

مقاله علمی - پژوهشی:

بررسی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های قلم دریایی *Virgularia juncea* از خلیج فارس

رضا محسنیان کوچکسرائی^۱، ملیکا ناظمی^۲، مهدی مریدی فریمانی^{۳*}

*m_moridi@sbu.ac.ir

۱- پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران.

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

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۹

چکیده

گرچه خلیج فارس دارای شرایط محیطی منحصربه‌فردی است، اما تاکنون مطالعه قابل توجهی در جهت شناسایی ترکیبات طبیعی دریایی و خواص بیولوژیک آبریان آن انجام نشده است. هدف از این پژوهش، بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های هگزانی، اتیل استاتی و متانولی قلم دریایی *Virgularia juncea* جمع‌آوری شده از بندرعباس، ساحل خور سورا بر سویه‌های باکتری‌های (*Escherichia coli* ATCC)، (*Bacillus subtilis spizizenii* ATCC) و (*Staphylococcus aureus*) می‌باشد. طرح‌ریزی مراحل این مطالعه بر اساس آزمایش‌های زیست-سنجی بود که پارامترهای MIC و MBC برای عصاره‌ها و فراکسیون‌ها مورد آنالیز قرار گرفت. عصاره اتیل استاتی *V. juncea* فعالیت مهار رشد قابل ملاحظه‌ای با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سویه باکتری *S. aureus* نشان داد و در ادامه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مورد جداسازی قرار گرفت. برش فعال (F6d) جداسازی شده از عصاره اتیل استاتی که در کمترین غلظت نسبت به سایر برش‌ها، ماهیت کشندگی بر سویه باکتری *S. aureus* داشت، با استفاده از روش HPLC خالص‌سازی شد. ترکیب کلس-۵-ان-۳-بتا-اول از برش فعال (F6d) خالص‌سازی شد که فعالیت کشندگی در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر علیه سویه باکتری *S. aureus* نشان داده بود. در نهایت این ترکیب با بررسی الگوی طیف جرمی در دستگاه GC-MS مورد شناسایی قرار گرفت. در این مطالعه، برای اولین بار ماهیت ضدباکتریایی عصاره‌های قلم دریایی *V. juncea* مورد بررسی قرار گرفت و ترکیب خالص شده با غلظت کشندگی ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به سویه باکتری *S. aureus* گزارش گردید.

لغات کلیدی: خلیج فارس، ترکیبات طبیعی دریایی، قلم دریایی، *Virgularia juncea*، ضدباکتری

*نویسنده مسئول

مقدمه

دریاها و اقیانوس‌ها بیش از ۷۰ درصد سطح زمین را تشکیل داده‌اند و بیش از ۸۰ درصد موجودات زنده در اکوسیستم‌های آبی وجود دارند. بنابراین، اقیانوس‌ها بزرگترین منبع حیات در کره زمین به‌شمار می‌آیند (Simmons et al., 2005). خط ساحلی جنوبی ایران بالغ بر ۱۷۰۰ کیلومتر است که شامل خلیج فارس و دریای عمان می‌باشد. این خط ساحلی شامل دو منطقه مختلف دریایی است، خلیج فارس که به دریایی گرم، شور، کم عمق و محصور شده مشهور است و دریای عمان که دارای دریایی خنک‌تر، عمیق‌تر، شوری کمتر و دمایی متعادل‌تر که به شمال غربی اقیانوس هند مشرف است. علت شوری بیش از حد خلیج فارس، محصور بودن به‌وسیله تنگه باریک هرمز از آب‌های بین‌المللی، تبخیر ده برابری نسبت به ورودی آب شیرین و واقع شدن در منطقه خشک می‌باشد (Sheppard, 1993; Martinsson et al., 2015). این موقعیت جغرافیایی تنوع زیستی دریایی بی‌نظیر و غنی را فراهم می‌کند که شامل جوامع اسفنجی و مرجانی می‌شود (Braulik et al., 2010). با این حال، مطالعه کمی در زمینه شیمی و پتانسیل زیست‌دارویی بی‌مهرگان ساکن در خلیج فارس صورت گرفته است.

موجودات دریایی به منظور مقابله با فشارهای محیطی متعدد (تغییرات دمای، فشار زیاد، نور کم و شوری آب)، دفاع در برابر شکار و نیز فعال کردن ارتباطات درون و بین اندام، تکامل خود را در طیف وسیعی از مکانیسم‌ها توسعه داده‌اند (Simmons et al., 2005). تولید متابولیت‌های ثانویه^۱ زیست فعال^۲ که به عنوان ترکیبات طبیعی دریایی شناخته می‌شود یکی از این راهبردهاست (Avila et al., 2008). در مقایسه با ترکیبات طبیعی خشکی^۳، ترکیبات طبیعی دریایی دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصربه‌فرد و ویژگی‌های ساختاری متفاوتی هستند. برای مثال، ترکیبات طبیعی دریایی عموماً دارای اندازه‌های مولکولی بزرگتر و آبگریزتر هستند (Kong et al., 2010). همچنین پیوند کووالانسی هالوژن (عمدتاً کلر و

برم) و اتم‌های نیتروژن در ترکیبات طبیعی دریایی بیشتر دیده می‌شوند (Simmons et al., 2005; Shang et al., 2018).

اکتوکورال‌ها^۴ جزو راسته *Alcyonacea* می‌باشند که گروه بزرگ از کلنی‌های بی‌مهرگان کفزی را به‌خود اختصاص داده‌اند. این گروه دارای گونه‌های متنوع که در دریاها و اقیانوس‌ها جایگاه ویژه‌ای دارند. اکتوکورال‌ها دارای مقادیر زیادی از متابولیت‌های ثانویه هستند که در اندام و قسمت بیرونی آنها یافت می‌شود (Mayer and Gustafson, 2009; Mayer et al., 2008). نوع این ترکیبات با توجه به نوع گونه، متفاوت است و به عنوان مهم‌ترین عامل اکولوژیک این جانوران شناخته شده‌اند (Müller et al., 2004). یکی از این بی‌مهرگان دریایی کفزی، قلم‌های دریایی هستند. قلم‌های دریایی گروه منحصربه‌فردی هستند که از ناحیه بین جزر و مدی تا اعماق ۶۱۰۰ متر یافت می‌شوند. این گروه به صورت کلنی‌های منفرد چسبیده به بستر زندگی می‌کنند. قلم‌های دریایی معمولاً از لحاظ مورفولوژیک، ساختار مستقلى برای دفاع ندارند. بنابراین، مشتقات ترکیبات ثانویه این موجودات به عنوان مکانیسم دفاعی در مقابل شکارچیان طبیعی برای موجود عمل می‌کند (Williams, 2001). در واقع، متابولیت‌های ثانویه، به عنوان سلاح شیمیایی می‌باشند که قلم‌های دریایی و سایر جانداران آبی برای بقاء از آنها استفاده می‌کنند.

