مجله علوم و فنون شیلات
نسخه ویژه خلیج فارس
دوره ۱۰ شماره ۲، بهار ۱۴۰۰، صفحات ۱۶۴ تا ۱۷۲

شناسایی و بررسی خواص ضدباکتری فرکشن حاوی ترکیبات استروئیدی از اسفنج *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 از جزیره لارک، خلیج فارس

مریم لوری[۱]، ایمان سوری نژاد[۱ و ۲*]، ملیکا ناظمی[۳]

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۲- گروه فناوری‌های نوین، پژوهشکده منطقه ای جنگل‌های حرا، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

چکیده

استروئیدها یکی از مهمترین و فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌های دریایی می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی خواص ضدباکتریایی فرکشن‌های استروئیدی استخراج شده از اسفنج دریایی خلیج فارس گونه *Axinella sinoxea* بود. ابتدا عصاره‌گیری با حلال استون انجام گرفته و سپس جداسازی فرکشن‌ها توسط ستون کروماتوگرافی با سیلیکاژل انجام شد. شناسایی استروئیدها در فرکشن‌های استخراج شده از ستون سیلیکاژل با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک و کروماتوگرافی گازی همراه با طیف سنجی جرمی صورت گرفت. سپس خواص ضدباکتریایی فرکشن‌های حاوی استروئید با استفاده از روش رقت لوله‌ای به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی بررسی شد. فرکشن‌های استروئیدی شناسایی شده از اسفنج *A. sinoxea* شامل Stigmasta-5،24(28)-dien-3-ol،(3β-24Z) و Ergosta-5،22-dien-3-ol،(3β,22E,24S) بودند. استروئیدهای استخراج شده از *A. sinoxea* نتایج متفاوتی را در مهار رشد و کشتن سویه‌های باکتری‌های گرم منفی *Escherichia coli*، *Klebsiella pneumonia*، *Vibrio harveyi* و باکتری‌های گرم مثبت *Micrococcus roseus* و *Staphylococcus aureus* در غلظت‌های مختلفِ مورد آزمایش نشان دادند. در جمع‌بندی نهایی، نتایج امیدوارکننده ای در مورد خواص ضدمیکروبی فرکشن‌های استروئیدی استخراج شده از اسفنج دریایی *A. sinoxea* جزیره لارک خلیج فارس حاصل شد که لزوم بررسی بیشتر برای سنتز مواد دارویی و آنتی بیوتیک از ترکیبات زیست فعال دریایی را آشکار می‌سازد.

کلید واژه‌ها: اسفنج، متابولیت‌های ثانویه، فعالیت ضدمیکروبی، خلیج فارس

نوع مقاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۶

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۰/۳/۱۰

***نویسنده مسول:**
Sourinejad@hormozgan.ac.ir

مقدمه

زیست‌فناوری دریا به عنوان یکی از شاخه‌های رو به رشد زیست‌فناوری، به معنای توسعه روش‌های نوین برای تولید محصولات جدید با بهره‌برداری از موجودات زیستی دریایی است. ترکیبات طبیعی استخراج شده از جانداران دریایی می‌توانند در زمینه‌های متنوعی مانند زیست پزشکی و بهداشت، غذا، انرژی و علوم زیست محیطی کاربرد داشته باشند [۱]. بی‌مهرگان دریایی ساده‌ترین سیستم دفاع مکانیکی را دارند و در نتیجه به منظور ادامه بقا از سیستم‌های حفاظت شیمیایی با تولید ترکیبات طبیعی استفاده می‌کنند. امروزه محققان علم زیست فناوری دریا و داروسازی از این ترکیبات به عنوان منبع منحصر به فرد و غنی به منظور بررسی تولید داروهای جدید استفاده می‌نمایند [۲]. اسفنج‌ها از شاخه پوریفرا هستند و قدمت حیات آنها در اقیانوس‌ها به ۵۸۰ میلیون سال می‌رسد و تاکنون بیش از ۱۵۰۰۰ گونه از آنها شناسایی شده است. فراوانی و تنوع این موجودات فیلترکننده بنتوزی اغلب در آب‌های شور به ویژه اعماق دریاها بیشتر است. با وجود اینکه اسفنج‌ها دائماً در معرض میکروب‌های موجود در آب شامل پاتوژن‌های فرصت طلب و میکروارگانیسم‌های رسوبات هستند ولی کمتر دچار عفونت‌های باکتریایی می‌شوند [۱].

