



اثرات ضد میکروبی تعدادی از اسفنج‌های دریایی خلیج فارس

سید حسن سراج (PhD)^{۱*}، سیده ژاله هاشمی (PharmD)^۱، کامیار زمردیان (PhD)^۲،

محمودرضا معین (PhD)^۱

^۱ گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

^۲ گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۹/۴/۱۷)

چکیده

زمینه: در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی ۵ گونه اسفنج دریایی با نام‌های علمی: *Callyspongia clavatus*، *Fascaplysinopsis reticulata*، *Niphates furcata*، *Callyspongia siphonella* و *Pseudosuberites clavatus* جمع‌آوری شده از سواحل جزیره کیش بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و همچنین گونه‌های قارچ و مخمر مطالعه شده است.

مواد و روش‌ها: از هر اسفنج با دو نوع حلال دی کلرومتان و متانول به روش خیساندن در ۳ مرحله عصاره‌گیری شد و سپس عصاره‌ها با روش برات میکرودیلوژن مورد آزمایش قرار گرفتند.

یافته‌ها: میکروارگانسیم‌ها از نظر مقاومت نسبت به عصاره‌ها متفاوت بودند و قارچ‌ها نسبت به باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مقاوم‌تر بودند. استرپتوکوکوس پیوجنز و استرپتوکوکوس موتانز از سایر باکتری‌ها نسبت به عصاره‌ها حساس‌تر بودند. همه عصاره‌ها حداقل بر یک باکتری مؤثر بودند. اسفنج دریایی با نام *Fascaplysinopsis reticulata* فعالیت مؤثری بر همه باکتری‌های گرم مثبت حتی گونه‌های مقاوم نشان داد (MIC عصاره دی کلرومتانی و متانولی به ترتیب در محدوده ۰/۲۵ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۶ تا ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر).

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* دارای اثرات ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای می‌باشد و این اسفنج کاندیدای مناسبی در مطالعات آینده برای جداسازی ترکیبات مؤثر ضد باکتری است.

واژگان کلیدی: اثر ضد میکروبی، اسفنج دریایی، خلیج فارس، *Fascaplysinopsis reticulata*

* شیراز، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

مقدمه

اسفنج‌ها ابتدایی‌ترین حیوانات چندسلولی هستند. تاکنون هزاران ترکیب مختلف از گونه‌های متعدد اسفنج شناخته شده است (۱). اسفنج‌ها موجوداتی ساده با ساختارهای چسبنده به کف دریا هستند و در طی تکامل به سیستم‌های شیمیایی قوی برای دفاع در مقابل عوامل مهاجم و میکروارگانیسم‌ها مجهز شده‌اند. اغلب گونه‌های این بی‌مهرگان پر سلولی، در محیط‌های دریایی زندگی می‌کنند و تنها حدود یک درصد ساکن آب‌های شیرین هستند. در اسفنج‌ها آب دریا از طریق کانال‌هایی وارد می‌شود و پس از فیلتر شدن، مواد آلی و ارگانیسم‌های بجا مانده هضم می‌شوند (۲ و ۳). در چند دهه گذشته مواد طبیعی قابل توجهی از اسفنج‌ها جدا شده است که توسط خود اسفنج یا میکروارگانیسم‌های همزیست به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه ساخته می‌شوند. به‌طور خاص در سال‌های اخیر از اسفنج‌ها ترکیبات سایتوتوکسیک جالبی مانند هالوکندرین‌بی، بریوستاتین، دیسکودرمولاید به شکل ماده اصلی یا مشتقاتشان مراحل پیشرفته بالینی را برای ورود به بازار دارویی طی کرده‌اند یا در حال مطالعه بالینی هستند (۴).

از آنجایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در عفونت‌های مقاوم بیمارستانی، امروزه به یک معضل جهانی تبدیل شده است، رویکرد به منابع جدید مواد ضد میکروبی مورد توجه می‌باشد (۵ و ۶). اسفنج‌ها با توجه به دارا بودن تنوع زیاد متابولیت‌های ثانویه، پتانسیل مناسبی برای یافتن داروهای ضد میکروبی جدید دارند. غربالگری‌های مختلف نشان می‌دهد که اسفنج‌های دریایی فعالیت ضد میکروبی امیدوارکننده‌ای دارند (۷-۱۰). در خصوص خواص ضد میکروبی اسفنج‌های دریایی ایران مطالعات محدودی انجام شده است. در