از اکتوکورال‌ها فعالیت ضدباکتریایی، ضدحساسیت، ضدتومور، ضدویروسی و ضدسرطان گزارش شده است که به علت حضور ترکیبات ترپنی است (Su et al., 2016). این دسته ترکیبات، از گونه *V. juncea* نیز گزارش شده است. مطالعه‌ای از این گونه، منجر به شناسایی سه سزکوئی‌ترین شد که فعالیت ضدسرطانی چشمگیری بر رده سلولی سرطانی P-388 نشان داده‌اند (Chen et al., 2001). یک ترکیب دی‌ترپنی به نام ویرگولاریول نیز برای اولین بار از این گونه گزارش شده است (Su et al., 2005).

¹ Secondary metabolite² Bioactive³ Terrestrial natural products⁴ Ectocoralia

juncea با شماره ووچر^۱ (Pg-sp- V.jun 12) در پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس و دریای عمان، بندرعباس نگهداری می‌شود.

عصاره‌گیری

عصاره‌گیری از نمونه قلم دریایی *V. juncea* با روش خیساندن^۲ و به‌ترتیب با استفاده از حلال‌های هگزان، اتیل‌استات و متانول، انجام شد (Su et al., 2005). ابتدا قلم‌های دریایی شسته شدند و با استفاده از دستگاه فریزدرایر^۳ در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نمونه‌ها خشک (جهت حذف کامل آب دریا) شده و سپس به صورت پودر تهیه شدند (Su et al., 2005). ۱۰۰ گرم از نمونه خشک شده به ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر هگزان منتقل گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت سوسپانسیون حاصل از صافی عبور داده شد تا عصاره هگزانی حاصل گردد و پودر قلم دریایی باقی مانده بر صافی مجدداً دو بار دیگر با همان حجم از هگزان مورد جداسازی قرار گرفت. عصاره‌های به‌دست آمده طی سه مرحله با هم مخلوط شدند و با استفاده از دستگاه تیخیرکننده دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ گردیدند. پودر باقی‌مانده از قلم دریایی بر کاغذ صافی، مجدداً با حلال‌های اتیل‌استات و متانول و دقیقاً مشابه با همان روش انجام شده برای حلال هگزان، مورد استخراج قرار گرفت تا عصاره‌های اتیل‌استاتی و متانولی حاصل گردند.

بررسی خواص ضدباکتری

برای بررسی خواص ضدباکتریایی از عصاره‌های به‌دست آمده از قلم دریایی *V. juncea* از روش براث (Methods Dilution Broth Bacterial) به شرح ذیل استفاده شد. سویه‌های باکتری‌های (*Escherichia coli* ATCC 15224)، (*Bacillus subtilis spizizenii* ATCC 6633) و (*Staphylococcus aureus* ATCC 1764) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به

همچنین قلم‌های دریایی از جنس *Virgularia* به محتوای ترکیبات استروئیدی فراوان شناخته شده‌اند (Su et al., 2005). در مطالعه‌ای شش ترکیب استرول‌پراکسید از یکی از گونه‌های این جنس گزارش شده که یکی از ترکیبات دارای ساختاری نادر می‌باشد (Stonard et al., 1980).

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که عوامل میکروبی یکی از شایع‌ترین عوامل بیماری‌زایی در عصر حاضر برای انسان است که به منظور مهار و از بین بردن آنها باید از آنتی‌بیوتیک‌ها که هرکدام با مکانیسم‌های متفاوتی وارد عمل می‌شوند، استفاده نمود. از سوی دیگر، باکتری‌های پاتوژن پس از مدتی نسبت به آنتی‌بیوتیک خاص مقاوم می‌شوند. بنابراین، تحقیق و بررسی به منظور کشف آنتی‌بیوتیک‌های جدید باید ادامه داشته باشد (Cohen, 1992; Ling et al., 2015).

به عنوان بخشی از مطالعات ما بر خواص بیولوژیک موجودات دریایی خلیج فارس و جداسازی ترکیبات زیست فعال آنها (Kouchaksaraee et al., 2020, 2021)، قلم دریایی *V. juncea* از سواحل بندرعباس انتخاب شد. در این مطالعه، خواص ضدباکتریایی عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی به‌دست آمده از *V. juncea* مورد بررسی قرار گرفت. همچنین در این کار از روش‌های جدید رهگیری ترکیبات بیولوژیک تحت هدایت فعالیت ضد باکتریایی استفاده شد که منجر به جداسازی ترکیب فعال ضدباکتریایی شد.

مواد و روش کار

نمونه برداری

نمونه قلم دریایی *V. juncea*، در مهر ماه ۱۳۹۵ از ساحل خور سورا، بندر عباس، استان هرمزگان در مناطق جذر و مدی با روش ساده پرسه زدن و جمع‌آوری با دست (Su et al., 2005)، به‌دست آمد. سپس در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و با استفاده از یخ‌خشک، با هواپیما به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه قلم دریایی *V.*