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

متابولیت‌های ثانویه سلاح‌های شیمیایی می‌باشند که اسفنج‌ها و سایر جانوران دریایی برای بقا از آن استفاده می‌کنند. بررسی‌های انجام شده در رابطه با خصوصیات اکولوژی شیمیایی اسفنج ها نشان داده است که هرگونه اسفنج بر اساس شرایط محیطی، استراتژی خاصی در جهت تولید متابولیت‌های ثانویه دارد [۳ و ۴]. متابولیت های ثانویه استخراج شده از اسفنج ها بیشتر متعلق به ترکیبات شیمیایی با ساختار آلکالوئید، پپتید، ترپنوئید و استروئیدها می‌باشند که در میان این ترکیبات طبیعی شناسایی شده از اسفنج‌های دریایی، استروئیدها دارای تنوع و فراوانی بسیاری هستند [۵ و ۶]. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که خواص ضد تومور، سیتوتوکسیک، نوروتوکسیک، ضدباکتری، ضدویروس، ضد قارچ و ضدپروتوزوآ از بیشترین خواص بیولوژیک متابولیت های ثانویه اسفنج ها است [۷].

استروئیدهای مشتق شده از اسفنج‌های دریایی دارای تنوع ساختاری بیشتری نسبت به سایر جانداران بررسی شده هستند. از استروئیدهای موجود در اسفنج‌ها می‌توان به استروئیدهای چند اکسیژنی با هسته و زنجیره‌های جانبی معمولی، استروئیدهای با عوامل سولفیدی، استروئیدهای با زنجیره‌های جانبی غیر معمولی و هسته‌ی معمولی، استروئیدهای با هسته‌های اصلاح شده و دیگر استروئیدها اشاره نمود. این ترکیبات استروئیدی در اسفنج های با گونه‌های مختلف و با گونه های یکسان در زیستگاه‌های مختلف تغییرات قابل ملاحظه‌ای در ساختار و خواص بیولوژیک از خود نشان می‌دهند [۵]. یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زا، عوامل میکروبی هستند که از آنتی بیوتیک‌ها به منظور مهار آنها استفاده می‌شود در حالی که بعد از مدتی باکتری‌های پاتوژن نسبت به آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌شوند. بنابراین نیاز به جست‌وجوی داروهای جدید برای درمان عفونت های باکتری‌های فرصت‌طلب رو به افزایش می‌باشد. در میان موجودات دریایی، اسفنج‌ها به عنوان موجوداتی با ترکیبات مهم ضد میکروبی در نظر گرفته می‌شوند. طیف وسیعی از تغییرات در فعالیت ضد میکروبی گونه‌های مختلف اسفنج گزارش شده است که احتمالا منعکس کننده تفاوت در ترکیبات شیمیایی و متابولیت های موجود در گونه‌های مختلف است [۸ و ۹]. اسفنج *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 از رده Demospongiae، راسته Axinellida، خانواده Axinellidae و جنس Axinella می‌باشد. با توجه به اهمیت و جدید بودن انجام مطالعات در حوزه استخراج متابولیت های ثانویه از آبزیان دریایی کشور، هدف مطالعه حاضر استخراج و شناسایی استروئیدهای اسفنج *A. sinoxea* از آبهای خلیج فارس و بررسی اثرات ضدباکتریایی فرکشن حاوی ترکیبات استروئیدی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، آماده سازی و عصاره گیری از اسفنج

در ابتدا، نمونه های اسفنج دریایی خلیج فارس گونه *A. sinoxea* از عمق ۱۵ تا ۲۰ متری آب‌های اطراف جزیزه لارک واقع در استان هرمزگان از طریق غواصی جمع آوری شد و درون ظرف حاوی آب دریا به آزمایشگاه شیمی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل گردید. سپس نمونه های تهیه شده در اندازه ۱ سانتی متری خرد شده و پس از جداسازی همزیست های آن به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریزدرایر جهت خشک‌کردن و گرفتن رطوبت اضافی در دمای ۴۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت. بعد از آنکه نمونه‌ها خشک شدند، جهت افزایش سطح تماس ماده خشک با حلال‌های آلی برای به دست آوردن بیش‌ترین میزان عصاره جهت انجام آزمایش‌ها، نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب به صورت پودر درآورده شدند.

