J. Oceanography (JOC). 12(48): 109-118, Winter 2022

Journal of Oceanography
Homepage: joc.inio.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH PAPER (Marine Science)

Extraction and Characterization of Phytol Fraction from Marine Sponge *Dysidea avara* and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities

Nazemi, M.[1,*], Karimzadeh, R.[2], Aghaei Dargiri, S.[3], Ghaffari, H.[4], Ghorbani, M.[5]

[1] Assistant professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

[2] M.Sc., nstitute, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

[3] Ph.D., Department Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

[4] Assistant professor, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

[5] Associate professor, Pasteur Institute of Iran the Production & Research Complex, Department of Research & Development, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 13/08/2019
Revised: 08/12/2021
Accepted: 19/08/2021

Keywords:
Sea sponge
Natural compounds
Biological activities
Hengam Island
Persian Gulf

*Corresponding author:
✉ *melikanazemi@yahoo.com*

ABSTRACT

Background and Objectives: According to researches, sponges produce the most secondary metabolites with biological activities among aquatic animals. In this scientific study, we investigated the antifungal, antibacterial and cytotoxic activities of terpenoid extracted, phytol, from *Dysidea avara* of Hengam Island, Persia Gulf.

Methods: In this study, dried sponge powder was extracted in acetone by maceration method. Then, the terpenoids were extracted by silica gel column chromatography from acetone extract by using n-hexane, ethyl acetate and methanol solvent. Biological activities of extracted compounds were evaluated by XTT assay on KB / C152, HUT-78 / C185 cancer cell line and Hek293 healthy cell for Cytotoxic, tubular dilution test on *Escherichia coli* strains, *Pseudomonas aeruginosa salubilosa*, *Klebsiella*, *Klebsiella Typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Nocardia brasiliensis* and the fungal, yeast strains, *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* for antibacterial and antifungal test. The selected phytol was identified by gas chromatography.

Findings: The phytol compound was killed fifty percent of cancer cells at concentrations of 67.21µg/ml on oral epithelial cancer cells and concentrations 56.10 µg/ml on lymphocyte cancer cells. Phytol compound were killed gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* at 200-300 µg/ml concentrations and at 1000 -2000 µg/ml concentrations Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas salmonella* and the fungal *Aspergillus*, yeast strains *C. albicans*. This study investigated the effects of phytol fraction extracted from *D. avara* sponge from the Hengam Island, Persian Gulf. The cytotoxic, antibacterial and antifungal activities of extracted fractions have been demonstrated.

Conclusion: The results showed that complementary experiments, isolation and purification of bioactive compounds can be an effective step in the extraction of natural compounds for the production of drugs, cosmetics and food.

10.52547/joc.12.48.109

©2022 JOC. All rights reserved

NUMBER OF TABLES	NUMBER OF FIGURES	NUMBER OF REFERENCES
4	6	27

مقاله پژوهشی (علوم دریایی)

استخراج و شناسایی فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج دریایی گونه *Dysidea avara* و بررسی اثر ضدمیکروبی و سیتوتوکسیک

ملیکا ناظمی[1،*]، رامین کریم‌زاده[2]، سهیلا آقائی درگیری[3]، هادی غفاری[4]، مسعود قربانی[5]

[1] عضو هیات علمی، پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

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

[3] دکتری، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

[4] عضو هیات علمی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران

[5] انستیتو پاستور ایران، مجتمع تحقیقات و تولید، گروه تحقیق و توسعه

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۲۲
تاریخ بازبینی: ۱۴۰۰/۰۹/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۸

واژگان کلیدی:
اسفنج دریایی
ترکیبات طبیعی
خواص زیستی
جزیره هنگام
خلیج فارس

*نویسنده مسئول
melikanazemi@yahoo.com

چکیده

پیشینه و اهداف: مطالعات انجام شده نشان می‌دهد اسفنج‌ها در بین آبزیان بیشترین متابولیت‌های ثانویه با خواص زیستی را تولید می‌کنند، در این تحقیق علمی به بررسی خواص سیتوتوکسیک، ضدقارچ و ضدباکتری ترکیب ترپنوئیدی فیتول، استخراج شده از گونه *D. avara* از جزیره هنگام، خلیج فارس پرداخته شده است.

روش‌ها: در این پژوهش پودر خشک اسفنج با استفاده از حلال استون به روش خیساندن عصاره گیری شد. سپس به‌منظور جداسازی ترکیبات ترپنوئید عصاره از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل توسط حلال‌های ان هگزان، اتیل استات و متانول استفاده شد. خواص زیستی این ترکیب؛ سیتوتوکسیک توسط آزمون XTT روی رده سلول سرطانی KB/C152، HUT-78/ C185 و سلول سالم Hek293، ضدباکتری و ضدقارچ توسط آزمون رقت لوله‌ای روی سویه باکتری‌های ؛ اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا، کلبسیلا نمونیا، پروتئوس ولگاریس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس سرئوس، نوکاردیا برازیلینسیس و سویه‌های قارچ و مخمر آسپرژیلوس فومیگاتوس و کاندیدا آلبیکنس مورد سنجش قرار گرفت. ترکیبات فیتول توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی شد.

یافته‌ها: این ترکیب در غلظت ۶۷/۲۱ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلول‌های سرطانی اپیتلیوم دهانی، ۵۶/۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بر رده سلول‌های سرطانی لنفوسیت اثر کشندگی نشان داد. ترکیب فیتول در غلظت ۲۰۰ تا ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ باکتری‌های گرم مثبت استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس سرئوس و در غلظت ۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ باکتری‌های گرم منفی اشرشیاکلی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی و مخمر کاندیدا آلبیکنس و قارچ آسپرژیلوس شده است. در این پروژه که به بررسی ترکیبات ترپنوئید و استروئید استخراج شده از اسفنج دریایی *D. avara* از جزیره هنگام پرداخته شده است اثر زیستی سیتوتوکسیک، ضدباکتریایی و ضدقارچ از فرکشن‌های استخراج شده اثبات شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده در این پروژه تحقیقاتی نشان می‌دهد که با انجام آزمایش‌های تکمیلی، جداسازی و خالص سازی ترکیب فیتول می‌توان گام موثری در استخراج ترکیبات طبیعی به‌منظور تولید دارو، محصولات آرایشی بهداشتی و غذایی برداشت.