مطالعه اثرات ضد میکروبی اسفنج‌های دریایی که به وسیله صفایان و همکاران روی ۵ نمونه اسفنج منطقه نی بند بوشهر انجام شده است، حدود ۸۰ درصد از عصاره‌ها اثرات ضدباکتری و ضدقارچ نشان داده‌اند (۱۱). در مطالعه دیگری توسط ناظمی و همکاران، متابولیت‌های ثانویه غیرقطبی - نیمه قطبی محلول در دی اتیل اتر از اسفنج دریایی *Dysidea pallescens* از سواحل جزیره هنگام، فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی و متابولیت‌های قطبی محلول در متانول فعالیت ضدقارچی قابل توجهی را نشان داده‌اند (۱۲). با توجه به بکر بودن منابع دریایی خلیج فارس و مطالعات محدود در زمینه اسفنج‌های ایران، بر آن شدیم که غربالگری اثرات ضد میکروبی تعدادی از اسفنج‌های سواحل جزیره کیش را انجام دهیم. در این مطالعه پنج اسفنج مختلف شامل *Fascaplysinopsis reticulata*, *Callyspongia clavatus* و *Callyspongia siphonella* و *Niphates furcata* جمع‌آوری گردید و عصاره‌های دی کلرومتانی و متانولی جهت ارزیابی میزان فعالیت ضدباکتریایی و ضدقارچی مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است که پیش از این فعالیت ضد میکروبی اسفنج‌های انتخاب شده در این مطالعه از سواحل کیش مورد بررسی قرار نگرفته بود.

مواد و روش‌ها

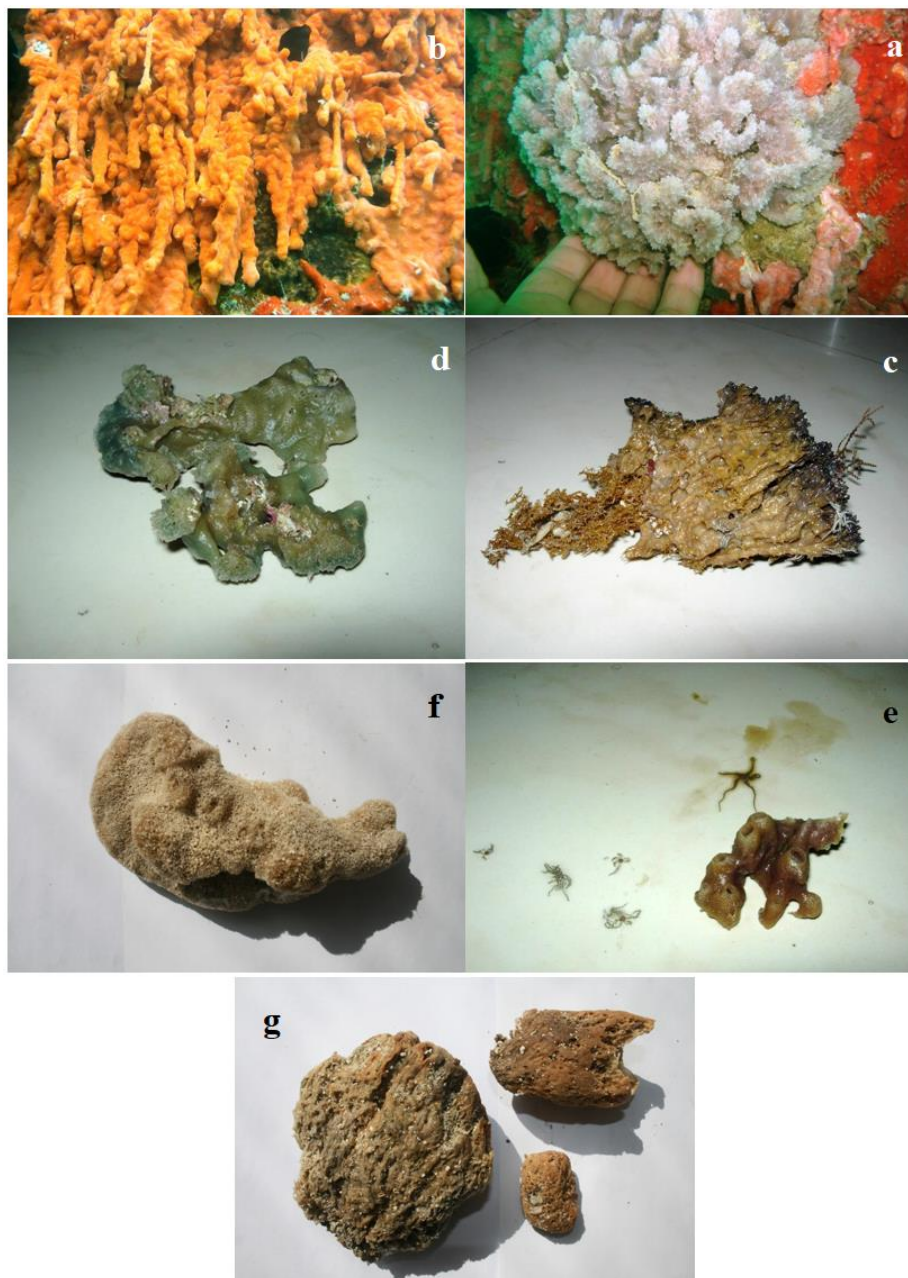
مطالعه حاضر، یک مطالعه تجربی می‌باشد که به شرح زیر انجام شد.