¹ Voucher

² Macerate

³ Freezer dryer

صورت لیوفیلیزه تهیه شدند. سپس هر کدام از سویه‌ها کشت اولیه داده شدند و به مدت ۲۴-۷۲ ساعت بر اساس میزان سرعت رشد باکتری‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند تا از کلونی‌های تک به منظور انجام تست‌های بیولوژیک استفاده شود. پس از رشد کافی باکتری‌ها از انکوباتور خارج شدند و کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط برات در لوله‌های آزمایش وارد شدند. این فرایند آن قدر تکرار شد تا کدورت محیط برات با کدورت لوله مک‌فارلند 0.5×10^6 (McFarland) یکسان شد. مقدار ۱ میلی‌لیتر از لوله مذکور که حاوی $(1/5 \times 10^6)$ باکتری بود، به تمامی لوله‌های استریل اضافه شد. سپس از عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی با غلظت‌های ۱۰۰-۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰) که در محیط برات حل شده بود، به مقدار ۱ میلی‌لیتر به لوله‌های مذکور افزوده شد. همچنین برای در نظر گرفتن شاهد مثبت از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، با غلظت‌های مذکور استفاده گردید و به عنوان شاهد منفی به یکی از لوله‌ها هیچ ماده فعال بیولوژیک اضافه نشد. علاوه بر این، در داخل یک لوله، تنها محیط کشت فاقد ماده مؤثره و باکتری قرار داده شد تا در صورت آلودگی محیطی خطای آزمایش مشخص گردد. سپس تمامی لوله‌ها که با پنبه سر آنها بسته شده بود، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. پس از طی شدن این زمان، لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شدند و کدورت آنها مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که باکتری‌ها در آن فرصت رشد داشتند، بسیار کدر شده بودند، زیرا فاقد ترکیبات فعال بیولوژیک بود. سپس به صورت چشمی سایر لوله‌ها با لوله مذکور مقایسه شدند (میانگینی از ۳ مرتبه آزمایش برای هرگونه باکتری). لوله‌هایی که کدورت داشتند از ادامه کار خارج شدند و لوله‌هایی که در آن کدورت ایجاد نشده بود برای ادامه کار انتخاب شدند. شایان ذکر است، کمترین غلظت مواد مصرفی MIC^۱ به عنوان شاخصی از قدرت عصاره یا ماده فعال در بازدارندگی از رشد و افزایش تعداد باکتری‌ها می‌باشد (Rosenblatt, 1991). نمونه‌ای

که در کمترین غلظت توان بازدارندگی بهتری دارد، به عنوان نمونه موثر جهت مطالعه بیشتر انتخاب می‌شود. در ادامه آزمایش به منظور تعیین توانایی عصاره‌های مورد نظر در از بین بردن باکتری‌ها، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از لوله‌هایی که در آنها کدورت مشاهده نشده بود، به محیط تغذیه‌ای آگار به پلیت‌های استریل اضافه شد. سپس این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، پلیت‌ها برای شمارش تعداد کلونی‌های تشکیل شده (CFU) از انکوباتور خارج شدند. پلیت‌هایی که در آن باکتری رشد کرده بود، نشان‌دهنده آن است که عصاره مورد نظر تنها توانایی مهار رشد و تکثیر باکتری را دارد درحالی‌که در پلیت‌هایی که هیچ‌گونه کلونی مشاهده نشده بود، حاکی از آن است که ماده مورد نظر سبب مرگ باکتری شده است، این مقدار برابر با MBC^۲ می‌باشد (Rosenblatt, 1991).

مواد و دستگاه‌های مورد استفاده

سیلیکاژل ستون با مش ۲۳۰-۷۰ و کاغذ TLC^۳ از شرکت مرک خریداری گردید. خالص‌سازی ترکیب فعال با استفاده از سیستم کروماتوگرافی Knauer ساخت آلمان مجهز به پمپ HPLC مدل K1001 به همراه شیر تزریق با لوپ ۱۰۰ میکرولیتر و آشکارساز PDA مدل K-2800 در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی انجام گرفت. دستگاه جی‌سی‌مس (مدل Agilent7000 Series Triple Quad GC/MS MainFrame؛ گاز کریر هلیوم ۹۹/۹۹ درصد، دکتور C5975، ستون: Part number 19091s-436، طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر) در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی تزریق شد. حلال‌های مورد استفاده برای HPLC از شرکت مرک و برای ستون‌های کروماتوگرافی معمولی از شرکت امرتات-شیمی خریداری شدند.

جداسازی و خالص‌سازی فراکسیون فعال بیولوژیک

^۲ Minimum Bactericidal Concentration

^۳ Thin-layer chromatography

^۱ Minimum Inhibitory Concentration

TLC، فراکسیون‌های حاصل از این ستون و ادغام نمونه‌های مشابه با یکدیگر در مجموع هشت زیربرش (F6a-F6h) به‌دست آمد که از بین آنها، زیر برش F6d همچنان فعالیت قابل ملاحظه‌ای بر علیه باکتری *S. aureus* نشان داد. سپس ترکیبات این جزء با استفاده از تکنیک HPLC که با ستون C18 (طول ستون ۲۵ سانتی‌متر، قطر ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر) مجهز شده بود و با شویش ۸۰-۲۰ آب (دو بار تقطیر) و استونیتریل با سرعت حلالی ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه خالص‌سازی شد که در نهایت ترکیب کست-۵-ان-۳-بتا-اول به‌دست آمد.

نتایج

بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره‌های هگزانی، اتیل‌استاتی و متانولی قلم دریایی *V. juncea* با استفاده از روش برات (Methods Dilution Broth Bacterial) علیه سویه‌های باکتری‌های (*E. coli*)، (*B. spizizenii*) و (*S. aureus*) انجام شد (جدول ۱).

عصاره اتیل‌استاتی قلم دریایی *V. juncea* که فعالیت ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای در تست‌های بیولوژیک نشان داد، برای مطالعه بیشتر با کمک ستون کروماتوگرافی با طول ۶۰ سانتی‌متر و با قطر ۳/۵ سانتی‌متر با فاز ساکن سیلیکاژل (دوغابی که با ۳۰۰ گرم سیلیکاژل با دانه‌بندی ۲۳۰-۷۰ میکرومتر با حلال هگزان درست شده بود) و فاز متحرک هگزان، اتیل‌استات و متانول به صورت گرادیان جداسازی گردید. ۶۷ فراکسیون حاصل شد که این فراکسیون‌ها با استفاده از روش TLC پروفایلینگ، با سیستم‌های حلالی متفاوت مورد آنالیز قرار گرفت و فراکسیون‌های مشابه با هم مخلوط شدند. حاصل کار ۱۰ برش (F1-F10) با الگوی های TLC متفاوت بود، که این برش‌ها مورد آنالیز فعالیت بیولوژیک قرار گرفتند. برش F6 که فعالیت قابل توجهی علیه باکتری *S. aureus* نشان داد، مورد جداسازی بیشتر قرار گرفت. این برش از گرادیان حلالی ۱۰ درصد هگزان و ۹۰ درصد اتیل‌استات به‌دست آمده بود. به منظور خالص‌سازی ترکیبات این برش از ستونی به قطر ۲ سانتی‌متر و فاز متحرک با نسبت ۹۰ به ۱۰ از حلال‌های کلروفرم-استون استفاده شد. با آنالیز