مقدمه

در طی چهار دهه اخیر فعالیّت‌های بسیاری در زمینه بررسی خواص دارویی آبزیان به ویژه اسفنج‌ها صورت گرفته است، اما بررسی‌های انجام شده در داخل کشور بسیای محدود بوده است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط اسفنج‌ها اغلب به‌منظور دفاعی در برابر؛ شکارچیان، عفونت‌های میکروبی، رسوب‌های زیستی (بیوفولینگ) سنتز می‌شوند، که با توجه به خواص زیستی آن‌ها بشر امروزه از این ترکیبات طبیعی به‌عنوان

دارو در درمان بیماری‌های انسانی استفاده می‌کند [۱]. ترکیبات طبیعی تولید شده توسط اسفنج‌ها متعلق به ترکیبات شیمیایی؛ آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، گلیکوزیدها، فنل‌ها، فینازین‌ها، پلی کتیدها، محصولات اسید چرب و پپتیدها، آنالوگ‌های اسیدآمینه، نوکلئوزیدها، پورفیرین‌ها، پرکسیدهای سیکلیک آلیفاتیک و استرول‌ها هستند [۲]. خواص بیولوژیک متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌ها شامل خواص؛ ضدسرطانی، سیتوتوکسیک، ضدباکتریایی، ضدقارچ، ضدویروسی، ضد مالاریا، ضدالتهابی، آرام بخش، افزایش مقاومت بدن، شل کننده عضلات، و ... می‌باشد (۱۶). یکی از بیماری‌های شایع و علت اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته سرطان است، در سال‌های اخیر دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش‌های بسیاری انجام داده اند [۳]. بررسی‌های شیمیایی و بیولوژیکی اسفنج‌ها نشان می‌دهد که ۸۲۵ ترکیب طبیعی استخراج شده از آن‌ها اثرات سیتوتوکسیک و ضدسرطان از خود نشان می‌دهد [۴]. پاتوژن‌ها (قارچ‌ها و باکتری‌ها) یکی دیگر از عوامل شایع بیماری‌زا در سرتاسر جهان هستند، که با وجود پیشرفت علم و دانش همچنان عامل بیماری و مرگ و میر می‌باشند [۵]. به‌طوری که طی دهه‌های اخیر شمار بیماران مستعد به عفونت با میکروارگانیسم‌های فرصت طلب به‌طور قابل توجهی در بسیاری از کشورها افزایش یافته است. در این راستا مطالعات بسیاری به منظور کشف و بررسی ترکیبات ضدقارچ و ضدباکتری از منابع طبیعی انجام می‌گیرد و سالانه بسیاری از ترکیبات جدید با خواص ضد میکروبی کشف می‌شوند، اما از آنجا که پاتوژن‌ها نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی مقاوم می‌شوند لذا مطالعه در این راستا به‌طور پیوسته ادامه دارد. بررسی‌های خواص زیستی اسفنج‌ها نشان می‌دهد که ۱۴۵و ۱۱۱ ترکیب طبیعی استخراج شده از آن‌ها اثرات ضدباکتری و ضدقارچ از خود نشان می‌دهد [۴]. مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که اسفنج‌های متعلق به جنس *Dysidea* spp. دارای متابولیت‌های ثانویه با خواص بیولوژیک متعددی است. از آن‌جا که متابولیت‌های ثانویه تولید شده در شرایط مختلف محیطی متفاوت می‌باشند، لذا بررسی متابولیت‌های ثانویه موجود در این اسفنج که برای اولین بار در آب‌های خلیج فارس صورت می‌گیرد بسیار حائز اهمیت می‌باشد. البته ذکر این نکته ضروری است که اکتشاف ترکیبات جدید از اسفنج‌های دریایی بستگی به بودجه، سیاست دولت‌ها، تقاضای صنعت، سرمایه‌گذاران، امکانات تحقیقاتی، دانشمندان متخصص، زیر ساخت‌ها و امکانات آزمایشگاهی، تجهیزات، ماشین‌آلات و حمایت‌های سازمانی دارد. با توجه به خواص زیستی متابولیت‌های ثانویه اسفنج‌های دریایی در این پروژه علمی به بررسی اثر ضدباکتریایی، ضدقارچ و سیتوتوکسیک فیتول‌های جداسازی شده از اسفنج گونه *Dysidea avara* از عمق ۲۵ تا ۳۰ متر جزیره هنگام پرداخته شده است.

روش پژوهش

نمونه‌های اسفنج گونه *D. avara*، به وزن تر ۲ کیلو گرم در شهریور ماه سال ۱۳۹۴ توسط غواصی و از عمق ۲۵ تا ۳۰ متر از شمال جزیره هنگام، واقع در خلیج فارس با موقعیت جغرافیایی ″۵۵°۵۴′۵۵ - ″۵۵°۵۴′۴۰ شرقی و ″۲۶°۴۱′۱۵ - ″۲۶°۳۶′۴۳ شمالی که در شمال آن جزیره قشم قرار دارد تهیه شدند، سپس به آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان منتقل شد.

۱. عصاره‌گیری از اسفنج

نمونه‌های اسفنج دریایی پس از پاکسازی درابتدا به اندازه‌های ۱سانتی‌متر قطعه قطعه شد، سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت)، در نهایت نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب پودر شده و تا زمان عصاره‌گیری در فریز در دمای ۲۴- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره‌گیری از پودر خشک تهیه شده از اسفنج به وزن ۳۵۰ گرم با استفاده از روش خیساندن انجام گردید [۶].

