حجم‌ها را نشان داد.

۴. بحث و نتیجه گیری

ترکیبات طبیعی خیار دریایی دارای پتانسل زیادی در مواد آرایشی و بهداشتی مانند کرم، لوسیون، رژلب و ژل هستند. یکی از مهمترین خواص زیستی خیارهای دریایی اثرات ضدباکتری است که در تولید دارو و محصولات آرایشی و بهداشتی به عنوان نگهدارنده و ضد جوش و آکنه کاربرد دارد.

در این پروژه تحقیقاتی مشخص شد که عصاره متانولی خیار دریایی گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس عامل ایجاد جوش‌های صورت، از خود نشان می‌دهد. در آزمایش دیگر که توسط ناظمی و همکاران در سال (۱۳۹۵) انجام شد، فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های متانولی و آبی دیواره بدن خیاردریایی گونه *Holothuria leucospilota* روی باکتری *Staphylococcus aureus* با استفاده از روش رقت لوله‌ای به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج مطالعه نشان داد عصاره آبی روی باکتری مورد آزمایش اثر ضدباکتری از خود نشان نداد. عصاره‌متانولی مانع از رشد باکتری گرم‌مثبت استافیلوکوکوس آورئوس شد و در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منجر به مرگ این باکتری شد، نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از این پروژه کاملا مطابقت دارد. در مطالعه دیگری که روی خیار دریایی *Holothuria leucospilota* از سواحل خلیج فارس انجام شد، عصاره آبی- متانول در غلظت ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از رشد باکتری استافیلوکوکوس آورئوس ممانعت می‌کند (Adibpour *et al*., 2014). بررسی دیگری که روی اثرات ضد باکتری عصاره ان هگزانی خیار دریایی گونه *Stichopus herrmanni* جمع‌آوری شده از جزیره کاریمونجوا در اندونزی انجام شد، مشخص گردید که عصاره مورد بررسی در غلظت‌های ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر از رشد باکتری *Staphylococcus aureus* جلوگیری می‌کند (Delianis, 2013).

در این پروژه تحقیقاتی مشخص شد که عصاره ساپونینی خیار دریایی گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر اثر ضدباکتریایی روی باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس عامل ایجاد جوش‌های صورت، از خود نشان می‌دهد. بررسی خواص ضدباکتری فرکشن حاوی ساپونین از خیار دریایی گونه *Stichopus herrmanni* از کشور تایلند نشان می‌دهد که دارای اثرات ضدباکتری روی *Staphylococcus aureus* می‌باشد (Alldila, 2017).

ساپونین‌ها و ترکیبات ترپنوئیدی جداسازی شده از خیار دریایی *Holothuria scabra* فعالیت ضد باکتری علیه *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) را نشان می‌دهد. در مطالعه ایی که با استفاده از فرکشن حاوی ساپونین استخراج شده از دیواره عضلانی بدن خیار دریایی گونه *Stichopus hermanni* جمع آوری شده از جزیره لارک، خلیج فارس انجام شد، مشخص گردید که این فرکشن در غلظت‌های ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از رشد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس جلوگیر نموده اما اثر کشندگی روی این باکتری از خود نشان نمی‌دهد، اما فرکشن حاوی ساپونین‌های گلیکوزیدی-استروئیدی در غلظت ۵۰ میکروگرم در میل لیتر از رشد باکتری استافیلوکوکوس آرئوس ممانعت کرده و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر منجر به مرگ آن شده شده است (Salari *et al*., 2018).

از ۴۱۹۶ ترکیب طبیعی شناسایی شده از منابع دریایی، ۵۲۱ ترکیبات (۱۳ درصد از کل ترکیبات شناسایی شده) دارای خواص ضدباکتری هستند

(Hu *et al*., 2015). ترکیبات بسیاری مانند گلیکوزیدهای استروئیدی[1]، ترپنوئیدها، پپتیدها و ... از خیار دریایی با خواص ضدمیکروبی شناسایی شده است. در بررسی‌های انجام شده مشخص شده که خارپوستان در مقایسه با دیگر موجودات دریایی از جمله بریوزوا، نرمتنان، مرجان‌ها و کرم‌های حلقوی آنلیدا و غیره دارای بیشترین آثار ضدباکتریایی هستند ویکی از مهمترین دلیل آن وجود ترکیبات ساپونین است (Shakouri *et al*., 2009).