جدول ۱: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری (MIC) عصاره‌های قلم دریایی (*V. juncea*)

Table 1: Minimum inhibitory concentration (MIC) of bacterial growth from sea pen extracts (*V. juncea*)

<i>S. aureus</i>			<i>B. spizizenii</i>			<i>E. coli</i>		
کنترل	متانولی	اتیل-استاتی	کنترل	متانولی	اتیل-استاتی	کنترل	متانولی	اتیل-استاتی
۵	-	۸۰	۵	-	۸۰	۹۰	-	۸۰
۳۰	۷/۵	-	۱۰	-	۸۰	۹۰	-	۸۰

کنترل: تتراسایکلین. مقادیر بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر هستند.

ادامه کار، عصاره اتیل‌استاتی قلم دریایی *V. juncea* که فعالیت چشمگیری نسبت به سایر عصاره‌ها داشت، جهت مطالعه و جداسازی ترکیبات فعال انتخاب شد. جداسازی ترکیبات این عصاره، با استفاده از ستون‌های کروماتوگرافی، انجام شد. مکانیسم جداسازی عصاره مورد نظر بر اساس قطبیت ترکیبات و حلال شویشی که در برهمکنش با فاز ساکن می‌باشند، صورت پذیرفت. حاصل این جداسازی، ۶۷ فراکسیون بود که فراکسیون‌های مشابه بر اساس الگوی TLC ادغام شدند (شکل ۱). در این

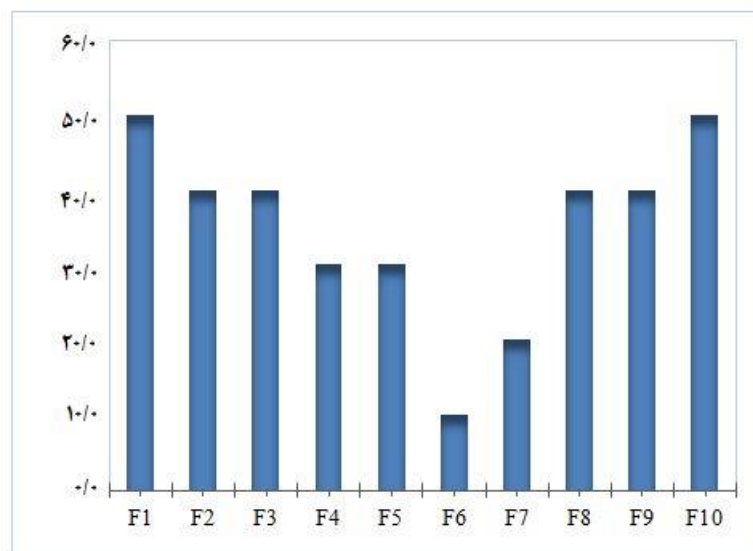
با توجه به جدول ۱ تنها عصاره اتیل‌استاتی فعالیت قابل ملاحظه‌ای علیه یکی از سویه‌های باکتری، *S. aureus* نشان داد. سایر عصاره‌ها در غلظت پایین‌تر از ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فعالیت قابل توجهی نداشتند. طبق جدول ۱ عصاره متانولی در مقابل هیچ‌یک از سویه‌ها، فعالیتی نشان نداد. در نتیجه، این مطالعه بر اساس جداسازی ترکیب فعال موجود در عصاره *V. juncea* تحت هدایت فعالیت ضدباکتریایی مورد نظر (نسبت به سویه باکتری *S. aureus*)، طرح‌ریزی شد. با این اوصاف برای

فرایند صفحات TLC، ابتدا زیر نور UV در طول موج ۲۵۴ نانومتر بررسی و سپس با معرف فسفومولیدات تحت حرارت ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد ظاهر می‌شدند.



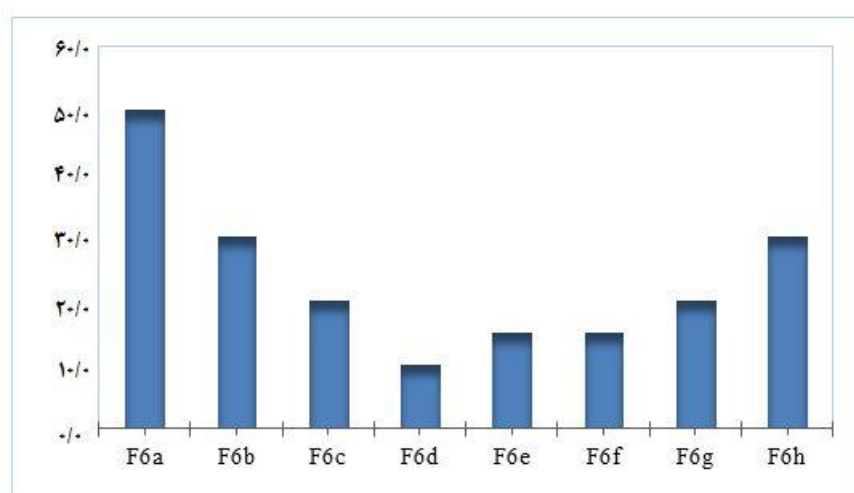
شکل ۱: برش F6d که حاصل ادغام الگوی رفتاری مشابه فراکسیون‌ها در TLC پروفایلینگ به‌دست آمد.