عصاره‌گیری با استفاده از حلال استون انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ گرم از نمونه‌های پودر شده به ارلن حاوی ۱۲۰۰ سی سی حلال استون منتقل گردید و به مدت ۷۲ ساعت در آزمایشگاه به دور از تابش نور خورشید در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به منظور جداسازی ترکیبات طبیعی قرار گرفت. پس از ۷۲ ساعت محلول به دست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شده تا ذرات معلق اسفنج دریایی از آن جدا شود و آنچه باقی ماند، حلال استون-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 دور ۱۴۵، حلال آن تبخیر و جدا گردد و تنها عصاره خالص باقی بماند [۷ و ۹].

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

جداسازی استروئید از اسفنج دریایی با ستون کروماتوگرافی

عصاره استونی تهیه شده از اسفنج دریایی به شرح ذیل برای جداسازی ترکیبات طبیعی با استفاده از ستون سیلیکاژل استفاده شد [۸]. ابتدا ۴/۳۲ گرم از عصاره استونی اسفنج تغلیظ‌شده روی ستون سیلیکاژل قرار گرفت و سپس به‌منظور جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده آن، ستون با حلال کاملاً غیرقطبی ان‌هگزان خالص شستشو داده شد. بعد قطبیت حلال شوینده با اتیل‌استات افزایش یافت و از سیستم حلالی ان‌هگزان– اتیل‌استات (۴۵:۵)، (۴۰:۱۰)، (۳۵:۱۵)،(۳۰:۲۰)، (۲۵:۲۵)، (۲۰:۳۰)، (۱۵:۳۵)، (۱۰:۴۰)، (۵:۴۵) و (۰:۵۰) استفاده شد و در نهایت به منظور جداسازی کامل ترکیبات، ستون با سیستم حلالی اتیل‌استات: متانول با نسبت (۴۵:۵)، (۴۰:۱۰)، (۳۵:۱۵)، (۳۰:۲۰)، (۲۵:۲۵)، (۲۰:۳۰)، (۱۵:۳۵)، (۱۰:۴۰)، (۵:۴۵) و (۰:۵۰) شستشو داده شد که در نهایت ۱۱۹ فرکشن جمع آوری گردید.

آشکارسازی حضور استروئیدها با کروماتوگرافی لایه نازک(TLC[1]) و شناسایی نوع استروئید با GC-MS

به منظور تشخیص حضور استروئید در فرکشن‌های استخراج‌شده حاصل از ستون‌گذاری، نمونه‌ها روی صفحات آلومینیومی (۲۰×۲۰ سانتی‌متر) پوشیده‌شده از یک لایه سیلیکاژل $60F_{254}$ (۱۰۵۵۵۴۰۰۰۱) به عنوان فاز ثابت با استفاده از پیپت قرار داده‌شدند و به منظور خشک شدن، چند دقیقه در معرض هوا قرار گرفتند. سپس صفحات درون تانک کروماتوگرافی که با کلروفرم: متانول: آب (۷:۱۳:۸) (به عنوان فاز متحرک) اشباع شده بود، قرار داده شدند. در نهایت صفحات به مدت ۱۵ دقیقه در آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا رنگ لکه‌ها در نور مرئی آشکار گردد. با مشاهده رنگ آبی–بنفش به وجود استروئید در فرکشن پی برده شد [۱۰]. فرکشن هایی که لکه های آن به رنگ آبی در آمدند برای شناسایی نوع استروئید به دستگاه GC-MS (مدل Agilent7000 Series Triple Quad GC/MS MainFrame؛ گاز کریر هلیوم ۹۹/۹۹ درصد، دتکتورC ۵۹۷۵، ستون: Part number 19091s-436، طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر، لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تزریق شدند.