همان طور که نتایج این پروژه نیز نشان می‌دهد عصاره حاوی ساپونین‌های خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا در غلظت بسیار کمتری نسبت به عصاره متانولی اثر ضدباکتری نشان می‌دهد که با سایر مطالعات انجام شده مطابقت دارد.

تشکیل کف پایدار یکی از شاخص‌ترین خواص ساپونین‌ها است تا آنجا که از آن به عنوان آزمونی جهت تشخیص حضور ساپونین بهره می‌گیرند. باید توجه داشت که برخی از ساپونین‌ها در محلول آبی کف نمی‌کنند و به علاوه برخی از دیگر ترکیبات طبیعی نیز قادر به ایجاد کف هستند. مکانیسم تشکیل کف روشن نیست ولی می‌توان گفت که ویژگی آب دوستی چربی دوستی (دوگانه دوستی) ساپونین‌ها مسئول آن است (Hostettmann and Marston, 1995). در تحقیق حاضر با مشاهده کف پایدار در آزمون تعیین شاخص کف کنندگی وجود ساپونین در بخش عضلانی خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا ثابت شد. نتایج نشان داد با افزایش حجم عصاره، ارتفاع کف پایدار ایجاد شده در لوله‌ها نیز افزایش یافت. از آنجا که کف ایجاد شده چندین ساعت باقی مانده بود ساپونین گونه مورد نظر قوی می‌باشد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد میزان مصرف مواد لوازم آرایشی و بهداشتی در ایران بالاست. نزدیک ترین آماری که از سال ۲۰۱۵ وجود دارد، مربوط به سایت مجله «Beauty world middle East» است که دفتری در امارات متحده عربی دارد. این سایت می‌گوید ایران دومین رکورددار مصرف لوازم آرایشی و بهداشتی در خاورمیانه و هفتمین کشور رکورددار در این زمینه در سطح جهان است.

شکی نیست که ترکیبات ارایشی بر اساس مواد طبیعی حاصل از منابع طبیعی دریایی استدلال بازاریابی خوبی است، اگر چه این منابع هنوز به شدت مورد سوء استفاده قرار می‌گیرند. کاربردهای بالقوه مولکول‌های طبیعی حاصل از دنیای دریایی،آینده‌ای روشن برای صنعت لوازم ارایشی را به دنبال دارد که به طور مداوم به دنبال نوآوری است. بنابراین، طبف گسترده ای از محصولات طبیعی دریایی توجه بیشتری را به خود جلب کرده است. با توجه به وجود خیارهای دریایی در خلیج فارس و دریای عمان و نتایج بدست آمده در این تحقیق که با سایر مطالعات انجام شده نیز مطابقت دارد که نشان می‌دهد؛ که عصاره‌های خیار دریایی هولوتوریا لوکوسپیلاتا به ویژه عصاره حاوی ترکیبات ساپونینی روی باکتری عامل جوش‌های صورت؛ استافیلوکوکوس اورئوس بسیار موثر است و دلیل آن وجود دیواره حساس در این باکتری گرم مثبت نسبت به سایر سویه‌های باکتری گرم منفی است با احداث کارگاه صابون سازی به ویژه از منابع دریایی می‌توان گام موثری در اشتغالزایی به ویژه در مناطق ساحلی جنوب کشور برداشت. با توجه به خواص این گونه و امکان تکثیر آن می‌توان توجهی دیگر بر علت پرورش خیار دریایی با تأکید بر خواص گونه هولوتوریا لوکوسپیلاتا به صنعت تکثیر و پروش اعلام داشت و امید آن می‌رود به زودی تکثیر و پرورش این آبزی در آب‌های جنوبی کشور آغاز گردد و در کنار سایر مصارف آن در تولید محصولات آرایشی و بهداشتی نیز از آن استفاده شود.