جمع‌آوری اسفنج‌ها و شناسایی گونه‌ها

۵ گونه اسفنج بین سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۲ از سواحل کیش در خلیج فارس جمع‌آوری شد (شکل ۱). پس از شست و شو با آب، اسفنج‌ها در درجه حرارت منفی

الکل نگهداری شد و سپس نمونه‌ها از محلول الکل خارج گردیدند و به مؤسسه ملی مطالعات آب و هوا در کشور نیوزلند فرستاده شدند (۱۳).

۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. نمونه کوچکی از اسفنج‌ها جدا شد و برای فرآیند شناسایی ابتدا به مدت ۳ روز در یخچال در محلول ۷۰ درصد



شکل ۱) a و b: عکس زیر آب دو گونه اسفنج در سواحل جزیره گیش. c: اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* در محیط آزمایشگاه. d: اسفنج *Niphates furcata* در محیط آزمایشگاه. e: اسفنج *Callyspongia siphonella* در محیط آزمایشگاه. f: اسفنج *Callyspongia clavatus* در محیط آزمایشگاه. g: اسفنج *Pseudosuberites clavatus* در محیط آزمایشگاه.

عصاره گیری

جهت عصاره گیری، ابتدا اسفنج‌ها به وسیله دستگاه فریز درایر به طور کامل طی ۳ روز خشک شده، سپس آسیاب شدند. عصاره گیری به روش خیساندن در ۳ مرحله هر مرحله به مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک انجام شد. ابتدا پودر اسفنج با حلال دی کلرومتان به عنوان حلال غیرقطبی عصاره گیری شد و سپس باقیمانده اسفنج از مرحله قبل با متانول به عنوان حلال قطبی عصاره گیری گردید. به ازای هر ۵ گرم پودر آماده شده، ۲۰ میلی لیتر حلال استفاده شد. عصاره های آماده شده در هر مرحله، به مراحل قبل اضافه گردید. همه عصاره ها به وسیله دستگاه روتاری و اسپید و کیوم در درجه حرارت ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی گراد و سرعت مناسب خشک شدند. عصاره خشک حاصل برای اثرات ضد میکروبی استفاده گردید.

بررسی اثرات ضد میکروبی

روش براث (مایع) میکرو دیلوشن برای اندازه گیری حداقل غلظت مهارکنندگی رشد میکروب‌ها انجام شد. در این روش عصاره‌ها در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴ و ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر رقیق شدند و در مقابل سوسپانسیون‌های میکروبی ثابت (از لحاظ غلظت) آزمایش گردیدند (۱۴).

فعالیت ضد میکروبی عصاره‌ها علیه باکتری‌های گرم مثبت شامل باکتری استافیلوکوکوس ارئوس و همچنین ۳ نمونه بیمارستانی از استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متیسیلین (MRSA1، MRSA2 و MRSA3)، استرپتوکوکوس پیوجنز، انتروکوکوس فاکالیس، باسیلوس سرئوس، استرپتوکوکوس موتانز و ۳ نمونه بیمارستانی مقاوم به آنتی بیوتیک انتروکوکوس

(Enterococcus R1، Enterococcus R2 و

Enterococcus R3) آزمایش شد.

باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه شامل اشیشیا کلی، سالمونلا پاراتیفی آ، کلبسیلا نومونیا، و سودوموناس اثرورینوزا بود. قارچ‌های مخمری نیز کاندیدا البیکانس و کاندیدا دوبلینسیس، و قارچ‌های رشته‌ای شامل اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس فومیگاتوس بودند. برای بررسی اثرات ضد مخمری از محیط کشت آر پی ام ای ۱۶۴۰ که به وسیله بافر مایس تهیه شده بود استفاده گردید.

برای تهیه سوسپانسیون قارچ‌ها، از محیط کشت سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌های مخمری کاندیدا البیکانس و کاندیدا دوبلینسیس و از محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار برای قارچ‌های رشته‌ای اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس فومیگاتوس استفاده شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه برای ۱ تا ۲ هفته انکوبه شدند. مقداری از کونیدای تولید شده از قارچ رشته‌ای به وسیله یک تیوب که با توپین ۲۰ خیس شده بود برداشته شد و به ۳ میلی لیتر نرمال سالین اضافه گردید و سپس به وسیله دستگاه کدورت سنج در طول موج ۵۳۰ نانومتر، غلظت آن برابر میزان جذب نوری ۰/۱۱-۰/۰۹ برای قارچ‌های گونه اسپرژیلوس، تنظیم شد. سوسپانسیون قارچی حاصل، در محیط آر پی ام ای به نسبت یک به پنجاه رقیق گردید. مخمرها نیز در طول موج ۵۳۰ نانومتر و جذب نوری ۰/۱۵ به نسبت ۱ در ۱۰۰۰ در محیط آر پی ام ای رقیق گردیدند. برای تعیین فعالیت ضدباکتری عصاره از محیط مولر هیتون و با سری رقت از ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴ و ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از رشد باکتری، سوسپانسیون باکتریایی با کدورت نیم

هیئتون برای باکتری‌ها استفاده شد. پایین‌ترین غلظتی که کمتر از ۴ کلنی رشد کرده باشد، ۹۸ درصد کشندگی قلمداد می‌شود و به‌عنوان "حداقل غلظت کشندگی یا (MBC)" تعیین گردید (۱۴).

یافته‌ها

نتایج شناسایی گونه‌های اسفنج این مطالعه که توسط مؤسسه ملی مطالعات آب و هوا در کشور نیوزلند انجام شده، در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود اسفنج‌ها از ۵ خانواده مختلف بودند.

مکفرلند در سرم نرمال سالین تهیه شده و به نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط مولر-هیئتون رقیق گردید. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های آماده شده به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت‌های حاوی قارچ در دمای ۳۰ درجه به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.

همچنین در هر پلیت ۹۶ خانه، چاهک کنترل منفی (محلول بلانک حاوی محیط کشت) و جهت کنترل مثبت چاهک کنترل رشد میکروب فاقد عصاره در نظر گرفته شد. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی از کشت چاهک‌هایی که رشدی نشان نداده‌اند روی محیط سابورد دکستروز آگار برای قارچ‌ها و مولر-

جدول ۱) نتایج شناسایی گونه اسفنج‌ها

Reference number	Name	Family	Order	Class	Sample sponge
NIWAKD 6666	<i>Fascaplysinopsis reticulata</i>	Thoretidae	Dictyoceratida	Demmospongiae	A
NIWAKD 6667	<i>Niphates furcata</i>	Niphatidea	Haplosclerida	Demmospongiae	B
NIWAKD 6669	<i>Callyspongia siphonella</i>	Callyspongiidea	Haplosclerida	Demmospongiae	C
NIWAKD 6674	<i>Callyspongia clavatus</i>	Callyspongiidea	Haplosclerida	Demmospongiae	D
NIWAKD 6676	<i>Pseudosuberites clavatus</i>	Suberitidae	Hadromerida	Demmospongiae	E

کشندگی (MBC) ۱-۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر روی همه باکتری‌های گرم مثبت حتی گونه مقاوم مورد مطالعه مؤثر واقع شد (جدول ۲) که نشان دهنده فعالیت ضد باکتریایی مناسب ترکیبات غیرقطبی موجود در این اسفنج است. همچنین عصاره متانولی اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* نیز به شکل ضعیف‌تری بر روی همه باکتری‌های گرم مثبت حتی گونه‌های مقاوم مؤثر واقع شد (جدول ۳).