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی استروئیدهای اسفنج دریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش براث (Bacterial Broth Dilution Methods) به شرح زیر انجام گرفت: سویه های باکتری *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Klebsiella pneumonia*، *Micrococcus roseus* و *Vibrio harveyi* از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس هر کدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدّت 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 براث وارد نموده، سپس از فرکشن حاوی ترکیب اسکوالین با غلظت‌های ۲– ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر که در محیط براث حل شده بود به لوله‌های فوق افزوده شد. برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین و آمپی سیلین استفاده شد و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها ماده فعّال بیولوژیک اضافه نگردید. در داخل یک لوله نیز تنها محیط کشت فاقد ماده موثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس سر تمام لوله‌ها با پنبه بسته شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها را مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور سنجش توانایی فرکشن‌های حاوی ترکیبات استروئیدی استخراج‌شده از اسفنج *A. sinoxea* در از بین بردن باکتری‌ها، از خانه پلیتی که کدورت در آن‌ها مشاهده نشده بود به مقدار ۰/۰۵ میلی‌لیتر بر روی پلیت‌های محیط کشت جامد (نوترینت آگار) کشت خطی داده شد. سپس پلیت‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از سپری شدن این مدت کلونی‌های تشکیل شده (CFU)[1] شمارش شد. در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده بود حاکی از آن است که عصاره و ماده‌مؤثره موردنظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر

[1] Colony Forming Unit

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

باکتری را دارد اما در پلیت‌هایی که هیچ‌گونه کلونی مشاهده نشد نشان‌دهنده آن است که عصاره و ماده‌مؤثره مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است که این مقدار برابر با حداقل غلظت کشندگی می‌باشد [۱۱].

نتایج

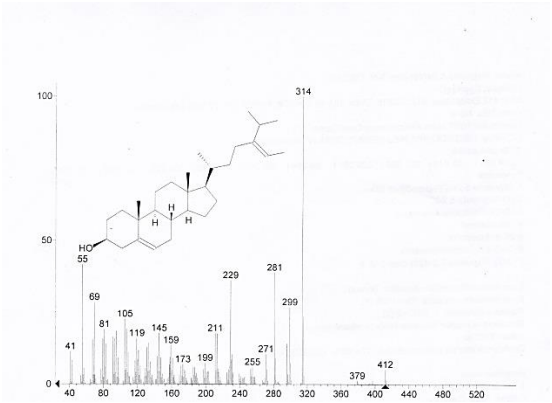
شناسایی فرکشن حاوی استروئید

کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) طیفی ازاستروئید را در فرکشن‌های مختلف با توجه به رنگ بنفش و آبی و Rf تقریباً یکسان نشان داد. مشخصات مربوط به کروماتوگرافی لایه‌نازک در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. مشخصات کروماتوگرافی لایه نازک فرکشن حاوی استروئیدهای استخراج شده از اسفنج دریایی؛ *E: اتیل‌استات، ان‌هگزان، M*: متانول

شماره فرکشن	فاز متحرک	Rf	رنگ	شماره فرکشن	فاز متحرک	Rf	رنگ
(۲)۱۷	N40:E10	۰/۹۵	آبی – بنفش تیره	(۲)۸۵	E35:M15	۰/۸۴	آبی
(۱)۱۸	N40:E10	۰/۹۵	آبی– بنفش تیره	۸۶	E35:M15	۰/۸۴	آبی
(۲)۱۸	N40:E10	۰/۹۵	آبی کمرنگ	۸۷	E35:M15	۰/۸۴	آبی

ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) با فرمول شیمیایی $C_{29}H_{48}O$ و وزن مولکولی ۴۱۲/۳۷۰ $g.mol^{-1}$ که به گروه استروئیدی متعلّق می‌باشد، به مقدار ۹۲٪ در فرکشن شماره ۱۸ (ان هگزان ۴۰: اتیل استات ۱۰) در دقیقه ۳۷ تا ۴۲ با GC-MS شناسایی شد (شکل ۱).