۲. جداسازی ترکیبات ترپنوئید از اسفنج

عصاره خشک استونی تهیه شده به وزن ۲۷/۱۲ گرم تهیه شد و برای جداسازی ترکیبات طبیعی موجود در عصاره از ستون ستون سیلیکاژل استفاده شد. ستون سیلیکاژل که ۷۰ سانتی‌متر ارتفاع و ۲ سانتی متر قطر داخلی داشت، توسط پودر سیلکاژل مخصوص کروماتوگرافی با اندازه ۰/۲ تا ۰/۶ میلی متر پر شد. شست و شوی عصاره‌های استونی به‌طور جداگانه و توسط حلال‌های ان‌هگزان-اتیل‌استات به‌عنوان 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. ۱۲۸ فراکسیون به‌دست آمده از ستون کروماتوگرافی از نقطه نظر آزمون حضور ترپنوئیدها مورد بررسی قرار گرفتند. سپس فراکسیون‌هایی که با چند لکه در کروماتوگرافی‌های لایه نازک که با معرف وانیلین به رنگ صورتی تا بنفش در آمده بودند به ستون کروماتوگرافی شیشه‌ایی دیگری با طول ۵۰ سانتی‌مترو قطر داخلی ۰/۵ سانتی‌متر مانند قبل پر شده و شست و شو داده شدند [۷].

۳. شناسایی ترکیب فیتول اسفنج

فراکسیون‌های به‌دست آمده از ستون کروماتوگرافی شیشه‌ایی به وسیله لوله موئینه روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) لکه گذاری شدند. سپس به منظور خشک شدن به مدت ۲۰ دقیقه در معرض هوا قرار گرفتند و سپس در تانک کروماتوگرافی لایه نازک

حـاولی حلال‌هـای متـانول- کلروفـرم- ان‌هگـزان بـا نسـبت‌های ۱۰ :۲۰:۷۰ قـرار داده شـد. جهـت جسـتجوی فرکشـن حـاوی ترکیـب ترپنوییدی از معرف وانیلین- اسید سولفوریک، به صـورت محلـول ۱ درصد وانیلین در اتانول و محلول ۵ درصد اسید سولفوریک اسید در اتانول به صورت اسپری روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. سپس صفحات کروماتوگرافی لایه نازک در آون و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قـرار گرفتنـد و تغیـرات در نـور مرئی بررسی شد. فرکشن‌های حاوی ترپنوئید به رنگ بنفش کمرنگ – پر رنگ تغییر رنگ دادند [۷]. لکه‌هایی که به رنگ صورتی، بـنفش کمرنگ و بنفش پـر رنـگ در آمدنـد را بـرای شناسـایی فیتـول بـه دستگاه جی‌سـی‌مـس (مـدل Agilent7000 Series Triple Quad GC/MS MainFrame؛ گـاز کریـر هلیـوم ۹۹/۹۹ درصـد، دکتـور C5975، ستون: Part number 19091s-436، طول ۶۰ متـر، قطـر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، لایه داخلـی ۰/۲۵ میکرومتـر) در آزمایشـگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تزریق شدند.

۴. بررسی خواص سیتوتوکسیک

۴-۱ ارزیابی میزان سمّیت با استفاده از آزمون XTT

برای این منظور، سلول‌های سرطانی اپیدرموید دهـان انسـان (KB/ C152)، لنفوسیتی (HUT-78/ C185) و سـلول سـالم جنـین کلیـه انسانی (Hek 293) از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایـران بـه صورت فلاسک تهیّه شدند و به محیط کشـت روزلـت پـارک مـدیوم انستیتو ۱۶۴۰- RPMI منتقل شدند.

برای آزمون XTT ابتدا توسط عمل تریپنیزاسیون سلول‌های سـرطانی اپیدرموید دهان و لنفوسیت انسانی از سطح فلاسک جدا شده و بـه مـدّت ۵ دقیقـه در ۱۵۰۰ دور در دقیقـه سـانتریفیوژ شـدند. سـپس سلول‌ها با تـراکم ۲۵×۱۰۳ در هـر کـدام از پلیت‌هـای ۹۶ حفـره‌ای کشت سلولی توزیع گردیدنـد و از محـیط کشـت ۱۶۴۰- RPMI بـه مقدار ۲۰۰ میلی‌لیتر به هر حفره اضافه شد و ۲۴ ساعت در انکوبـاتور قرار داده شد تا سلول‌ها در میکروپلیت‌ها رشد نمایند.

به‌منظور بررسـی اثـرات سیتوتوکسـیک فرکشـن حـاوی فیتـول بـر سـلول‌های سـرطانی، بـا غلظـت هـای ۲، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند ، و آزمـون سـه بـار تکرار شد. به‌منظور شاهد منفی، در تعدادی از چاهک‌ها محیط کشت ۱۶۴۰- RPMI بدون ترکیب افزودنی اضافه شد. سپس با اسـتفاده از دستگاه الایزا ریدر مـدل (Bio-Tek ELx 800) در طـول مـوج ۴۹۰ نانومتر و ۶۹۰ نانومتر میزان میزان اکسیژن محلول خوانده شد. میزان OD به دست آمده نشانگر مقدار رنگ جذب شده توسّـط سـلول‌های زنده می باشد. میزان LC ۵۰ (میـزان ممانعـت از رشـد سـلول‌هـای سرطانی) ۵۰٪ از سلول‌ها بر اساس درصد کشندگی محاسبه شد [۸].