تست حساسیت که به‌وسیله روش برات میکرودیولوشن صورت گرفت نتایج جالبی را نشان داد (جدول ۲). از بین اسفنج‌ها، اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* (که در جدول‌ها با عنوان Sponge A معرفی شده است) اثرات بسیار مناسب ضد میکروبی داشت. عصاره دی کلرومتانی این اسفنج با حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در بازه ۵-۸/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و حداقل غلظت

جدول ۲) حداقل غلظت کشنده و مهارکننده عصاره دی کلرومتانی اسفنج‌های دریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

Sponge A		Sponge B		Sponge C		Sponge D		Sponge E			
MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)		
۸	۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>S.aureus</i>
۰/۵	۱	۶۴	۵۱۲	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۳۲	۳۲	۳۲	<i>S.pyogenes</i>
۰/۵	۱۲۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E.fecalis</i>
۰/۲۵	۰/۵	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۵۶	۱۰۲۴	۲۵۶	۱۰۲۴	۱۰۲۴	<i>B.creus</i>
۰/۲۵	۰/۵	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	<i>S.mutans</i>
۰/۵	۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 1
۰/۵	۱	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 2
۰/۵	۱	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 3
۰/۵	۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R1
۰/۵	۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R2
۰/۵	۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R3
۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E.coli</i>
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E.coli</i> o157
۲	۴	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>S.paroathyphiA</i>
۲	۴	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>P.aeruginosa</i>
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>K.pneumonia</i>

^a استافیلوکوکوس ارتوس مقاوم به متیسیلین. ^b سوش جداشده از نمونه‌های بالینی

جدول ۳) حداقل غلظت کشنده و مهارکننده عصاره متانولی اسفنج‌های دریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت

Sponge A		Sponge B		Sponge C		Sponge D		Sponge E			
MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)		
۳۲	۵۱۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>S. aureus</i>
۱۶	۶۴	۶۴	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>S. pyogenes</i>
۱۶	۶۴	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E. fecalis</i>
۱۶	۱۶	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>B. creus</i>
۳۲	۱۲۸	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۵۱۲	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	۲۵۶	<i>S. mutans</i>
۳۲	۳۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 1
۳۲	۳۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 2
۳۲	۳۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	MRSA ^a 3
۳۲	۳۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R1
۳۲	۳۲	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R2
۳۲	۳۲	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>Enterococcus</i> ^b R3
۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸<	۲۰۴۸<	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E.coli</i>
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>E.colio</i> 157
۴	۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>S.paroathyphiA</i>
۱۲۸	۱۲۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	<i>P.aeruginosa</i>
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>K.pneumonia</i>

^a استافیلوکوکوس ارتوس مقاوم به متیسیلین. ^b سوش جدا شده از نمونه‌های بالینی

در خصوص اثر روی باکتری های گرم منفی، عصاره دی کلرومتانی اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* بسیار مناسبی روی *Salmonella paratyphi A* و *Pseudomonas aeruginosa* نشان داد (با حداقل غلظت مهار کننده و کشنده برای سودوموناس آئروژینوزا ۲ و ۴ و برای سالمونلا پاراتیفی A نیز ۲ و ۴ میکروگرم بر میلی لیتر). همچنین عصاره متانولی این اسفنج به صورت ضعیف تری بر دو گونه باکتری گرم منفی مذکور اثربخش بود. عصاره های این اسفنج روی بقیه باکتری های گرم منفی مطالعه شده اثر مطلوبی نداشت. از سوی دیگر، سایر اسفنج ها روی باکتری های گرم منفی بی اثر بودند (با حداقل غلظت مؤثر بالاتر از ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر، جدول ۲ و جدول ۳).

مطابق جدول ۴ عصاره های اسفنج ها روی گونه های مختلف مطالعه شده قارچ (مخمر و قارچ رشته ای) فعالیت ضعیفی داشتند یا کاملاً بی اثر بودند (فعالیت ضعیف با حداقل غلظت مؤثر بین ۱۰۲۴ تا ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره و بی اثر بودن به صورت غلظت مؤثر بالاتر از ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره در نظر گرفته شده است).