Figure 1: The F6d subfraction was obtained by integrating a similar pattern of behaviours into TLC profiling



شکل ۲: حداقل غلظت کشندگی باکتری *Staphylococcus aureus* (MBC) فراکسیون‌های به دست آمده از عصاره اتیل‌استاتی قلم دریایی *V. juncea*

Figure 2: Minimum Bactericidal (*Staphylococcus aureus*) Concentration (MBC) of fractions obtained from ethyl acetate extract of *V. juncea*



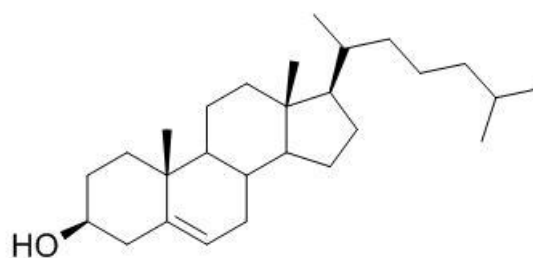
شکل ۳: حداقل غلظت کشندگی باکتری *Staphylococcus aureus* (MBC) توسط برش‌های به دست آمده از برش F6
Figure 3: Minimum Bactericidal (*Staphylococcus aureus*) Concentration (MBC) of fractions obtained from ethyl acetate extract of *V. juncea*

۲۳۱ (۱۸)، ۲۱۳ (۴۷)، ۱۹۹ (۱۶)، ۱۸۷ (۱۷)، ۱۷۸ (۳۶)، ۱۷۳ (۱۷)، ۱۶۳ (۲۹)، ۱۶۱ (۴۴)، ۱۵۹ (۳۶)، ۱۴۵ (۴۵)، ۱۳۳ (۳۷)، ۱۱۹ (۳۲)، ۱۰۵ (۶۱)، ۹۵ (۱۷)، ۹۱ (۵۷)، ۸۱ (۴۷)، ۷۹ (۵۸)، ۶۹ (۲۶)، ۶۷ (۲۳)، ۵۷ (۵۲)، ۵۵ (۴۱)، ۴۳ (۹۳)، ۴۱ (۸۵) شناسایی شد. همچنین مقدار $[\alpha]_D^{25}$ -۲۶ در حلال کلروفرم با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Riccardis et al., 1993; Jamebozorgi et al., 2019).

بحث

در منابع، گزارش‌های زیادی از فعالیت ضدباکتریایی اکتوکورال‌ها وجود دارد (Almeida et al., 2014). Correa و همکاران (۲۰۱۱) چندین فعالیت ضد میکروبی که شامل باکتری و قارچ (*S. aureus*، *Enterococcus faecalis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans*) می‌شود، از موجود دریایی *Pseudopterogorgia elisabethae* مورد بررسی قرار دادند. عصاره‌های به‌دست آمده، فعالیت خوبی بر باکتری گرم مثبت نشان داده بودند درحالی‌که بر باکتری گرم منفی و قارچ فعالیت قابل ملاحظه‌ای ذکر نشده است. بهترین فعالیت گزارش شده، مقدار ۳/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *S. aureus* گزارش شده است (Correa et al., 2011).

حاصل خالص‌سازی برش F6d، ترکیب خالص کلست-۵-ان-۳-بتا-اول بود که فعالیت متوسط علیه *S. aureus* داشت. این ترکیب شناخته شده، با استفاده از مقایسه اطلاعات طیفی تکنیک کروماتوگرافی گازی کوپل شده با اطلاعات کتابخانه‌ای شناساگر مس اسپکترومتری شناسایی شد. همچنین کانفیگوراسیون آن با استفاده از مقدار $[\alpha]_D$ و مقایسه آن با اطلاعات موجود در ادبیات، تعیین شد (شکل ۴).



شکل ۴: ساختار شیمیایی کلست-۵-ان-۳-بتا-اول
Figure 4: Chemical structure of cholest-5en-3beta-ol

ترکیب کلست-۵-ان-۳-بتا-اول با زمان بازداری ۶/۶۷ دقیقه، فرمول مولکولی و شکست‌های طیف جرمی ($C_{27}H_{46}O$) (۱۰۰)، (۳۷۱) (۴۵)، ۳۶۸ (۵۱)، ۳۵۳ (۳۶)، ۳۲۶ (۱۵)، ۳۰۲ (۱۵)، ۳۰۱ (۵۵)، ۲۷۶ (۲۹)، ۲۷۵ (۶۳)، ۲۵۵ (۳۴)، ۲۴۷ (۱۵)، ۲۵۵ (۳۱)، ۲۴۷ (۱۵).

gustaviana و ترکیبات خالص شده از آن را بررسی کردند.

گزارش‌هایی محدود از قلم دریایی *Virgularia juncea* نیز وجود دارد که حضور این دسته ترکیبات را تایید می‌کند. Chen و همکاران (۲۰۰۱) ترکیب سه سزکوئی‌ترینی از این موجود جداسازی کردند که فعالیت ضدسرطانی چشمگیری بر رده سلولی سرطانی P-388 نشان داد. همچنین Su و همکاران (۲۰۰۵) ترکیبات دی‌ترینی و یگولاریول^۱ را برای اولین بار از قلم دریایی *Virgularia juncea* گزارش کردند. در مطالعه پیش رو، جداسازی ترکیبات طبیعی بر اساس فعالیت ضدباکتری طرح‌ریزی شد که منجر به جداسازی ترکیب فعال شد. این احتمال وجود دارد که موجود مورد مطالعه نیز حاوی ترکیبات دی- و سزکوئی‌ترین باشد، ولی با توجه به روش انتخابی در این مطالعه، منتج به جداسازی آنها نشده است. ترکیبات استروئیدی و اسیدهای چرب با مقادیر زیاد در غشاء موجودات دریایی وجود دارند (Dembitsky et al., 2003). این ترکیبات تحت شرایط محیطی خاص محل زندگی گونه‌های دریایی و با حضور مقادیر زیاد اکسیژن در غشا، تبدیل به ترکیبات متنوعی از جمله آمینواستروئیدها، استروئیدهای فسفات و پلی‌هیدروکسی استروئید می‌شود (Vanderah and Djerassi, 1977; Kerr and Baker, 1991; Riccardis et al., 1993; Keyzers et al., 2008). یکی از این دسته ترکیبات کلسترول‌ها هستند که نقش تثبیت‌کننده غشایی دارند. آنها همچنین در تعادل با اسیدهای چرب باعث حفظ یکپارچگی، انعطاف‌پذیری و نفوذپذیری موجود دریایی می‌شوند. این ترکیبات دارای خواص بیولوژیک بسیار متنوع و با فعالیت بالا می‌باشند (Vanderah and Djerassi, 1977; Kresge et al., 2005). همچنین Stonard و همکاران (۱۹۸۰) گزارش کردند که قلم‌های دریایی از جنس *Virgularia* حاوی ترکیبات استروئیدی فراوان هستند. آنها در مطالعه‌ای شش ترکیب استرول پراکسید از این جنس گزارش کردند که ساختار نادری در بین ترکیبات شیمیایی استروئیدی می‌باشد (Stonard et al., 1980). Vanderah و

(al., 2011). در مطالعه حاضر، بهترین نتیجه از عصاره اتیل استاتی به مقدار ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *S. aureus* به‌دست آمد.