کشـندگی درصـد= (منفـی کنتـرل OD -نمونـه OD)/(منفـی کنترلOD)×۱۰۰

۵. بررسی خواص ضدباکتریایی

بررسی خواص ضدباکتریایی بـا اسـتفاده از روش بـراث (Bacterial Broth Dilution Methods) به شرح زیر انجام گرفت:

سـویه هـای بـاکتری ۱۵۲۲۴ ,*Escherichia coli* 27853 ATCC , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1053 *Klebsiella pneumonia* ATCC ۱۰۷۹، *Proteus vulgaris* PTCC ۱۶۰۹، *Salmonella typhi* PTCC ۱۷۶۴، *Staphylococcus aureus aureus* ATCC ۱۷۱۵، *Bacillus subtilis spizizenii* PTCC ۱۱۷۷۸ ۱۷۱۵،Bacillus cereus ATCC و ۱۴۲۲ *Nocardia brasiliensis* PTCC از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد، سـپس هـر کـدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدّت ۲۴ تا ۷۲ ساعت بر اسـاس میزان سرعت رشد باکتری‌هـا در دمـای ۳۷ درجـه سـانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی‌های تک به منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد باکتری‌ها به تعـداد $1/5\times10^{6}$باکتری بـه مقدار ۱ میلی‌لیتر به هرکدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سـپس از فرکشن حاوی ترکیب؛ فیتول با غلظت هـای ۱، ۲، ۴، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتـر که در محیط براث حل شده بود. به مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر بـه خانـه های پلیت فوق افزوده شد. سپس پلیت‌ها در انکوبـاتور بـا دمـای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و کـدورت آن هـا مـورد بررسـی قـرار گرفت و به منظور تعیین حداقل غلظت کشـندگی از لولـه‌هـای فاقـد کدورت کشت پورپلیت تهیه شد [۹].

۶. بررسی خواص ضدقارچ

بررسی خواص ضد قارچی با استفاده از روش ماکرودایلوشن به شـرح زیر انجام شد:

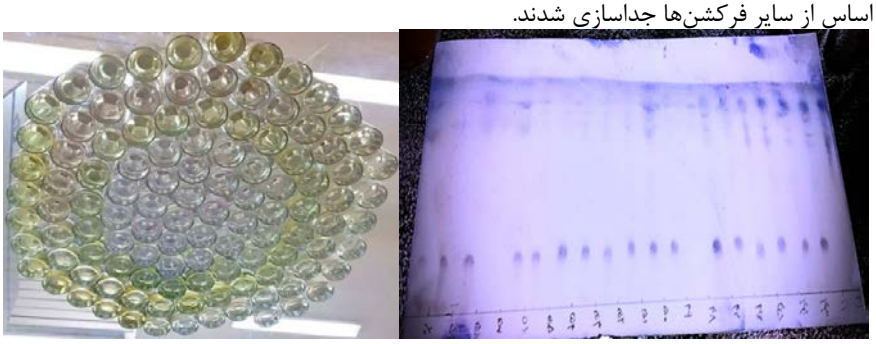
سویه‌های قارچ و مخمر *Candida albicans* ATCC ۱۰۲۳۱ و۵۰۰۹ *Aspergillus fumigatus* PTCC از مرکـز کلکسـیون قـارچ‌هـا و باکتری‌های صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه خواهد شد، سپس هر کدام از سویه‌ها به کشت اولیه داده شد. پس از رشد قارچ و مخمر آن ها از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس از کلونی‌های تـک ایجاد شده به محیط ماکرودیلوشن بـراث در چاهـک‌هـای پلیـت ۹۶ خانه وارد نموده، سوسپانسیون حاصل در طول موج ۵۳۰ نـانومتر بـا دستگاه اسپکتروفتومتری دارای عبور نـوری ۹۰ درصـد اسـت انـدازه گیری شد، که تقریباً معادل ۱۰۶ سلول قارچی در هر میلی‌لیتـر مـی

باشد. از لوله فوق که حاوی 10^6 سلول قارچی بود به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به هرکدام از لوله‌های استریل اضافه شد، سپس فرکشن های حاوی ترکیب فیتول براث حل شده بود به مقدار ۵۰۰ میکرولیتر به لوله‌های فوق افزوده شد.. سپس پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ و ۲۶ درجه سانتی گراد به مدّت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت پلیت از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها را مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین حداقل غلظت کشندگی مقدار ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از لوله‌هایی که رشدی در آن مشاهده نشده بود، به محیط سابوردکستروزآگار اضافه گردید، تا حداقل غلظت کشندگی قارچ تعیین شود.

نتایج و بحث

۱. جداسازی فرکشن‌های حاوی فیتول

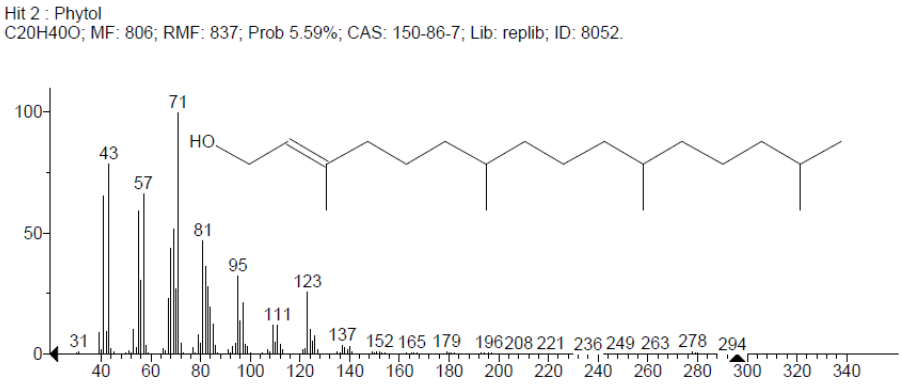
۱۲۸ فرشکن از عصاره اولیه اسفنج گونه *Dysidea avara* تهیه شد، بر اساس شناساگر وانیلین فرکشن‌های حاوی ترپنوئید به رنگ صورتی تا بنفش و فرکشن‌های حاوی استروئید به رنگ آبی تغییر می کنند (شکل ۱ الف)، بر این اساس از سایر فرکشن‌ها جداسازی شدند.