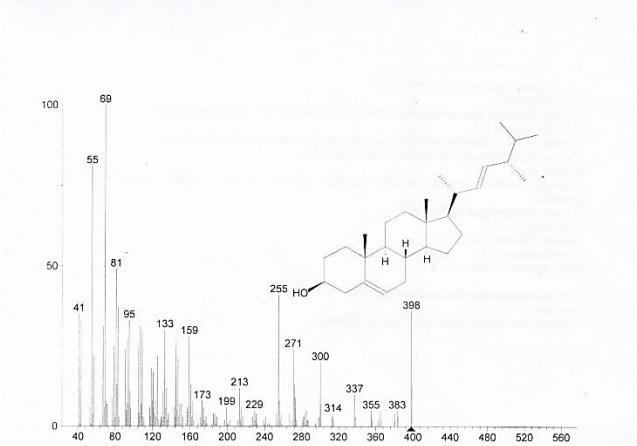


شکل ۱. کروماتوگرام و طیف کروماتوگرافی حاصل از فرکشن شماره ۱۸ (ان هگزان – اتیل استات ۱۰: ۴۰)، حاوی ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z)

ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) با فرمول شیمیایی $C_{28}H_{46}O$ و وزن مولکولی ۳۹۵/۳۵۵ $g.mol^{-1}$ که به گروه استروئیدها متعلّق می‌باشد، به مقدار ۹۲٪ در فرکشن شماره ۸۷ (اتیل استات ۳۵: متانول ۱۵) در دقیقه ۴۹ شناسایی شد (شکل ۲).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]



شکل ۲. کروماتوگرام و طیف کروماتوگرافی حاصل از فرکشن شماره ۸۷ (اتیل استات- متانول ۱۵: ۳۵)، حاوی ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S)

بررسی اثر ضدباکتریایی فرکشن حاوی ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z)

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد حداقل غلظت مهارکنندگی فرکشن حاوی ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) بر باکتری گرم‌منفی *V. harveyi* برابر با ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر باکتری گرم‌مثبت *M. roseus* برابر با ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بر باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* برابر با ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد و بر باکتری‌های *K. pneumoniae* و *E. coli* اثر مهارکنندگی مشاهده نشد.

جدول ۲. حداقل غلظت مهارکنندگی Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) اسفنج دریایی بر باکتری‌های مورد آزمایش، (-) نمونه‌های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده شد).

V. harveyi	*M. roseus*	*K. pneumonia*	*S. aureus*	*E. coli*	باکتری / غلظت Stigmasta ($ug.mL^{-1}$)
+	+	+	+	+	۱۰
+	+	+	+	+	۲۰
+	+	+	+	+	۱۰۰
+	+	+	_	+	۲۰۰
+	+	+	_	+	۵۰۰
_	+	+	_	+	۱۰۰۰
_	_	+	_	+	۲۰۰۰

با توجه به جدول ۳، فرکشن حاوی ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) تنها بر باکتری‌های گرم مثبت *M. roseus* و *S. aureus* به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی نشان داد و هیچ اثر کشندگی بر باکتری‌های گرم منفی *K. pneumoniae* و *V. harveyi* و *E. coli* در تمام غلظت‌های آزمایش شده نشان نداد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

جدول ۳. حداقل غلظت کشندگی Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) اسفنج دریایی بر باکتری‌های مورد آزمایش

سویه‌های باکتری	غلظت Stigmasta (ug.mL^{-1})	سویه‌های باکتری	غلظت Stigmasta (ug.mL^{-1})
E. coli	–	*M. roseus*	۲۰۰۰
S. aureus	۲۰۰	*V. harveyi*	–

بررسی اثر ضدباکتریایی فرکشن حاوی ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S)

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌گردد حداقل غلظت مهارکنندگی فرکشن حاوی ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) بر باکتری گرم‌منفی *V. harveyi* برابر با ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بر باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* و گرم منفی *K. pneumoniae* برابر با ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بر باکتری گرم‌مثبت *M. roseus* و گرم منفی *E. coli* برابر با ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد.

جدول ۴. حداقل غلظت مهارکنندگی Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) اسفنج دریایی بر باکتری‌های مورد آزمایش، ((–)نمونه-های فاقد کدورت، (+) نمونه‌هایی که در آن‌ها کدورت مشاهده شد)

غلظت Ergosta (ug.mL^{-1})	*E. coli*	*S. aureus*	*K. pneumonias*	*M. roseus*	*V. harveyi*
۱۰	+	+	+	+	+
۲۰	+	+	+	+	+
۱۰۰	+	+	+	+	+
۲۰۰	+	+	+	+	+
۵۰۰	+	_	_	+	+
۱۰۰۰	_	_	_	_	+
۲۰۰۰	_	_	_	_	_

با توجه به جدول ۵، فرکشن حاوی ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) بر باکتری گرم منفی *K. pneumoniae* و باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر باکتریوسیدی نشان داد و هیچ اثر کشندگی بر باکتری‌های *M. roseus* و *V. harveyi* و *E. coli* در تمام غلظت‌های آزمایش شده نشان نداد.