اخیراً میحث جداسازی میکروارگانیسم از موجودات دریایی و کشت آنها در محیط تغذیه‌ای و آزمایشگاهی شاخه بسیار جذابی را جهت مطالعه ترکیبات طبیعی به‌وجود آورده است. این بررسی‌ها بیان‌کننده یک همزیستی بین میکروارگانیسم‌ها و موجود دریایی می‌باشد. پروپوراتو و همکاران (۲۰۱۳)، خواص ضد میکروبی از عصاره‌های کشت باکتری جدا شده از قلم دریایی *Pennatula phosphorea* گزارش کردند. این گزارش شامل فعالیت عصاره‌ها علیه *M. S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *J. luteus* (Porporato et al., 2013) می‌باشد. در مطالعه حاضر، فعالیت‌های مشابهی نسبت به مطالعه گزارش شده، مشاهده شد که ممکن است این اثرات ناشی از یک همزیستی بین قلم دریایی *V. juncea* و میکروارگانیسم‌های آن باشد. عصاره‌های به‌دست آمده از قلم دریایی *V. juncea* به‌جز متانول، علیه سویه‌های باکتری‌های (*E. coli*), (*B. spizizenii*) و (*S. aureus*) فعال بودند. طبق دانش نگارندگان، این مطالعه اولین گزارش از فعالیت ضد باکتری عصاره‌های قلم دریایی *V. juncea* می‌باشد.

Su و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که اکتوکورال‌ها حاوی ترکیبات تریپنی، بخصوص دی‌ترین و سزکوئی‌ترین هستند. در ادبیات علمی، این دسته ترکیبات به دفعات از اکتوکورال‌ها جداسازی و خواص بیولوژیک شامل فعالیت ضدباکتریایی، ضدحساسیت، ضدتومور، ضدویروسی و ضدسرطان از آنها گزارش شده است. این فعالیت‌ها از عصاره موجودات دریایی *Briareum violacea* (Liaw et al., 2014), *Dichotella gemmacea* (Li et al., 2013), *Ellisella dollfusi* (Zhou et al., 2014), *Junceella fragilis* (Lei et al., 2014) و قلم دریایی *Pennatula aculeate* (Bahl et al., 2014) گزارش شده است. همچنین Sharifi et al. (2018) خواص ضدسرطانی عصاره اتیل استاتی قلم دریایی *Virgularia*

¹ Vigulariol

می‌توان آن را به اثر هم‌افزایی^۱ ترکیبات در خواص بیولوژیک نسبت داد. مطالعه حاضر نشان داد که موجودات دریایی حاوی ترکیباتی با پتانسیل بالا برای کشف دارو می‌باشند. لذا، مطالعه جامع موجودات دریایی به‌خصوص ناحیه خلیج فارس حائز اهمیت می‌باشد.

منابع

- Almeida, M.T.R., Moritz, M.I.G., Capel, K.C., Pérez, C.D. and Schenkel, E.P., 2014. Chemical and biological aspects of octocorals from the Brazilian coast. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 446-467. DOI:org/10.1016/j.bjp.2014.05.002.
- Avila, C., Taboada, S. and Núñez-Pons, L., 2008. Marine Antarctic chemical ecology: What is next? *Marine Ecology*, 29: 1-70. DOI:org/10.1111/j.1439-0485.2007.00215.x.
- Bahl, A., Jachak, S.M., Palaniveloo, K., Ramachandram, T., Vairappan, C.S. and Chopra, H.K., 2014. 2-acetoxyverecynarmin c, a new briarane cox inhibitory diterpenoid from Pennatula aculeata. *Natural Product Communications*, 9: 1139-1141. DOI:org/10.1177/1934578X1400900820.
- Braulik, G.T., Ranjbar, S., Owfi, F., Aminrad, T., Dakhteh, S.M.H., Kamrani, E. and Mohsenizadeh, F., 2010. Marine mammal records from Iran. *Journal of Cetacean Research and Management*, 11: 49-63.

Djerassi (۱۹۷۷) استروئیدهایی با ساختارهای متنوع از قلم دریایی *Ptilosarcus gurneyi* Gray گزارش کردند. طبق دانش نگارندگان، مطالعه حاضر، اولین گزارش از ترکیبات استروئیدی شناسایی شده از قلم دریایی *V. juncea* می‌باشد.

مسیر بیوسنتتیک کلس-۵-ان-۳-بتا-اول با آغازگر استیل کوآنزیم آ و تحت تاثیر چندین آنزیم به موالونیک‌اسید، ایزوپروئوئید و اسکوالن می‌باشد. موجودات دریایی تحت تاثیر حضور اکسیژن (اکسیدایسون) و دکامپوزیسیون این ترکیب، مشتقات متنوع و با خواص بیولوژیک متفاوت تولید می‌کنند (Lyons and Brown, 1999; Kresge et al., 2005). در مطالعه حاضر، کروماتوگرام حاصل از برش F6d، حضور ترکیبات دیگری با الگوی طیف UV مشابه با ترکیب خالص شده را نشان می‌داد که بیان‌کننده مشتقات دیگری از ترکیب استروئیدی خالص شده بود که به علت مقادیر کم آنها، امکان خالص‌سازی ترکیبات بیشتری از این برش وجود نداشت. یکی از مشکلاتی که محققان در مطالعه ترکیبات طبیعی دریایی دارند، مقادیر اندک این ترکیبات می‌باشد. تکنیک‌های جدید که استفاده همزمان دستگاه‌های آزمایشگاهی را امکان‌پذیر کرده است، این شرایط را فراهم آورد تا بتوان مقادیر اندک ترکیبات طبیعی دریایی را مطالعه نمود. از جمله این تکنیک‌ها UPLC-MSMS می‌باشد که با حداقل مقدار ممکن از عصاره موجود دریایی (۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌توان ترکیبات طبیعی موجود در عصاره را مطالعه نمود (Wang et al., 2016). همان‌طوری‌که عنوان شد، خلیج فارس دارای محیطی بکر است که مطالعه قابل‌توجهی در جهت شناسایی ترکیبات طبیعی دریایی و خواص بیولوژیک آبزیان آن انجام نشده است. در این تحقیق، عصاره اتیل استاتی قلم دریایی *V. juncea* نسبت به سایر عصاره‌ها بر *S. aureus* فعالیت قابل ملاحظه‌ای با غلظت ۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد، اما ترکیب کلس-۵-ان-۳-بتا-اول خالص شده فعالیت بهتری از ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر *S. aureus* از خود نشان نداد. در مبحث ترکیبات طبیعی این امر بدیهی است که عصاره‌ها فعال‌تر از ترکیب خالص باشد و