عصاره دی کلرومتانی دو اسفنج *Niphates furcata* و *Callyspongia siphonella* (که در جدول ها به ترتیب با عنوان Sponge B و Sponge C معرفی شده اند) روی باکتری های *Streptococcus pyogenes* و *Streptococcus mutans* اثرات متوسطی را نشان دادند (حداقل غلظت مهار کننده و کشنده عصاره دی کلرومتانی اسفنج B بر علیه استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب عبارتند از: ۶۴ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر و بر علیه استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۵۱۲ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر است و همچنین حداقل غلظت مهار کننده و کشنده اسفنج C بر علیه استرپتوکوکوس پیوژنز به ترتیب عبارتند از ۱۲۸ و ۱۲۸ و بر علیه استرپتوکوکوس موتانس به ترتیب ۵۱۲ و ۵۱۲ میکروگرم بر میلی لیتر است). همچنین دو اسفنج *Psudosuberites* و *Callyspongia clavatus* (که در جدول ها به ترتیب با عنوان Sponge D و Sponge E معرفی شده اند) نیز روی باکتری های *Streptococcus pyogenes* و *Bacillus cereus* و *Streptococcus mutans* فعالیت متوسط نشان دادند. همچنین عصاره های متانولی این اسفنج ها بر علیه باکتری گرم مثبت با و حداقل غلظت کشندگی بیشتر، فعالیت ضعیف تری نشان دادند.

جدول ۴) حداقل غلظت کشنده و مهار کننده عصاره دی کلرومتانی و متانولی اسفنج های دریایی در برابر قارچ ها

Sponge A		Sponge B		Sponge C		Sponge D		Sponge E			
MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MFC (µg/ml)		
عصاره دی کلرومتانی											
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>C.albicans</i>	Yeast
>۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۱۰۲۴	۱۰۲۴	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۱۰۲۴	۱۰۲۴	<i>C.dubliniensis</i>	
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>A.flavus</i>	Mold
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>A.fumigatus</i>	
عصاره متانولی											
۱۰۲۴	۱۰۲۴	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	<i>C.albicans</i>	Yeast
۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	۲۰۴۸	>۲۰۴۸	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۱۰۲۴	<i>C.dubliniensis</i>	
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>A.flavus</i>	Mold
>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	>۲۰۴۸	<i>A.fumigatus</i>	

بحث

در این مطالعه مؤثرترین اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* از راسته Dictyoceratida بود که روی همه باکتری‌های گرم مثبت مطالعه شده و ۴۰ درصد باکتری‌های گرم منفی مورد مطالعه مؤثر بود و همچنین اثر مناسبی روی باکتری‌های مقاوم بالینی (استافیلوکوکوس ارئوس مقاوم به متیسیلین و انتروکوکوس مقاوم به آنتی‌بیوتیک) جدا شده داشت. در خصوص این اسفنج، عصاره دی کلرومتانی که به‌طور تئوری و با توجه به ماهیت شیمیایی حلال احتمالاً حاوی ترکیبات غیرقطبی تری نسبت به متانول می‌باشد، مؤثرتر نشان داده شد. در یک مطالعه انجام شده توسط رول (Roll) و همکاران، روی یک گونه *Fascaplysinopsis* شناسایی شده در غرب اقیانوس هند، انجام شد که اثرات ضد میکروبی قوی را آشکار کرد (۱۵). مطالعات پیشین اثرات مختلف بیولوژیک اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* را به اثبات رسانده‌اند (۸ و ۱۶). در مطالعه دیگری توسط کمپس (Campos)، عصاره دی کلرومتان- متانولی از اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* از اقیانوس هند جمع‌آوری و ترکیبات مؤثره آن شناسایی شد. برخی ترکیبات این مطالعه اثر مهارکنندگی خوبی در برابر باکتری گرم منفی *Vibrio natrigens* و *Vibrio carchariae* نشان دادند (مقدار MIC محدوده ۰/۰۱ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) (۱۷). در مطالعه شین (Qin)، ترکیبات دی‌ترپن، ترپن، دی‌کتو پیرازین و استرولی از اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* از جزیره Xisha (چین) جداسازی و تعیین ساختار شدند. با توجه به نتایج، تعدادی از ترکیبات اثر سیتوتوکسیک

قابل توجهی بر روی رده سلولی سرطانی HL-60 نشان دادند (مقدار IC_{50} در محدوده ۸/۸ تا ۱۲/۴ میکرومولار) (۱۸).