جدول ۵. حداقل غلظت کشندگی Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) اسفنج دریایی بر باکتری‌های مورد آزمایش

سویه‌های باکتری	غلظت Ergosta (ug.mL^{-1})	سویه‌های باکتری	غلظت Ergosta (ug.mL^{-1})
E. coli	–	*M. roseus*	–
S. aureus	۵۰۰	*V. harveyi*	–
K. pneumoniae	۱۰۰۰		

بحث

بسیاری از موجودات دریایی دارای مکانیسم تکاملی پیشرفته‌ای هستند که در شرایط نامناسب محیطی بتوانند در مقابل عوامل محدودکننده‌ای مثل دمای بالا، تغییرات شوری و فشار، غالب‌شدن تأثیرات جهش‌های ژنتیکی و وجود عوامل بیماری‌زا و باکتری‌ها با تولید ترکیبات طبیعی از خود دفاع

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

نمایند. بسیاری از این ترکیبات طبیعی دارای فعالیت‌های بیولوژیک خاص و مورد توجهی هستند. تولید داروها از منابع دریایی مبحثی است که بستر بسیار مناسبی را در علم داروسازی به جهت بهره‌برداری از آن‌ها فراهم آورده است. ترکیبات ثانویه تولیدشده از موجودات دریایی می‌توانند به عنوان منبع مواد زیست‌فعال عمل نموده و در مدل‌سازی ساختار داروها مورد استفاده قرار گیرند [۱۲].

در مطالعه حاضر ستون سیلیکاژل با حلال‌های مختلف بر اساس قطبیت از غیر قطبی، نیمه قطبی و قطبی شستشو گردید و ترکیبات موجود در عصاره اسفنج نیز بر اساس قطبیت از ستون خارج گردید. ۱۱۹ فرکشن حاصل از ستون جدا شد که در فرکشن‌های شماره ۱۸ و ۸۷ استروئید شناسایی شد. با توجه به اینکه فرکشن شماره ۱۸ با حلال ان‌هگزان ۴۰: اتیل‌استات ۱۰ جداسازی شد پس ترکیب با قطبیت‌کم در این فرکشن‌ها حضور دارد زیرا این سیستم حلالی قادر به جداسازی ترکیبات قطبی نیست. شناسایی این فرکشن‌ها با کروماتوگرافی لایه‌نازک منجر به یک لکه با رنگ آبی کمرنگ و R_f=۰/۹ شد. استروئیدها پس از استفاده از این شناساگر به رنگ آبی کمرنگ می‌شوند. همچنین این ترکیبات به علت قطبیت کم به طرف بالا حرکت کرده اند و R_f آن طبق مطالعات در محدودهR_f استروئیدی (۰/۴ تا ۰/۹) می‌باشد. همچنین در شناسایی فرکشن‌های ۸۷ با کروماتوگرافی لایه نازک لکه‌های آبی رنگ با R_F= ۰/۸۴ ظاهر شد که استروئیدی می‌باشند.

Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) یک ترکیب استروئیدی است که در مطالعه حاضر با استفاده از GC-MS از عصاره استونی *A. sinoxea* شناسایی گردید. در سال ۲۰۱۵، عصاره استونی اسفنج دریایی *Mycale angulosa* با استفاده از GC-MS مطالعه شد و ترکیب‌های Stigmasta شامل stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol به مقدار ٪۸۵ در دقیقه‌ی ۴۸/۵ و stigmasta-3,5-dien-7-one به مقدار ۹۳٪ در دقیقه‌ی ۵۰/۷ شناسایی گردید [۱۳]. ترکیب Ergosta-5,22-dien-3-ol,(3β,22E,24S) یک ترکیب استروئیدی دیگر است که در مطالعه حاضر با استفاده از GC-MS از عصاره استونی *A. sinoxea* شناسایی گردید. در سال ۲۰۱۶ عصاره استونی اسفنج دریایی *Xestospongia testudinaria* با استفاده از GC-MS مورد بررسی قرار گرفت و ترکیب ergosta-22,25-diene در فرکشن (اتر۷۰: اتیل استات ۳۰) شناسایی گردید [۱۴]. همچنین در سال ۲۰۱۷، ترکیب‌های ergosta-5,22-dien-3-ol, (3.beta.,2,2E,24S و ergosta-5,24(28)-dien-3.beta.-ol از اسفنج دریایی *Spheciospongia inconstancy* به ترتیب در دقیقه ۳۶/۸ و ۳۷/۷ با مطالعه GC-MS ظاهر شد [۱۵].