¹ Synergic effect

- Chen, S.P., Sung, P.J., Duh, C.Y., Dai, C.F. and Sheu, J.H., 2001.** Junceol a, a new sesquiterpenoid from the sea pen *Virgularia juncea*. *Journal of Natural Products*, 64: 1241-1242, DOI:.org/10.1021/np010192r.
- Cohen, M.L., 1992.** Epidemiology of drug resistance: Implications for a post-antimicrobial era. *Science*, 257: 1050-1055. DOI:.org/10.1126/science.257.5073.1050.
- Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C. and Kerr, R., 2011.** Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterosins and seco-pseudopterosins isolated from the octocoral pseudopterogorgia elisabethae of san andrés and providencia islands (southwest Caribbean Sea). *Marine Drugs*, 9: 334-344, DOI:.org/10.3390/md9030334.
- Dembitsky, V.M., Rezanka, T. and Srebnik, M., 2003.** Lipid compounds of freshwater sponges: Family Spongillidae, class Demospongiae. *Chemistry and Physics of Lipids*, 123: 117-155, DOI:.org/10.1016/S0009-3084(03)00020-3.
- Kerr, R.G. and Baker, B.J., 1991.** Marine sterols. *Natural Product Reports*, 8: 465-497. DOI:.org/10.1039/NP9910800465.
- Keyzers, R.A., Daoust, J., Davies-Coleman, M.T., Soest, R.V., Balgi, A., Donohue, E., Roberge, M. and Andersen, R.J., 2008.** Autophagy-modulating aminosteroids isolated from the sponge *Cliona celata*. *Organic Letters*, 10: 2959-2962. DOI:.org/10.1021/ol800937u.
- Kong, D.X., Jiang, Y.Y. and Zhang, H.Y., 2010.** Marine natural products as sources of novel scaffolds: Achievement and concern. Elsevier Current Trends, Netherlands. 884P. DOI:.org/10.1016/j.drudis.2010.09.002.
- Kouchaksaraee, R.M., Farimani, M.M., Li, F., Nazemi, M. and Tasdemir, D., 2020.** Integrating Molecular Networking and 1H NMR Spectroscopy for Isolation of Bioactive Metabolites from the Persian Gulf Sponge *Axinella sinoxea*. *Marine Drugs*, 18, 366. DOI:.org/10.3390/md18070366.
- Kouchaksaraee, R.M., Li, F., Nazemi, M., Farimani, M.M. and Tasdemir, D., 2021.** Molecular Networking-Guided Isolation of New Etzionin-Type Diketopiperazine Hydroxamates from the Persian Gulf Sponge *Cliona celata*. *Marine Drugs*, 19: 439. DOI:.org/10.3390/md19080439.
- Kresge, N., Simoni, R.D. and Hill, R.L., 2005.** The biosynthetic pathway for cholesterol: Konrad bloch. *Journal of Biological Chemistry*, 280: e7.
- Lei, H., Sun, J.F., Han, Z., Zhou, X.F., Yang, B. and Liu, Y., 2014.** Fragilisinins a-l, new briarane-type diterpenoids from gorgonian *Junceella fragilis*. *Royal Society of Chemistry*, 4: 5261-5271. DOI:.org/10.1039/C3RA46163G.
- Li, C., Jiang, M., La, M.P., Li, T.J., Tang, H., Sun, P., Liu, B.S., Yi, Y.H., Liu, Z. and Zhang, W., 2013.** Chemistry and tumor cell growth inhibitory activity of 11, 20-epoxy-3z, 5 (6) e-diene briaranes from

- the South China Sea gorgonian *Dichotella gemmacea*. *Marine Drugs*, 11: 1565-1582. DOI:org/10.3390/md11051565.
- Liaw, C.C., Cheng, Y.B., Lin, Y.S., Kuo, Y.H., Hwang, T.L. and Shen, Y.C., 2014.** New briarane diterpenoids from Taiwanese soft coral *Briareum violacea*. *Marine Drugs*, 12: 4677-4692. DOI:org/10.3390/md12084677.
- Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E. and Epstein, S., 2015.** A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517: 455-459. DOI:org/10.1038/nature14098.
- Lyons, M.A. and Brown, A.J., 1999.** 7-ketocholesterol. *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 31: 369-375. DOI:org/10.1016/S1357-2725(98)00123-X.
- Martinsson, S., Rota, E. and Erséus, C., 2015.** Revision of cognettia (clitellata, enchytraeidae): Re-establishment of chamaedrillus and description of cryptic species in the sphagnetorum complex. *Systematics and Biodiversity*, 13: 257-277. DOI:org/10.1080/14772000.2014.986555.
- Mayer, A.M. and Gustafson, K.R., 2008.** Marine pharmacology in 2005–2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer*, 44: 2357-2387. DOI:org/10.1016/j.ejca.2008.07.001.
- Mayer, A.M., Rodríguez, A.D., Berlinck, R.G. and Hamann, M.T., 2009.** Marine pharmacology in 2005–6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790: 283-308. DOI:org/10.1016/j.bbagen.2009.03.011.
- Müller, W.E., Grebenjuk, V.A., Pennec, L.G., Schröder, H.C., Brümmer, F., Hentschel, U., Müller, I.M. and Breter, H.J., 2004.** Sustainable production of bioactive compounds by sponges-cell culture and gene cluster approach: A review. *Marine Biotechnology*, 6: 105-117. DOI:org/10.1007/s10126-002-0098-6.
- Porporato, E., Giudice, A.L., Michaud, L., Domenico, D.E. and Spanò, N., 2013.** Diversity and antibacterial activity of the bacterial communities associated with two mediterranean sea pens, *Pennatulaphosphorea* and *Pteroeides spinosum* (anthozoa: Octocorallia). *Microbial Ecology*, 66: 701-714. DOI:org/10.1007/s00248-013-0260-x.
- Riccardis, D.F., Minale, L., Iorizzi, M., Debitus, C. and Lévi, C., 1993.** Marine sterols. Side-chain-oxygenated sterols, possibly of abiotic origin, from the new Caledonian sponge *Stelodoryx chlorophylla*. *Journal of Natural Products*, 56: 282-287. DOI:org/10.1021/np50092a016.
- Rosenblatt, J.E., 1991.** Laboratory tests used to guide antimicrobial therapy. Pp. 942-948