همچنین گزارش شده است که از جنس *Fascaplysinopsis* تنها گونه اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* حاوی ترکیبات آلکالوئیدهای بیس ایندولی می‌باشد (۱۹). با توجه به نتایج این مطالعه ممکن است به جز ترکیبات ترپنی، فعالیت ضدباکتریایی اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* به واسطه حضور ترکیبات آلکالوئیدی کم قطبی باشد. در راستای نتایج، مطالعات پیشین نیز ارتباط فعالیت ضدباکتریایی با میزان حضور ترکیبات مختلف غیرقطبی در عصاره‌های اسفنج‌های دریایی را نشان می‌دهد (۲۰ و ۲۱).

نتیجه‌گیری

مطالعات پیشین بیانگر پتانسیل اسفنج‌های خلیج فارس به‌عنوان منابع ضد میکروبی می‌باشند. با توجه به نتایج این مطالعه اسفنج *Fascaplysinopsis reticulata* جمع‌آوری شده از سواحل جزیره کیش به‌عنوان کاندیدای مناسب مطالعات آینده برای جداسازی ترکیبات مؤثر ضدباکتریایی معرفی می‌گردد. سایر اسفنج‌های مورد مطالعه در پژوهش حاضر، اثرات متوسط تا بی اثر بر روی باکتری‌ها داشتند و کاندیدای مناسبی برای مطالعات پیشرفته‌تر محسوب نمی‌گردند. همچنین برای مشخص نمودن نوع ترکیبات مؤثره و تعیین ساختار مولکولی آن‌ها نیاز به آنالیز عصاره‌ها با روش‌های پیشرفته دستگاهی و کروماتوگرافی می‌باشد. اسفنج‌های مورد مطالعه در برابر قارچ‌ها اثر قابل توجهی نداشتند.

سپاس و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز به دلیل حمایت مالی از این طرح سپاسگزاری می‌گردد. نویسندگان مراتب تشکر خود را از دکتر میشل کلی از مؤسسه ملی مطالعات آب و هوا در کشور نیوزلند بدلیل شناسایی علمی اسفنج‌ها اعلام می‌دارند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. Tadesse M, Gulliksen B, Strom MB, et al. Screening For Antibacterial And Antifungal Activities In Marine Benthic Invertebrates From Northern Norway. *J Invertebr Pathol* 2008; 99(3): 286-93.
2. Lee YK, Lee JH, Lee HK. Microbial Symbiosis In Marine Sponges. *J Microbiol* 2000; 39(4): 254-64.
3. Belarbi EH, Contreras Gomez A, Chisti Y, et al. Producing Drugs From Marine Sponges. *Biotechnol Adv* 2003; 21(7): 585-98.
4. Thakur NL, Müller WEG. Biotechnological Potential Of Marine Sponges. *Curr Sci* 2004; 86(11): 1506-12.
5. Archibald LK, Manning ML, Bell LM, et al. Patient Density, Nurse-To-Patient Ratio And Nosocomial Infection Risk In A Pediatric Cardiac Intensive Care Unit. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16(11): 1045-8.
6. NNIS System, Gerberding J, Gaynes R, et al. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary From January 1990-May 1999. A Report From The NNIS System. *Am J Infect Control* 1999; 27(6): 520-32.
7. Laport MS, Santos OC, Muricy G. Marine Sponges: Potential Sources Of New Antimicrobial Drugs. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10(1): 86-105.
8. Nyan LK, Abas F, Maulidiani M, et al. Chemical Constituents And Biological Activities Of South East Asia Marine Sponges: A Review. *Pertanika J Sci Technol* 2019; 27(2): 953-83.
9. Mayer AMS, Guerrero AJ, Rodríguez AD, et al. Marine Pharmacology In 2014–2015: Marine Compounds With Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, Antiviral, And Anthelmintic Activities; Affecting The Immune And Nervous Systems, And Other Miscellaneous Mechanisms Of Action. *Mar Drugs* 2019; 18(1): 5.
10. Mohebbi GH, Nabipour I, Vazirizadeh A. The Sea, the Future Pharmacy. *Iran South Med J* 2014; 17(4): 748-88. (Persian)
11. Safaeian S, Hosseini H, Abbas Pour Asadolah A, et al. Antimicrobial Activity Of Marine Sponge Extracts Of Offshore Zone From Nay Band Bay, Iran. *J Mycol Med* 2009; 19(1): 11-6.
12. Nazemi M, Moradi Y, Rezvani Gilkolai F, et al. Antimicrobial Activities Of Semi Polar-Nonpolar And Polar Secondary Metabolites Of Sponge *Dysidea Pallescens* From Hengam Island, Persian Gulf. *Iran J Fish Sci* 2017; 16(1): 200-9.
13. Seradj H, Moein M, Eskandari M, et al. Antioxidant Activity Of Six Marine Sponges Collected From The Persian Gulf. *Iran J Pharm Sci* 2012; 8(4): 249-55.
14. Zaini F, Mahbod MSA, Emami M. *Comprehensive Medical Mycology*. 2nd ed. Tehran: Tehran University Medical Sciences Press, 2004. (Persian)