[1] Steroidal glycosides

References

۵. منابع

Adibpour, N., Nasr, F., Nematpour, F., Shakouri, A., Ameri, A., 2014. Antibacterial and antifungal activity of *Holothuria leucospilota* isolated from Persian Gulf and Oman Sea. *Jundishapur Journal of Microbiology* 23(-), 45-53.

Alldila, R.R., 2017. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder, Uji Aktivitas Antioksidan, dan Uji Fenolik Total dariEkstrak Daun Benalu Jengkol (*Scurrula ferruginea* (Jack) Danser)(Doctoral dissertation, Universitas Andalas). *Microbiology* 7(1), e8708

Bahrami, Y., W. Zhang,, C. Franco., 2014b. Discovery of novel saponins from the viscera of the sea cucumber Holothuria lessoni. *Marine Drugs* 12 (5), 2633-2667.

Bligh. E. G., Dyer. W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37(-), 911-917.

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.

Delianis Pringgenies., 2013. Antibacterial Activity of Sea Cucumbers Harvested from Karimunjawa. Squalen *Bulletin of Marine & Fisheries Postharvest & Biotechnology* 8 (2), 87-94.

Hostettmann, K Marston, A., 1995. Chemistry and Pharmacology of Natural Products, Saponin. *CambridgeUniversityPress* 138(35), 8509-8509.

Kijjoa, A., P. Sawangwong., 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs* 2 (2),73-82.

Kim, S.-K.; Wijesakara, I. Cosmeceuticals from marine resources. In Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects. Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL, USA, 2012; pp. 1–9.

Kim, Se-Kwon. *Marine cosmeceuticals: trends and prospects*. CRC Press, 2016.

Majinda, Runner RT. "Extraction and isolation of saponins." Natural products isolation. Humana Press, 2012. 415-426.

Mary Bai, M., 1994. Systematics, biology, ecology And zoogeography of holothurians: Studies on regeneration in the holothurian *Holothuria* (metriatyla) scabra Jaeger. *CMFRI Bulletin* 46(-),44-50.

McCarthy, P., S. Pomponi., 2004. A search for new Pharmaceutical Drugs from marine organisms. *Marine Biomed. Res* 22(-), 1-2.

Munro, M. H., 1998. Marine bioprocess engineering: from ocean to industry Meeting. Nelson, F. P., and Rumsfield, J. (1988). Cosmetics: Content and function. *International Journal of Dermatology* 27(-), 665–672.

Nazemi, M., Tamadoni, J. S., Salari, Z., Gozari, M., 2017. Coparison of antibacterial activity in methanol extract of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) and sponge Niphates furcate from Hengam Island, Persian Gulf.

Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2004. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal Natural Products* 67(-),1216–1238.

Pomponi, S. A., 1999. Sponge as drugs. *Biotechnology* 70(-), 5–13.

ROSENBLATT, J. E., 1991. Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Paper read at Mayo Clinic Proceedings.

Salari, Z., Souinezad, I., Nazemi, M., Yousefzadi, M., 2018. Antibacterial activity of Saponin extracted from the sea cucumber (*Stichopus hermanni*) collected from the Persian Gulf. *ISFJ*, 27(1), 59-69.

Siahaan EA, Pangestuti R, Munandar H, Kim SK., 2017. Cosmeceuticals properties of sea cucumbers: Prospects and trends. 2017. *Cosmetics* 4(3), 26- 38.

Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., Kaur, H., 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia* 1(1), 98-106.

Van Dyck, Séverine, Pascal Gerbaux., Patrick Flammang., 2009. "Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass spectrometry." Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 2009. *Biochemistry and Molecular Biology* 152(-),124-134.