شکل ۱: (الف). فرکشن‌های تهیه شده از اسفنج دریایی (ب) کروماتوگرافی صفحه نازک فرکشن‌های عصاره استونی اسفنج

Fig. 1: (A) Fractions made of sea sponge (B) Thin plate chromatography of fractions of Estonian sponge extract

با استفاده از کرومانوگرافی گازی فرکشن حاوی ترکیب فیتول (2E,7R,11R)-3,7,11,15-tetramethyl-2-hexadecen-1-ol) با فرمول شیمیایی C20H40O، وزن مولکولی 296.54 g·mol−1 (شکل ۱ ب) که به گروه دی‌ترپن الکل آکسیل متعلّق می‌باشد، به مقدار۹۲ ٪ در فرکشن شماره ۱۹ [۱۰] (ان‌هگزان – اتیل‌استات ۳۰: ۷۰) در دقیقه ۱۲ تا ۱۴ شناسایی شد (شکل ۲). در پنج دهه اخیر توجه زیست شناسان و شیمیدان ها به ترکیبات طبیعی با منابع دریایی معطوف شده است. تاکنون نزدیک به ۱۶۰۰۰ ترکیب از منابع دریایی استخراج شده است که در بیش از ۶۸۰۰ گزارش علمی منتشر شده است. اگر مقالات منتسر شده در زمینه سنتزها، مقالات مروری، بررسی خواص بیولوژیک و مطالعات اکولوژی را نیز به آن اضافه کنیم به این عدد به ۹۰۰۰ گزارش علمی افزایش پیدا می‌کند [۱۱]. استخراج ترکیب فیتول از جلبک‌های دریایی مانند؛ *Ulva pertusa* [۱۲]، جنگل‌های مانگرو گونه *Rhizophora mucronate* [۱۳] و سویه‌های مختلف باکتری‌های دریایی [۱۴] گزارش شده است.



شکل ۲: طیف جی سی فرکشن شماره ۱۹ حاوی ترکیب فیتول

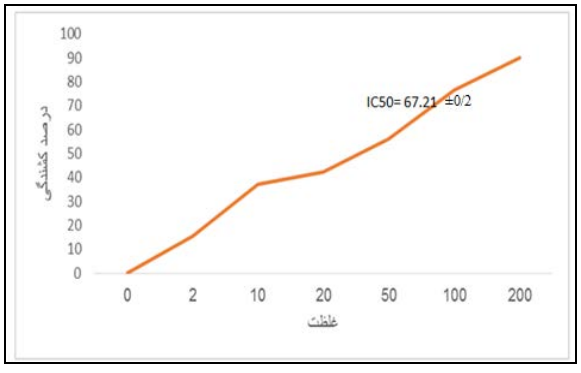
Fig. 2: GC spectrum number 19 contains phytol composition

۲. بررسی خواص سیتوتوکسیک فرکشن حاوی ترکیب فیتول

بر اساس سنجش اکسیژن محلول در آزمون XTT، پنجاه درصد کشندگی فرکشن حاوی ترکیب فیتول استخراج شده از اسفنج

دریایی گونه *D .avara* نسبت به؛ رده سلولی اپیتلیوم دهانی (KB/ C152) برابر با ۰/۲ ± ۶۷/۲۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (شکل۳)، رده سلولی جورکت (E6-1) برابر با ۰/۲±۵۶/۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (شکل ۴) است. فرکشن حاوی ترکیب فیتول در غلظت‌های مورد بررسی پنجاه درصد کشندگی روی رده سلولی جنینی کلیه انسان (Hek 293) از خود نشان نداده است (شکل ۵). بررسی‌های علمی نشان می‌دهد که ترکیب فیتول دارای اثرات سیتوتوکسیک روی سلول‌های سرطانی روده (HT-29)، استخوان (MG-63)، معده (AZ-521) است [۱۵]. در مطالعه دیگری که روی اثر آنتی‌اکسیدانت عصاره تغلیظ شده، حاوی ۴۲ درصد فیتول از جلبک‌های ماکروسکوپی گونه *Gelidiella acerosa* انجام شد، در غلظت ۱۰۰ ماکروگرم در میلی‌لیتر اثر آنتی‌اکسیدانت از خود نشان داده است [۱۶]. مطالعه دیگری که روی اثر سیتوتوکسیک فیتول با استفاده از روش assay MTT توسط پنجین و همکاران انجام شد، مشخص گردید که این ترکیب در غلظت‌های؛ ۸/۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7)، غلظت ۱۵/۵۱ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی دهانه رحم (HeLa)، ۳۴/۸۲ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ (HT-29، ۵۶/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی ریه (A-549)، ۶۵/۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر سلول‌های سرطانی پوست (Hs294T)، ۷۷/۸۵ میکروگرم در میلی‌لیتر روی سلول‌های سرطانی پروستات (PC-3) منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها شده است. [۱۷].

در مطالعه دیگری که فرکشن حاوی ترکیب فیتول استخراج شده از عصاره کلروفرم- متانول جلبک دریایی *Gracillaria edulis* روی رده سلول‌های سرطانی سینه (MCF-7) انجام شد، در غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ ۵۰ درصد سلول‌های مذکور شد [۲]. نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات همسو می‌باشد به عبارتی ترکیب فیتول اثر سیتوتوکسیک روی رده‌های سلولی بافت نرم دارد.

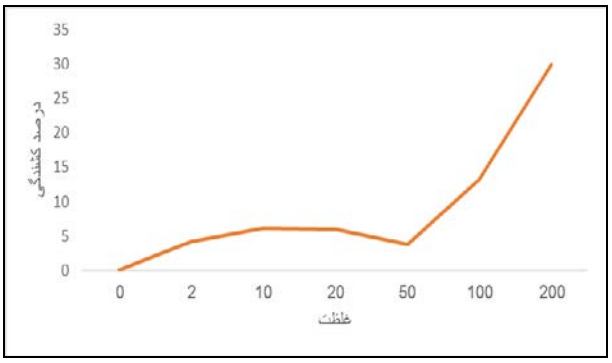


شکل ۳: میزان LC $_{50}$ فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *D. avara* روی رده سلولیKB/ C152

Fig. 3: LC 50 fraction containing phytol composition from *D. avara* sponge on KB / C152 cell line

شکل ۴: میزان LC_{50} فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *D. avara* روی رده سلولی Jurkat/ E6-1

Fig. 4: LC50 fraction containing phytol composition from *D. avara* sponge on Jurkat / E6-1 cell line



شکل ۵: میزان LC_{50} فرکشن حاوی ترکیب (Ergosta-14,22-don-3-ol,(3β.5α,22E استخراج شده از اسفنج گونه *D. avara* روی رده سلولی 293 Hek