15. Roll DM, Ireland CM, Lu HSM, et al. An Unusual Antimicrobial Pigment From The Marine Sponge *Fascaplysinopsis* Sp. *J Org Chem* 1988; 53(14): 3276-8.
16. Bibi F, Faheem M, Azhar E, et al. Bacteria From Marine Sponges: A Source Of New Drugs. *Curr Drug Metab* 2017; 18(11): 11-5.
17. Campos PE, Pichon E, Moriou C, et al. New Antimalarial And Antimicrobial Tryptamine Derivatives From The Marine Sponge *Fascaplysinopsis Reticulata*. *Mar Drugs* 2019; 17(3): 167.
18. Qin GF, Tang XL, De Voogd NJ, et al. Cytotoxic Components From The Xisha Sponge *Fascaplysinopsis Reticulata*. *Nat Prod Res* 2020; 34(6): 790-6.
19. Wang Q, Tang X, Luo X, et al. (+)- And (-)- Spiroreticulatine, A Pair Of Unusual Spiro Bisheterocyclic Quinoline-Imidazole Alkaloids From The South China Sea Sponge *Fascaplysinopsis Reticulata*. *Org Lett* 2015; 17(14): 3458-61.
20. Nazemi M, Motallebi Moghanjoghi AA, Jamili S, et al. Comparison Of Antibacterial Activities Of *Ircinia Mutans* Extracts In Two Different Seasons From Kish Island, Persian Gulf, Iran. *Iran J Fish Sci* 2014; 13(4): 823-33.
21. Govinden-Soulange J, Marie D, Kauroo S, et al. Antibacterial Properties Of Marine Sponges From Mauritius Waters. *Trop J Pharm Res* 2014; 13(2): 249-54.

Original Article

Antimicrobial Effects of Some Persian Gulf Marine Sponges

SH. Seradj (PhD)^{1*}, SZH. Hashemi (PharmD)¹, K. Zomorodian (PhD)²,
MR. Moein (PhD)¹

¹ Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

² Department of Medical Mycology and Parasitology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

(Received 19 Feb, 2020 Accepted 7 Jul, 2020)

Abstract

Background: We investigated in vitro antimicrobial activity of five marine sponge species collected from Kish Island in the Persian Gulf: *Fascaplysinopsis reticulata*, *Callyspongia clavatus*, *Callyspongia siphonella*, *Niphates furcata*, and *Pseudosuberites clavatus* against gram positive bacteria, gram negative bacteria, fungi and yeasts.

Materials and Methods: Sponage extracts were prepared by two solvents of dichloromethane and methanol in three steps. The extracts were then tested with broth microdilution method.

Results: Microorganisms varied in their susceptibility to extracts. Fungi were less sensitive than both gram-positive and gram-negative bacteria. *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus mutans* were more sensitive than other bacteria. All extracts showed acceptable antimicrobial activity against at least one bacterial strain. Marine sponge *Fascaplysinopsis reticulata* had the highest activity against all examined gram-positive bacteria including resistant strains (MIC of dichloromethane and methanolic extracts were in the range of 0.25-8 and 16-32 µg/ml, respectively).

Conclusion: The results showed that marine sponge *Fascaplysinopsis reticulata* had significant antimicrobial activity, and is a promising candidate for further purification and identification of antibacterial compounds.

Keywords: antimicrobial activity, Persian Gulf, marine sponge, *Fascaplysinopsis reticulata*

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Seradj SH, Hashemi SZH, Zomorodian K, Moein MR. Antimicrobial Effects of Some Persian Gulf Marine Sponges. . Iran South Med J 2020; 23(5): 494-504

Copyright © 2020 Seradj, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

*Address for correspondence: Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran. Email: serajh@sums.ac.ir

*ORCID: 0000-0002-3937-0127

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>