در مطالعه حاضر همچنین اثر ضدباکتریایی فرکشن‌های استروئیدی استخراج شده و شناسایی شده از اسفنج دریایی گونه *A. sinoxea* بر باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه در مورد اثر ضدباکتریایی در موجودات مختلف دریایی از جمله اسفنج دریایی در سالهای اخیر و توسط پژوهشگران مختلف انجام شده است [۸ و ۹ و ۱۱ و ۱۵]. با توجه به اینکه بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره اسفنج دریایی می‌باشد مزیت این تحقیق بررسی خواص ضد باکتریایی فرکشن حاوی ماده مؤثره استروئید از اسفنج دریایی مورد مطالعه بود. از آنجا که هدف از تحقیق، استفاده از خاصیت ضد میکروبی ماده مؤثره اسفنج دریایی در علم بیولوژیک، صنعت داروسازی و پزشکی در آینده می‌باشد غلظت‌های بکار گرفته از ۲۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تجاوز نکرده است.

با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه فرکشن‌های استروئیدی استخراج شده از *A. sinoxea* منجر به مهار رشد سویه‌های باکتری‌های گرم‌منفی *E. coli*، *K. pneumoniae* ، *V. harveyi* و باکتری‌های گرم‌مثبت *M. roseus* و *S. aureus* در غلظت‌های مختلف شدند. در این مطالعه باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* از حساس‌ترین باکتری‌ها نسبت به همه ترکیبات استروئیدی شناسایی شده بود. ترکیب Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) در کمترین غلظت نسبت به سایر استروئیدها منجر به مهار رشد باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* شد و در بالاترین غلظت منجر به مهار رشد باکتری گرم‌مثبت *M. roseus* گردید. باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* توسط همه ترکیبات استروئیدی کشته شد و فرکشن حاوی Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol,(3β-24Z) بهترین اثر کشندگی را بر باکتری *S. aureuss* نشان داد و در غلظت ۲۰۰ میلی گرم موجب مرگ باکتری گردید.

نتیجه‌گیری

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

در جمع‌بندی نهایی، بررسی انجام شده در مورد خواص ضدمیکروبی فرکشن‌های استروئیدی استخراج شده از اسفنج دریایی *A. sinoxea* جزیره لارک و سایر مطالعات انجام شده در رابطه با اسفنج های دریایی سایر مناطق دنیا نشان می‌دهد که فرکشن‌های استخراج‌شده دارای اثرات بالقوه ضد باکتریایی بوده و به عنوان یک ترکیب خالص‌سازی شده در غلظت پایین بر سویه‌های باکتری مورد آزمایش اثرگذار می‌باشند. باکتری گرم‌مثبت *S. aureus* نسبت به استروئیدها حساسیت بیشتری نشان داد. در مجموع استروئیدهای اسفنج دریایی می توانند کاندیداهای مناسبی برای سنتز آنتی بیوتیک از ترکیبات زیست فعال دریایی باشند.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: در مطالعه حاضر هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1. Duckworth A. Farming Sponges to Supply Bioactive Metabolites and Bath Sponges: A Review. Journal of Marine Biotechnology. 2009; 11: 669-679.

2. Gomes N.G, Dasari R, Chandra S, Kiss R, Kornienko A. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. Marine Drugs. 2016; 14: 98.

3. Muller W.E.G, Grebenjuk W.E, Lepennec G, Schroeder H, Brummer F, Hentschel I. Sustainabl production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: a review. Marine Biotechnology. 2004; 6: 105-117.