Fig. 4: 50LC fraction containing the compound (Ergosta-14,22-don-3-ol, (3β.5α, 22E) extracted from sponge of *D. avara* species on 293 Hek cell line

۳. بررسی اثرات ضدباکتری فرکشن‌های حاوی ترپنوئید و استروئید از اسفنج گونه *Dysidea avara*

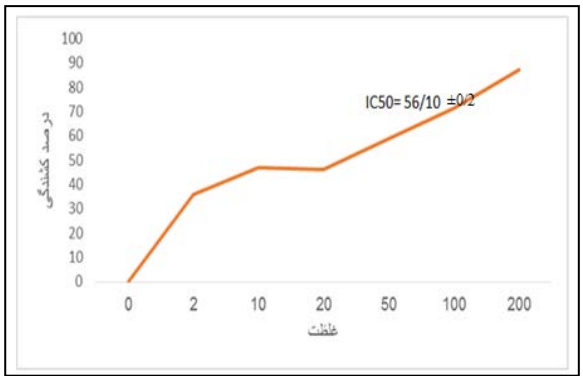
۳-۱ بررسی خواص ضدباکتری فرکشن حاوی ترکیب فیتول

در این بررسی حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد باکتری (MIC) فرکشن حاوی ترکیب فیتول برای باکتری‌ها در (جدول ۱) و حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC) ترکیب فیتول برای باکتری‌ها در (جدول۲) نشان داده شده است.

جدول ۱: حداقل غلظت ممانعت کنندگی فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *Dysidea avara*

Table 1: Minimum fraction inhibitory concentration containing phytol composition from *Dysidea avara* sponge

باکتری	غلظت فیتول µg/ml	غلظت آمپی سیلین µg/ml
Bacillus subtilis	۵۰	۲۰
Staphylococcus aureus	۳۰	۲۰
Bacillus cereus	۳۰	۲۰
E. coli	۱۰۰	۵۰
Pseudomonas aeruginosa	۲۰۰	۵۰
Salmonella typhi	۲۰۰	۵۰



جدول ۲: داقل غلظت کشندگی باکتریایی فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *Dysidea avara*

Table 2: Minimum bactericidal concentration of fraction containing phytol composition of Dysidea avara sponge

باکتری	غلظت فیتول µg/ml	غلظت آمپی سیلین µg/ml
Bacillus subtilis	۳۰۰	۵۰
Staphylococcus aureus	۲۰۰	۵۰
Bacillus cereus	۲۰۰	۵۰
E. coli	۱۰۰۰	۲۰۰
Pseudomonas aeruginosa	۲۰۰۰	۲۰۰
Salmonella typhi	۲۰۰۰	۲۰۰

در ترکیب فیتول روی باکتری‌های نوکاردیا برازیلینسیس، کلبسیلا نمونیا و پروتئوس ولگاریس اثر ممانعت کنندگی از رشد نشان نداده است. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد فیتول دارای کاربردهای زیستی؛ در صنایع آرایشی و بهداشتی، شامپو و پاک کننده‌های خانگی، دارویی، ضدباکتری، ضدسرطان و ضدافسردگی می‌باشد (۲). ترکیبات طبیعی استخراج شده از جانداران دریایی به‌عنوان عامل‌های ضد سرطانی بالقوه در سال ۲۰۱۱ مورد بررسی قرار گرفتند که از ۳۹ ترکیب که اثر ضد سرطانی از خود نشان دادند ۱۸ ترکیب متعلق به اسفنج‌ها بوده است [۱۸]. ذکر این نکته نیز قابل توجه است که ۶ ترکیب از ۱۶ ترکیب طبیعی استخراج شده با اثر ضدسرطان از جانداران دریایی که در حال حاضر در مراحل مختلف کلینیکی قرار دارند متعلق به اسفنج‌ها است [۱۹]. از آن‌جا که اغلب این مناطق به ویژه اکوسیستم‌های مرجانی تولیدات و بیوماس بالایی دارند بنابراین میزان باقیمانده‌های غذایی در این مناطق بسیار بالاست، از طرف دیگر موکوس تولید شده حاصل از متابولیت‌های صخره‌های مرجانی منبع دیگری از مواد آلی می‌باشند، که تمام عوامل فوق بستر بسیار مناسبی را برای رشد باکتری‌ها فراهم می‌نماید [۸]. در آزمایشی که توسط قائیان روی اثرات ضدباکتری فیتول انجام شد مشخص شد این ترکیب در غلظت ۶۲/۵ ماکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری اشرشیاکلی ممانعت نمود اما اثری روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس از خود نداشته است [۲۰]، ترکیب فیتول مانند فرکشن حاوی فیتول استخراج شده از اسفنج *D .avara* اثرات ضدباکتری دارد روی باکتری اشرشیاکلی دارد اما باکتری استافیلوکوکوس آرئوس به آن مقاوم است، شاید تفاوت سویه‌ها دلیل این اختلاف باشد در آزمایش یاد شده کلکسیون میکروبی آمریکا ۲۵۹۲۳ می‌باشد در حالی که در این پروژه شماره کلکسیون ۱۷۶۴ است. در آزمایش دیگری که روی اثر ضدباکتری فیتول انجام شد این ترکیب در غلظت ۳۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس آرئوس، باسیلوس سرئوس و انتروکوکوس فکالیس و در غلظت ۶۲/۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا ممانعت نموده و در غلظت ۱۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ باکتری های باسیلوس سرئوس و انتروکوکوس فکالیس و در غلظت ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ باکتری های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس آرئوس شده است [۲۱]. بررسی‌های علمی نشان می‌دهد که ترکیب فیتول دارای اثر ضدباکتری روی باکتری استافیلوکوکوس آرئوس است [۲۲]. نتایج این آزمایش مطابق با پروژه انجام شده روی اثر ضدباکتری فرکشن حاوی فیتول از اسفنج *D .avara* است و دلیل اختلاف غلظت موثره خلوص ترکیبات می باشد.