- in Mayo Clinic Proceedings. Elsevier. DOI:org/10.1016/bs.mim.2015.05.001.
- Shang, J., Hu, B., Wang, J., Zhu, F., Kang, Y., Li, D., Sun, H., Kong, D.X. and Hou, T., 2018.** Cheminformatic insight into the differences between terrestrial and marine originated natural products. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 58: 1182-1193. DOI:org/10.1021/acs.jcim.8b00125.
- Sharifi, S., Ghavam Mostafavi, P., Mashinchian Moradi, A., Givianrad, M. H., and Niknejad, H., 2018.** Inducing Apoptosis of Cancer Cells Using Sea Pen *Virgularia gustaviana* Extract Which is Comparable to Cembrane Diterpene Sarcophine. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 17: 640–652.
- Sheppard, C.R., 1993.** Physical environment of the gulf relevant to marine pollution: An overview. *Marine Pollution Bulletin*, 27: 3-8. DOI:org/10.1016/0025-326X(93)90003-3.
- Simmons, T.L., Andrianasolo, E., McPhail, K., Flatt, P. and Gerwick, W.H., 2005.** Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4: 333-342.
- Stonard, R.J., Petrovich, J.C., and Andersen, R.J., 1980.** A new C₂₆sterol peroxide from the opisthobranch mollusk *Adalaria* sp. And the sea pen *Virgularia* sp. *Steroids*, 36: 81-86. DOI:org/10.1016/0039-128X(80)90070-7.
- Su, J.H., Huang, H.C., Chao, C.H., Yan, L.Y., Wu, Y.C., Wu, C.C. and Sheu, J.H., 2005.** Vigulariol, a new metabolite from the sea pen *Virgularia juncea*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 78: 877-879. DOI:org/10.1246/bcsj.78.877.
- Su, Y.D., Wen, Z.H., Wu, Y.C., Fang, L.S., Chen, Y.H., Chang, Y.C., Sheu, J.H. and Sung, P.J., 2016.** Briarenolides m-t, new briarane diterpenoids from a formosan octocoral *Briareum* sp. *Tetrahedron*, 72: 944-951. DOI:org/10.1016/j.tet.2015.12.058.
- Vanderah, D.J. and Djerassi, C., 1977.** Novel marine sterols with modified bile acid side chain from the sea pen *Ptilosarcus gurneyi*. *Tetrahedron Letters*, 18: 683-686. DOI:org/10.1016/S0040-4039(01)92726-1.
- Wang, M., Carver, J.J., Phelan, V.V., Sanchez, L.M., Garg, N., Peng, Y., Nguyen, D.D., Watrous, J., Kapon, C.A. and Luzzatto-Knaan, T., 2016.** Sharing and community curation of mass spectrometry data with global natural products social molecular networking. *Nature Biotechnology*, 34: 828-837. DOI:org/10.1038/nbt.3597.
- Williams, G., 2001.** Octocoral research center, bibliography of Octocorallia, Pennatulacea. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Netherlands. 225P.
- Zhou, Y.M., Shao, C.L., Huang, H., Zhang, X.L. and Wang, C.Y., 2014.** New briarane-type diterpenoids from gorgonian *Ellisella dollfusi* from the South China Sea. *Natural Product Research*, 28: 7-11. DOI:org/10.1080/14786419.2013.827191.

Investigation of antibacterial activity of *Virgularia juncea* extracts from the Persian Gulf

Mohsenian Kouchaksaraee R.¹; Nazemi M.²; Moridi Farimani M.^{1*}

*m_moridi@sbu.ac.ir

1-Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin, 1983969411 Tehran, Iran.

2-Persian Gulf and Oman Sea Ecological Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), 7916793165 Bandar Abbas, Iran.

Abstract

Although Iran covers most of the northern coast from the Persian Gulf, marine organisms from this region have not been investigated very well. Herein, we aimed at a detailed analyses of antibacterial profiles against *Escherichia coli* ATCC, *Bacillus subtilis spizizenii* ATCC and *Staphylococcus aureus* ATCC of the marine sea pen *Virgularia juncea* collected from the Persian Gulf in Iran. A bioguided isolation approach was used to purify the active compounds based on the MIC and MBC parameters obtained for the extracts and fractions. The n-hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *V. juncea* were tested in multiple in-house bioassays, and the ethyl acetate extract showed *in vitro* antibacterial activity against *S. aureus* (MIC value 7.5 µg/mL). This extract was fractionated by using open column chromatography. The isolated active fraction (F6d) which had high activity against the *S. aureus* strain at the lowest concentrations (MBC value 10 µg/mL) of other fractions, was purified using the HPLC method. The pure compound Cholest-5-en-3β-ol was isolated from the active fraction (F6d), and showed moderate activity against the *S. aureus* bacterial strain (MBC value 50 µg/mL). This compound was identified using the GC-MS technique. This is the first study that has dealt with bioactivity profiling of *V. juncea*, leading to isolation and identification of pure sea pen metabolite.

Keywords: Persian Gulf, Marine natural products, Sea pen, *Virgularia juncea*, Antibacterial

*Corresponding author