4. Thakur N.L, Thakur A.N, Muller W.E. Marine natural products in drug discovery. Natural Products Radiance. 2005; 4: 471-477.

5. Anuradha V, Byiu K, Emilda R, Aun G, Nair S.M, Chandramohanakumar N, Prashob Peter K.J, Gireesh Kumar T.J, Vasunchara G. In silico biological activity of steroids from the marine sponge *Axinella carteri*. Medicinal Chemistry Research. 2013; 22: 1142-1146.

6. Blunt J.W, Copp B.R, Munro M.H.J, Northeote P.T, Prinsep M.R. Marine natural products. Natural Product Reports. 2011: 28: 196-268.

7. Newman D.J, Cragg G.M. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. Journal of Natural Products. 2004; 67(8):1216-1238.

8. Khakshoor M.S, Pazooki J. Bactericidal and fungicidal activities of different crude extracts of Gelliodes carnosa (sponge, Persian Gulf). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2014; 13(3): 776-784.

9. Qaralleh H, Idid S, Saad S, Susanti D, Taher M, Khleifat, K. Antifungal and Antibacterial Activities of Four Malaysian Sponge Species (Petrosiidae). Journal Mycologie Medicale. 2010; 20(4): 315-320.

10. Wagner H, Bladt S, Zgainski E.M. Plant drug analysis (A Thin Layer Chromatography Atlas). Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH, 1984; 384p.

11. Galeano E, Martínez A. Antimicrobial activity of marine sponges from Urabá Gulf, Colombian Caribbean region. Journal of Medical Mycology. 2007; 17(1): 21-24.

13. Paula J.C.D, Desoti V.C, Sampiron E.G, Martins S.C, Ueda-Nakamura T, Ribeiro S.M, Bianco E.M, Silva S.D.O, Oliveira G.G, Nakamura C.V. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2015; 25:651-656.

14. He W.F, Xue D.Q, Yao L.G, Li J, Liu H.L, Guo U.V. A new bioactive steroidal ketone from the South China Sea sponge Xestospongia testudinaria. Journal of Asian Natural Products Research. 2016; 18(2): 195-199.

15. Masteria Y, Putra M.Y, Hadi T. Chemical Composition, Antimicrobial, cytotoxic and antiplasmodial activities of three sponges from Buton Islands, Indonesia. Indonesian Journal of Marine Sciences. 2017; 22(3):147-154.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]

Journal of Fisheries Science and Technology
Special issue on Persian Gulf ecosystem
Volume10, Issue 2, Spring 2021
Pages: 164- 172

Identification and investigation of antibacterial effects of steroidal fraction from the marine sponge *Axinella sinoxea* Alvarez & Hooper, 2009 in Larak island, the Persian Gulf

Maryam Loori[1], Iman Sourinejad[1,2*], Melika Nazemi[3]

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

A B S T R A C T

Steroids are one of the most important and abundant secondary metabolites of marine sponges. The aim of this study was to investigate the antibacterial properties of steroidal fractions derived from the Persian Gulf sponge *Axinella sinoxea.* Extraction was first done by Acetone and then the fractions were separated through column chromatography with silica gel. Identification of steroidal fractions were done by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC–MS). Then, antibacterial properties of steroids were identified and minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were investigated by tubular dilution. Two types of steroids including Stigmasta-5,24(28)-dien-3-ol, (3β-24Z) and Ergosta-5,22-dien-3-ol, (3β,22E,24S) were determined. The extracted steroids showed different results regarding the growth inhibition and bactericidal effect on Gram negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Vibrio harveyi*) and Gram positive (*Micrococcus roseus* and *Staphylococcus aureus*) bacteria at different experimental doses. In conclusion, promising results were found regarding the antimicrobial effects of the extracted steroids of the marine sponge from *A. sinoxea*. These findings reveal the necessity of more comprehensive investigations for the synthesis of pharmaceutical and antibiotic materials from the bioactive compounds.

KEYWORDS: Sponge, Secondary metabolites, Antimicrobial activity, Persian Gulf

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 30 December 2020
Accepted: 26 April 2021
ePublished: 31 May 2021

* Corresponding Author:
Email address: sourinejad@hormozgan.ac.ir
Tel: +987633711035
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1400.10.2.3.5]