۴. بررسی اثرات ضدقارچ فرکشن‌های حاوی ترپنوئید و استروئید از اسفنج گونه *Dysidea avara*

۴-۱ بررسی خواص ضدقارچ فرکشن حاوی ترکیب فیتول

ترکیب فیتول در غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از رشد مخمر کاندیدا آلبیکنس و قارچ آسپرژیلوس ممانعت نموده و در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر منجر به مرگ کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس شده است (جدول ۳ و ۴). نتایج این تحقیق با بررسی‌های انجام شده روی ترکیب فیتول مطابقت داشته، در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر ترکیب خالص فیتول از رشد قارچ و مخمر ذکر شده ممانعت می نماید [۲۰] و دلیل اختلاف غلظت موثره خلوص ترکیب می‌تواند باشد.

جدول ۳: حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد قارچ فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *Dysidea avara*

Table 3: Minimum inhibitory concentration of fractional fungi containing phytol composition from sponge of *Dysidea avara*

قارچ	غلظت فیتول µg/ml	غلظت نیستاتین µg/ml
C. albicans	۳۰۰	۱۰۰
A. fumigatus	۳۰۰	۱۰۰

جدول ۴: حداقل غلظت کشندگی قارچ فرکشن حاوی ترکیب فیتول از اسفنج گونه *Dysidea avara*

Table 4: Minimum lethal concentration of fractional fungi containing phytol composition from sponge of *Dysidea avara* species

قارچ	غلظت فیتول µg/ml	غلظت نیستاتین µg/ml
C. albicans	۱۰۰۰	۲۰۰
A. fumigatus	۲۰۰۰	۲۰۰

نتیجه‌گیری

هر چند که تعدادی از ترکیبات طبیعی استخراج شده از اسفنج‌ها به‌عنوان کاندیدهای دارویی بالقوه در طول چند دهه گذشته معرفی شده اند اما برای تولید و توسعه این داروها باید به فکر راه‌هایی غیر از برداشت از منابع طبیعی بود. همان طور که آزمایش های انجام شده در مناطق مختلف دنیا نشان می‌دهد از منابع طبیعی تنها چند میلی

گرم ماده موثره قابل استخراج است بنابراین از هم‌اکنون باید به فکر تامین و تولید آن‌ها بود؛ یکی از راه ها تکثیر و پرورش اسنفج ها در محیط های دریایی [۲۳]، استفاده از میکرواورگانیسم‌های اسفنج که متابولیت‌های ثانویه با خواص زیستی تولید می‌کنند و کشت سلولی [۲۴] نیز می تواند به عنوان راه‌هایی در آینده به‌منظور تولید این ترکیبات با ارزش مورد استفاده قرار گیرد.

در این تحقیق مشخص شده که فرکشن حاوی ترکیب فیتول استخراج شده از از اسفنج گونه *D. avara* دارای خواص سیتوتوکسیک روی رده سلولی لنفوسیتی در غلظت‌های ۵۶/۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد، در حالی که اثر کشندگی روی سلولی‌های کلیه جنین انسان از خود نشان نداده است، به عبارت دیگر فرکشن حاوی ترکیب فیتول تنها روی سلول‌های سرطانی اثر می‌گذارد. در این مطالعات می توان با تکثیر و پرورش اسفنج دریایی گونه *D. avara* و جداسازی و خالص سازی این ترکیبات با کاربرد دارویی و یا استفاده از آن‌ها به‌عنوان مکمل غذایی و دارو در بهبود بیماران سرطانی گام موثری برداشت. [۲۵-۲۹]

مشارکت نویسندگان

این مقاله پژوهشی استخراج شده از پروژه تحقیقاتی با عنوان "استخراج، شناسائی و بررسی خواص بیولوژیک (ضدباکتری، ضدقارچ و سیتوتوکسیک) ترپنوئیدهای اسفنج *Dysidea* spp. موجود در جزیره هنگام (فاز ۱)" با شماره قرار داد ۴۳۲۶۰/ص/۹۴ و با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شده است. انجام کارهای میدانی و نگارش کلی مقاله و آزمایش های انجام شده بر عهده نفر اول و نویسنده مسئول بود. انجام آزمایش های شیمیایی و زیستی بر عهده نویسندگان دوم، چهارم و پنجم بود. همکاری در نگارش مقاله و ویراستاری بر عهده نویسنده سوم بود.

تعارض منافع

«هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.»

References

1. Paula JCD, Desoti VC, Sampiron EG, Martins SC, Ueda-Nakamura T, Ribeiro SM, et al. Trypanocidal activity of organic extracts from the Brazilian and Spanish marine sponges. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2015;**25**:651-656. **doi:** 10.1016/j.bjp.2015.08.011
2. Sheeja L, Lakshmi D, Bharadwaj S, Parveen KS. Anticancer activity of phytol purified from Gracilaria edulis against human breast cancer cell line (MCF-7). *Int J Curr Sci*. 2016;**19**(4):36-46.
3. Kraljevic S, Sedic M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelic K. Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view? *Cancer Treat Rev*. 2006;**32**(8):619-629. **doi:** 10.1016/j.ctrv.2006.09.002 **pmid:** 17069979
4. Mehbub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs*. 2014;**12**(8):4539-4577. **doi:** 10.3390/md12084539 **pmid:** 25196730
5. Karthikeyan SC, Velmurugan S, Donio MB, Michaelbabu M, Citarasu T. Studies on the antimicrobial potential and structural characterization of fatty acids extracted from Sydney rock oyster Saccostrea glomerata. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;**13**:332. **doi:** 10.1186/s12941-014-0057-x **pmid:** 25599648
6. Nazemi M, Motallebi Moghanjoghi AA, Jamili S, Mashinchian A, Ghavam Mostafavi P. Comparison of antibacterial activities of Ircinia mutans extracts in two different seasons from Kish Island, Persian Gulf, Iran. 2014.
7. Çitoğlu GS, Acıkara ÖB. Column chromatography for terpenoids and flavonoids. Chromatography and its applications: INTECH Rijeka2012. 13-49 p.
8. Richman S, Loya Y, Sloboclkin LB. The rate of mucus production by corals and its assimilation by the coral reef copepod Acartia negligens 1. *Limnol Oceanograph*. 1975;**20**(6):918-923. **doi:** 10.4319/lo.1975.20.6.0918
9. Rosenblatt DH, Burrows EP, Mitchell WR, Parmer DL. Organic explosives and related compounds. In Anthropogenic Compounds. Springer, Berlin, Heidelberg. 1991:195-234. **doi:** 10.1007/978-3-540-46757-1_4
10. Brown P, Mei G, Gibberd FB, Burston D, Mayne PD, McClinchy JE, et al. Diet and Refsum's disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum's disease. *J Human Nutrition Dietetic*. 1993;**6**(4):295-305. **doi:** 10.1111/j.1365-277X.1993.tb00375.x
11. Datta D, Talapatra SN, Swarnakar S. Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. *Int Letter Natur Sci*. 2015:7. **doi:** 10.18052/www.scipress.com/ILNS.34.42
12. Ishibashi Y, Nagamatsu Y, Miyamoto T, Matsunaga N, Okino N, Yamaguchi K, et al. A novel ether-linked phytol-containing digalactosylglycerolipid in the marine green alga, Ulva pertusa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;**452**(4):873-880. **doi:** 10.1016/j.bbrc.2014.08.056 **pmid:** 25157808
13. Joel EL, Bhimba V. Isolation and characterization of secondary metabolites from the mangrove plant Rhizophora mucronata. *Asian Pacific J Tropic Med*.

2010;**3**(8):602-604. **doi:** 10.1016/S1995-7645(10)60146-0
14. Gillan FT, Nichols PD, Johns RB, Bavor HJ. Phytol degradation by marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1983;**45**(5):1423-1428. **doi:** 10.1128/aem.45.5.1423-1428.1983 **pmid:** 16346282
15. Yuenyongsawad S, Tewtrakul S. Essential oil components and biological activities of Coleus parvifolius leaves. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2005;**27**:497-502.
16. Ilavarasi K, Chermakani P, Arif Nisha S, Sheeja Malar D, Pandima Devi K. Antioxidant compounds in the seaweed Gelidiella acerosa protects human Peripheral Blood Mononuclear Cells against TCDD induced toxicity. *Drug Chem Toxicol*. 2015;**38**(2):133-144. **doi:** 10.3109/01480545.2014.919582 **pmid:** 24844840
17. Pejin B, Kojic V, Bogdanovic G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Nat Prod Res*. 2014;**28**(22):2053-2056. **doi:** 10.1080/14786419.2014.921686 **pmid:** 24896297
18. Bhanot A, Sharma R, Noolvi MN. Natural sources as potential anti-cancer agents: A review. *Int J Phytomed*. 2011;**3**:9-26.
19. Petit K, Biard JF. Marine natural products and related compounds as anticancer agents: an overview of their clinical status. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;**13**(4):603-631. **doi:** 10.2174/1871520611313040010 **pmid:** 23140351
20. Ghaneian MT, Ehrampoush MH, Jebali A, Hekmatimoghaddam S, Mahmoudi M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environ Health Engineer Manage J*. 2015;**2**(1):13-16.
21. Eluchie C, Oranusi S, Akujobi C, Alagbaoso S. Efect of Phytol on Dehydrogenase Activity of Bacterial Isolates from Grilled Meat. *America J Food Sci Technol*. 2016;**4**(1):1-6.
22. Inoue Y, Hada T, Shiraishi A, Hirose K, Hamashima H, Kobayashi S. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;**49**(5):1770-1774. **doi:** 10.1128/AAC.49.5.1770-1774.2005 **pmid:** 15855494
23. Duckworth A. Farming sponges to supply bioactive metabolites and bath sponges: a review. *Mar Biotechnol (NY)*. 2009;**11**(6):669-679. **doi:** 10.1007/s10126-009-9213-2 **pmid:** 19585169
24. Muller WE, Bohm M, Batel R, De Rosa S, Tommonaro G, Muller IM, et al. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from Dysidea avara. *J Nat Prod*. 2000;**63**(8):1077-1081. **doi:** 10.1021/np000003p **pmid:** 10978201
25. Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. Technique des associations d'antifongiques in vitro et in vivo chez l'animal. *Mycol Med*. 2003;**13**:73-85.
26. Raveendran TV, Mol VL. Natural product antifoulants. Current Science. 2009:508-520.
27. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Method*. 19910;**142**(2):257-265. **doi:** 10.1016/0022-1759(91)90114-U
28. Santafe G, Paz V, Rodriguez J, Jimenez C. Novel cytotoxic oxygenated C29 sterols from the Colombian marine sponge Polymastia tenax. *J Nat Prod*. 2002;**65**(8):1161-1164. **doi:** 10.1021/np0200459 **pmid:** 12193022
29. Thakur NL, Müller WE. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Sci*. 2004:1506-1512.

AUTHOR(S) BIOSKETCHES

Nazemi, M., Assistant professor, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran

✉ *melikanazemi@yahoo.com*

Karimzadeh, R., M.Sc., Institute, Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

✉ *ra_karimzadeh@yahoo.com*

Aghaei Dargiri, S., Ph.D., Department Horticulture Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resource, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

✉ *s.aghaei6418@gmail.com*

Ghaffari, H., Assistant professor, Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

✉ *hadi.ghafarii@gmail.com*

Ghorbani, M., Associate professor, Pasteur Institute of Iran the Production & Research Complex, Department of Research & Development, Tehran, Iran.

✉ *mghorbani2000@yahoo.com*

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Citation (Vancouver) *Nazemi M, Karimzadeh R, Aghaei Dargiri S, Ghaffari H, Ghorbani M. Extraction and characterization of phytol fraction from marine sponge Dysidea avara and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities. J Oceanography. 2022; 12(48): 109-118.*

http://doi.org/10.52547/joc.12.48.109

http://joc.inio.ac.ir/article-1-1434-fa.html

https://orcid.org/0000-0002-8311-5238

COPYRIGHTS

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.